

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra dendrologie a šlechtění lesních dřevin



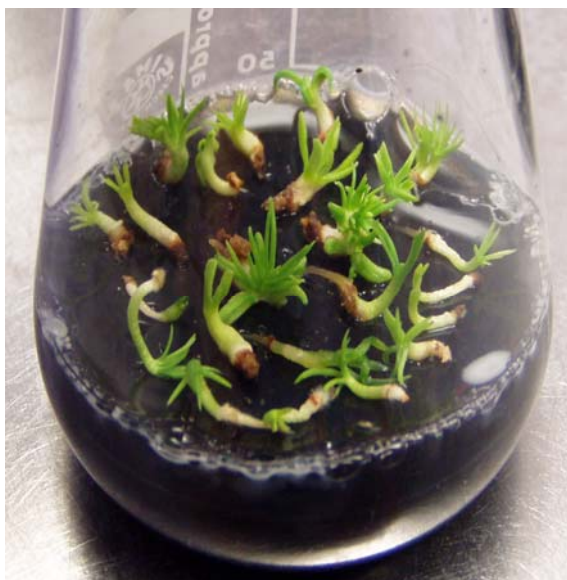
Disertační práce

Použití *in vitro* metod pro zachování genových zdrojů vybraných druhů lesních stromů

Autor: Ing. Michaela Mauleová

Školitel: Prof. Ing. Jaroslav Kobliha, CSc.

Práce byla provedena za finanční podpory Fondu rozvoje vysokých škol, projekt č. 891, zároveň Grantovou agenturou FLE, projekt č. 3158 a č. 3163 (IG 27./2006).



Prohlašuji, že jsem Disertační práci „Použití *in vitro* metod pro zachování genových zdrojů vybraných druhů lesních stromů“ vypracovala samostatně pod vedením **Prof. Ing. Jaroslava Koblíhy, CSc.** s využitím citované literatury na Katedře dendrologie a šlechtění lesních dřevin Fakulty lesnické a dřevařské, České zemědělské univerzity v Praze v letech 2002 - 2007. Souhlasím s případným zapůjčením práce pro studijní a vědecké účely.

Michaela Mauleová

Poděkování:

Děkuji všem blízkým co mi pomáhali při studiu i mimo něj, vřelé díky patří i mým oběma školitelům. S touto prací mi pak velmi pomáhal Ing. Jan Heller a Ing. Jarda Klápště. Mou oporou při psaní pak byli Předsedík, Tlust'och, Hanka Pechová, Iva, Milan, moje rodina a mnozí další. Všem těmto patří můj velký DÍK.

V Praze, léto 2007

Obsah:

1. Abstract.....	7
2. Úvod.....	9
3. Cíle disertační práce.....	11
4. Literární přehled.....	12
4.1. Somatická embryogeneze	12
4.2. Inicie embryogenní kultury	14
4.2.1. Anatomie a morfologie	14
4.2.2. Kultivace	15
4.2.3. Zásobní látky.....	18
4.3. Udržování (proliferace) embryogenní kultury	20
4.3.1. Anatomie a morfologie	20
4.3.2. Kultivace	21
4.3.3. Zásobní látky.....	21
4.3.4. Stabilita embryogenních kultur a kryoprezervace	22
4.4. Zrání (maturace) somatických embryí	25
4.4.1. Anatomie.....	26
4.4.2. Morfologie	27
4.4.3. Kultivace	29
4.4.4. Zásobní látky.....	36
4.5. Desikace.....	40
4.5.1. Vodní stres	41
4.5.2. Zásobní látky.....	42
4.5.3. Kultivace	44
4.6. Klíčení (germinace)	45
4.6.1. Zásobní látky.....	45
4.6.2. Kultivace	46
4.7. Přeměna v rostlinu (konverze).....	48
4.8. Možné faktory regulující SE.....	49
4.8.1. Genotyp.....	49
4.8.2. Proteiny	50
4.8.3. Ostatní vlivy.....	51
5. Materiál a metody	54
5.1. Rostlinný materiál.....	54
5.2. Kultivační podmínky	55

5.3.	Iniciace ESM.....	57
5.4.	Proliferace.....	58
5.5.	Maturace	59
5.6.	Desikace.....	60
5.7.	Germinace.....	61
5.8.	Přehled experimentů	62
5.8.1.	Stádium iniciace.....	62
5.8.2.	Stádium proliferace.....	63
5.8.3.	Stádium maturace.....	64
5.8.4.	Desikace a stádium germinace.....	65
5.8.5.	Proces somatické embryogeneze	66
6.	Výsledky	67
6.1.	Iniciace.....	67
6.2.	Proliferace	69
6.3.	Maturace	76
6.4.	Desikace a germinace	79
7.	Diskuse.....	84
7.1.	Indukce embryogenního pletiva.....	84
7.2.	Proliferace	88
7.3.	Maturace	94
7.4.	Desikace a germinace	101
8.	Závěry	108
9.	Summary	111
10.	Použité zkratky.....	113
11.	Literatura.....	115
12.	Přílohy.....	138
12.1.	Iniciace.....	142
12.1.1.	Média	142
12.1.2.	Lokality.....	145
12.2.	Proliferace	148
12.2.1.	4. týden.....	148
12.2.2.	8. týden.....	157
12.3.	Maturace	166
12.3.1.	Média	166
12.3.2.	Embryogenní linie.....	168

12.4. Germinace	172
12.4.1. Druh ošetření.....	172
12.4.2. Média	174
12.4.3. Embryogenní linie.....	176
12.5. Obrázková příloha.....	181

1. Abstract

Norway spruce is one of the major conifers in central and northern Europe. It covers approximately 25 millions hectares of area the European Union (EEC) (Pâques et al., 1995). In the Czech Republic covers Norway spruce in a long-term range (1955-1999) about 55 % of the forested land and is widely used for the reforestation of mountainous and hilly regions (Anonymous, 2000). Norway spruce (*Picea abies*) is a coniferous species of high ecological and industrial importance.

The wood is light in weight, soft, long-fibered, elastic, slightly resinous with few resin ducts and cream-colored or white. *Picea abies* is one of the most economically important coniferous species in Europe used for timber, pulp and paper production. It has also numerous other applications, including general joinery and carpentry, wood for fuel and musical instruments (Mo, 1993; Úradníček et al., 2001).

Unfortunately its natural reproduction cycle is long and the flowering is infrequent and irregular. Therefore most *Picea abies* breeding programs have mainly focused on a clonal strategy. The clonal strategy consists of: 1. the selection of superior mature trees according to their morphology, wood characteristics, and pathogens - tolerance; 2. multiclonal tests to confirm their selected properties; 3. planting large-scale multiclonal mixtures for reforestation. This strategy depends on the use of vegetative propagation - an effective way to capture a genetic gain (Park and Bonga, 1992) and produce large amounts of plant material.

Therefore, vegetative propagation through somatic embryogenesis (SE) represents a valuable alternative for both breeding and mass propagation of wild as well as genetically improved plant material. These techniques can be used as alternatives to the conventional vegetative propagation methods (Gupta et al., 1991; Park et al., 1993).

Regeneration via SE is a process of embryo development from somatic cells. SE is a non-sexual process and refers to the process in which somatic cells are induced to form bipolar structures called somatic embryos. The process goes through series of developmental steps similar to zygotic embryogenesis. This process is analogous to zygotic embryogenesis, but one single cell or a small group of vegetative (somatic) cells are the precursors of the embryo (Ammirato, 1983).

SE is divided into several phases starting with formation of a proembryogenic mass, followed by somatic embryo maturation, desiccation, germination and plant regeneration. There are some main regulatory factors (phytohormones, osmotic stress and carbohydrates), which play important role during SE. The efficiency of every phase depends upon the previous ones.

Among the techniques of vegetative propagation, somatic embryogenesis seems to be the most promising for *Picea abies*. The knowledge of the morphogenic, histological and biochemical events that occur during SE, enables us to improve the efficiency of this process and to apply biotechnological methods in order to produce synthetic seeds.

This method is rarely used for the mass propagation of conifers, however. However, it is used for the propagation of *Pinus radiata* in New Zealand (Gleed et al., 1995) as well as for *Picea glauca* (Ellis et al., 1991) and *Pinus contorta* (Flygh et al., 1998).

The presented study focuses on dynamic range of growing embryogenetic cell lines of *Picea abies*. The goal of thesis is to determinate appropriate conditions during individual steps of somatic embryogenesis (initiation, proliferation, maturation, germination and conversion).

2. Úvod

Smrk ztepilý (*Picea abies*) patří ve střední Evropě k ekologicky a hospodářsky velmi významným jehličnanům. Na celém území ČR je zastoupen třemi ekotypy – vysokohorský, horský a pahorkatinný; vyskytuje se od 300-1500 m n.m. (Úřadníček a kol., 2001). Původní horské klimaxové porosty smrku ztepilého vymizely z mnoha oblastí v Evropě, především díky extenzivní těžbě dřeva a znehodnocení životního prostředí (imisní zátěže, změny hydrologických poměrů, atd.) Obnovení původního stavu je problematické, a to i z důvodu nedostatku sazenic odpovídajících ekotypů.

Reprodukční cyklus jehličnanů je relativně dlouhý, např. smrk ztepilý je schopen rozmnožování přibližně 20 let po výsadbě (Pâques a kol., 1995). Kromě délky reprodukčního cyklu je také nepříznivým faktorem malá četnost semenných roků, které nastávají jednou za 5 (resp. 5-8) let (Hakman a kol., 1990; Pâques a kol., 1995; Úřadníček a kol., 2001).

Vegetativní množení dospělých jehličnanů tradičními metodami není příliš úspěšné – řízků špatně zakořeňují, větve rostou plagiotropně a regenerace celistvých rostlin *in vitro* cestou organogeneze nebyla dosud příliš úspěšná (Nørgaard a Krogstrup, 1995).

Velké možnosti v množení lesních dřevin nabízí v současnosti somatická embryogeneze (SE). Jedná se o proces vzniku a vývoje embryí ze somatických buněk, s následným dopěstováním celistvé životaschopné rostliny. SE představuje alternativní způsob vegetativního množení rostlin. Tato metoda může významně přispět k úspěšnému uskutečnění zalesňovacích programů, ke zlepšení stavu lesních společenstev, usnadnit návrat ohrožených, vzácných genotypů zpět do původního prostředí i množení jedinců s vybranými vlastnostmi (kvalita a množství dřeva, rezistence vůči biotické a abiotické zátěži prostředí apod.) (Attree a Fowke, 1993). Hlavní předností SE, v porovnání se zygotickou embryogenezí, je možnost účelového manipulování s kultivačními podmínkami a získání velkého množství geneticky jednotného materiálu bez ohledu na roční období (Attree a Fowke, 1993). Jak uvádí Malá s Šímou (2000) v budoucnu velké možnosti pro využití biotechnologií v lesnictví představuje získávání transformovaných odrůd lesních stromů, které by měli např. zvýšenou schopnost v sobě akumulovat škodliviny (těžké kovy, PBC, radioaktivní látky apod.) z půdy (bioremediace).

Potenciálním biotechnologickým přínosem je nenákladná produkce velkého množství rostlin spojená s možností mechanizace procesu, i s možností dlouhodobého uchovávání kultur při nízkých teplotách (kryoprezervace) a produkci „umělých semen“ (Mullin a

Park, 1992; Attree a kol., 1994; Gupta a Grob, 1995). K hromadnému namnožení jehličnatých dřevin je možné použít i systém bioreaktoru. Použití bioreaktoru umožní v kontrolovaných podmínkách získat na litr tekutého média několik tisíc embryí (Pilate a kol., 2002).

SE představuje také jedinečný modelový systém pro studium nejrůznějších aspektů zárodečného vývoje rostlin, včetně faktorů řídících vývojové procesy spojené s embryogenezí (Hakman, 1993). Studium vývojových procesů a principů na nižší úrovni a jejich objasňováním se zabývá fyziologie, která slouží i jako základ evoluční ekologie. Studium rostlinné fyziologie a jejich principů napomáhá pochopit, proč k určitému procesu dochází s ohledem na ucelený systém vyššího stupně organizace. Možným nástrojem pro studium převážně vývojových principů na nižší úrovni je právě SE. Pomocí DNA čipů (microarray) jsou zkoumány geny regulující vývoj embryogeneze. Na SLU – Uppsala byly u *Picea abies* izolované a popsány některé homeotické geny (HBK2, HBK3 atd.) (Hjortswang a kol., 2002).

SE jehličnanů je stále předmětem výzkumu, ale i přesto se stále setkáváme s četnými komplikacemi, které neumožňují získat větší množství kvalitních somatických embryí. Nestabilita embryogenních kultur a redukce embryogenního potenciálu v časovém horizontu patří k častým problémům. Značná odlišnost v požadavcích na kultivační podmínky a genotypová odlišnost jehličnanů představuje větší nároky na individuální přístup k optimalizaci kultivačních protokolů. V tomto směru se často využívá srovnání mezi vývojem somatických a zygotických embryí. Schopnost somatických embryí vyvinout se v rostlinu lze částečně předpovědět na základě biochemické, fyziologické a morfologické podobnosti se zygotickými embryi (Flinn a kol, 1993).

Somatická embrya se v podmínkách *in vitro* vyvíjejí, na rozdíl od embryí zygotických, bez přítomnosti megagametofytu, jsou tedy závislá na kultivačních podmínkách. Odlišnost některých charakteristik somatických embryí tedy nemusí nutně představovat známku špatného průběhu vývoje somatických embryí (Lipavská a Konrádová, 2004). Hlavním cílem SE je efektivní produkce zdravých semenáčků adaptovaných na podmínky *ex vitro*, které budou svými vlastnostmi přispívat k utváření krajiny a budou hospodářsky zhodnotitelné.

3. Cíle disertační práce

Práce týkající se somatické embryogeneze se obvykle zaměřují dvěma hlavními směry. Na jedné straně je studován embryogenní potenciál jednotlivých genotypů a strukturální parametry vyvíjejících se somatických embryí. Druhým směrem je studium metabolických a dnes již také molekulárně biologických aspektů SE. Tato disertační práce se řadí do první kategorie, neboť se zabývá dynamikou růstu embryogenních linií *Picea abies* /L./ Karst.

Jako jedno z důležitých prvotních kritérií bylo, aby primární explantát byla zralá semena *Picea abies* volně dostupná v prodeji. Proces somatické embryogeneze je stále zdokonalován a studován, v lesnické praxi ale chybí práce, zabývající se komerčním využitím této metody i aplikací v praxi. Předmětem pokusů pak byla hlavní stádia SE: iniciace ESM, proliferace, maturace, desikace a germinace.

Stanovení vhodných kultivačních podmínek pro jednotlivé fáze SE u zralých semen *Picea abies* /L./ Karst. z rozdílných lokalit ČR:

- určit vhodné živné médium pro jednotlivé fáze SE
- určit vhodné růstové regulátory pro jednotlivé fáze SE
- stanovit vhodné rozmezí růstových regulátorů pro jednotlivé fáze SE

Ověření hypotéz:

- médium má signifikantní vliv na kultivaci *in vitro* kultur vzniklých ze zralých semen *Picea abies* v jednotlivých fázích SE (H1, H6, H11, H16)
- lokalita má signifikantní vliv v jednotlivých fázích SE na kultivaci *in vitro* kultur vzniklých ze zralých semen *Picea abies* (H2)
- genetické dispozice primárního explantátu mají signifikantní vliv pro kultivaci *in vitro*, resp. na jednotlivé fáze SE (H7, H12, H17)
- pro somatickou embryogenezi v praxi (studium i komerční propagaci) jsou vhodné jen některé genotypy (embryogenní linie) *Picea abies*

4. Literární přehled

4.1. Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze se řadí k nepohlavním (vegetativním) způsobům rozmnožování rostlin. Tento proces je založen na principu totipotence buňky, kdy bipolární buněčné struktury mohou teoreticky pocházet z jakékoli části rostlinného organismu. V laboratorních podmínkách se podařilo do současné doby navodit tvorbu a vývoj somatických embryí u celé řady rostlinných druhů.

Proces somatické embryogeneze rostlin poprvé popsali Reinert (1958) a Steward a kol. (1958) u mrkve (*Daucus carota*) koncem 50. let minulého století. SE jehličnanů byla poprvé zdokumentována u douglasky (*Pseudotsuga menziesii*) a postup množení pomocí mikropagace patentován (U.S. Pat. No. 4,217,730) (El-Nil a Mostary, 1980). Somatickou embryogenezi dalších jehličnanů se o několik let později zabývalo nezávisle několik výzkumných skupin: Hakman a von Arnold (1985), Chalupa (1985a) - tito autoři popsali somatickou embryogenezi ze zygotických embryí smrku ztepilého (*Picea abies*), současně pak Nagmani a Bonga (1985) popsali indukci haploidních embryí z megagametofytu modřínu opadavého (*Larix decidua*). Navození SE u nahosemenných rostlin, a zvláště u jehličnanů, je v porovnání s krytosemennými rostlinami mnohem obtížnější. Důvodem jsou značně odlišné a genotypově specifické požadavky jehličnanů na kultivační podmínky. V uplynulých letech se podařilo tento proces navodit a dovést do různých vývojových stádií u zástupců mnoha rodů jehličnanů (Lelu kol., 1993; Gupta a Grob, 1995; Stasolla a kol., 2002).

Somatická embryogeneze přináší následující možnosti:

- nenákladná produkce velkého množství rostlin v relativně krátkém čase (Gupta a Grob, 1995)
- mechanizace procesu s využitím suspenzních kultur, bioreaktorů (Gupta a Grob, 1995; Pilate a kol., 2002)
- dlouhodobé uchovávání kultur při nízkých teplotách (kryoprezervace) (Gupta a Grob, 1995)
- produkce „umělých“ semen – včetně využití technik genetické transformace nebo somatické hybridizace (Tautorus a kol., 1990; Gupta a Grob, 1995)
- genetické manipulace – možnost využití genového inženýrství, např. pomocí rodu *Agrobacterium* (Michler, 1991; Sabala, 1998)

- produkce viruprostých rostlin
- studium fyziologických a vývojových procesů (Egertsdotter, 1996; Sabala, 1998; Filonova a kol., 2000)
- selekce rostlin (kultur) na různé podmínky (zasolení, těžké kovy atd.)

Praktické využití této metody je velmi významné, a proto zvláště v posledních letech přibývají kultivační protokoly upravující proces SE různých druhů jehličnanů. Existuje mnoho vnějších faktorů, které SE jehličnanů navozují a dále ovlivňují. Mezi nejdůležitější z těchto faktorů patří růstové regulátory (Stasolla a kol., 2002) a sacharidy aplikované do média (Jain a kol., 1995). Působení těchto látek se může nejen druhově, ale také genotypově odlišovat.

Von Arnold a Hakman (1988) rozdělily SE jehličnanů do čtyř základních kroků. Dnes je tento proces rozfázován často do pěti a více kroků (von Arnold a kol., 2002):

- indukce tvorby embryonálně-suspenzorové hmoty (ESM)
- udržovací fáze
- někdy je řazena tzv. pre-maturační fáze (Taber a kol., 1998; Schuller a kol., 2000)
- zrání (maturace)
- desikace
- regenerace v rostliny schopné růst v podmínkách *ex vitro*

Základní kroky SE probíhají ve specifických kultivačních podmínkách a jejich konkrétní počet závisí na daném druhu (Roberts, 1991; Tremblay a Tremblay, 1991; Attree a Fowke, 1993; Gupta a Grob, 1995; Pâques a kol., 1995; von Arnold a kol., 1995; Fowke a Attree, 1996). Optimální průběh kroku předchozího se odráží v krocích následných a projevuje se na kvalitě i kvantitě výsledné produkce somatických embryí (Stasolla a kol., 2002). Výše zmíněné fáze somatické embryogeneze se na strukturální úrovni podobají zygotické embryogenezi (Tautorus a kol., 1991; Gupta a Grob, 1995). V minulých letech byla provedena základní charakterizace SE z anatomického (Svobodová a kol., 1999; Ulrychová, 2004) i biochemického hlediska (Lipavská a kol., 2000b; Konrádová a kol., 2002; Grigová 2003; Kubeš 2004).

4.2. Iniciace embryogenní kultury

Jedná se o odvození embryogenního pletiva (ESM - embryonal suspensor mass) z primárního explantátu na indukčním médiu. Cílem této fáze je indukce tvorby a dělení nediferencovaných rostlinných buněk, které tvoří embryogenní pletivo (hmotu). Hlavním cílem je, aby pletivo obsahovalo proembryogenní shluky buněk tzv. ESM – „zárodky“ budoucích somatických embryí. Průběh indukce je závislý na typu primárního explantátu a na kultivačních podmínkách.

4.2.1. Anatomie a morfologie

Strukturou somatických embryí a vnitřním uspořádáním ESM jehličnanů se zabývají četné práce (např. Hakman a kol., 1987; Hakman a von Arnold, 1988; Svobodová a kol., 1999; Filonova a kol., 2000). Somatická embrya jehličnanů se vyvíjejí z vysoce organizovaného morfogenetického systému (ESM) (Bozhkov, 1995).

Raná somatická embrya jsou tvořena dvěma hlavními výrazně odlišitelnými částmi – embryonálním meristémem a suspenzorem.

Embryonální meristém sestává z buněk s hustou cytoplazmou, které mají tenké buněčné stěny prostoupené plasmodesmami, velké centrálně umístěné jádro a obsahují drobné vakuoly. Množství organel je úměrné intenzivnímu metabolismu buněk (Hakman a kol., 1987).

V meristému je možno pozorovat četné předprofázové prstence mikrotubulů odpovídající mitotické aktivitě buněk. Aktinová filamenta vytvářejí hustou síť v kortikálních vrstvách cytoplazmy, odkud se táhnou směrem k jádru a obemykají je. Jsou-li buňky mnohojaderné, oddělují od sebe jednotlivá jádra (Fowke a Attree, 1996). Buňky na bázi meristému často vakuolizují a později se z nich stává suspensor. V některých případech může být meristemický pól velmi široký, což je typický stav předcházející rozpadu embrya při štěpné polyembryonii (Hakman a Fowke, 1987; Svobodová a kol., 1999).

Suspensor se zakládá z vakuolizujících buněk na bázi embryonálního meristému (Hakman a Fowke, 1987; Svobodová a kol., 1999). Suspensor je tvořen dlouhými vakuolizovanými buňkami s nástěnnou cytoplazmou. Plasmodesmy se vyskytují jen v koncových, nikoli však v laterálních buněčných stěnách. V distální části suspensoru je asociace volnější a buňky jeví známky senescence (Hakman a kol., 1987). Suspensorové

buňky obsahují silné provazce mikrofilament, jejichž podélná orientace odpovídá proudění cytoplasmu a vesikulárnímu transportu směřujícímu k meristému (Fowke a Attree, 1996). Mezi vakuolizovanými buňkami se občas vyskytují drobné cytoplazmatické buňky, z nichž mohou vznikat adventivní embrya (Hakman a kol., 1987).

4.2.2. Kultivace

Jako primární explantáty jsou nejvhodnější ontogeneticky mladé části rostliny, například nezralá či zralá zygotická embrya, dělohy, hypokotyly mladých semenáčků, výjimečně jehlice nebo samičí gametofyt (Gupta a Grob, 1995). Výběr výchozího materiálu často závisí na rostlinném druhu. Například indukce embryogenní kultury borovice přímořské (*Pinus pinaster*) byla úspěšnější, jestliže byla jako primární explantát použita zygotická embrya s vytvořenými základy děloh. V případě indukce tvorby ESM u borovice lesní (*Pinus sylvestris*) se naopak osvědčila raná zygotická embrya (Lelu a kol., 1999).

Použití nezralých zygotických embryí *Picea abies* popisuje Chalupa (1985a) v jedné ze svých prvních prací. Embryogenní pletivo se objevilo po 5-6 týdnech kultivace na médiu MS (Murashige a Skoog, 1962) z 52-96 % založených kultur. Sběr nezralých šišek, jak uvádí Chalupa (1997), je optimální od druhé poloviny července do poloviny srpna.

Hakman a kol. (1985) rovněž použili ve svých pokusech nezralá zygotická embrya *Picea abies*. Toto pletivo pak bylo udržováno pasážováním a kultivací v tekutém médiu po dobu 6 měsíců. Pletivo obsahovalo polarizované a organizované struktury, které silně připomínaly časně fáze zygotických embryí.

Několik studií (Cheliak a Klimaszweska, 1991; Park a kol., 1993; Kvaalen a kol., 2001) poukazuje na to, že indukce ESM ze zralých zygotických embryí je velmi ovlivněna genetickou dispozicí. Při srovnání embryogenní schopnosti zralých a nezralých zygotických embryí je patrné, že embryogenní potenciál zralých semen vykazuje značnou variabilitu. Indukci embryogenního pletiva ze zralých embryí popisuje např. Gupta a Durzan (1986). Embrya byla vyjmuta po 24 hodinách nabobtnání, ale pouze 5-6 % embryí tvořilo pletivo. Krogstrup (1986) ve své práci uvádí indukci embryogenního pletiva ze zralých zygotických embryí a děloh sedmi denních semenáčků. Pro pokus byla použita rovněž nabobtnalá semena. Jako živné médium bylo použito médium MS s různou koncentrací růstových regulátorů 2,4-D (2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina), BA (N⁶-benzyladenin) a kinetinu.

O indukci embryogenní kultury ze zralých zygotických embryí se nezávisle zmiňuje několik skupin: von Arnold a Hakman (1986), Gupta a Durzan (1986), Krogstrup (1986) a Boulay a kol. (1988). Jain a kol. (1988) uvádí 55 % úspěšnost v iniciaci kalusů na LP médiu (von Arnold a Eriksson, 1981). Jako primární explantát byla použita zralá semena *Picea abies*. Iniciace růstu kalusu byla sledována po 2-3 týdnech kultivace a to z konce nebo středu hypokotylu primárního explantátu. Kalus autoři rozdělili do několika skupin: 1/ globulární; 2/ světle zelený-kompaktní; 3/ bílý-mucilagenní. Pouze kalus který byl bílý-mucilagenní (typ 3) byl embryogenní. Autoři uvádí, že globulární a světlezelené pletivo se tvořilo ze 40 % a 46 %. Bílé mucilagenní pletivo se pak podle autorů tvořilo ze 32 %.

Pro vyvolání příslušných indukčních změn vedoucích k tvorbě embryogenní kultury u *Picea abies* je zpravidla nutná kombinace auxinů a cytokininů (Von Arnold a kol., 1995).

Variabilní koncentrace růstových regulátorů popisuje Chalupa (1997). Nejvhodnější kombinací je podle tohoto autora 2,4-D a NAA (kyselina α -naftyloctová). Bellarosa a kol. (1992) popisuje vliv fytohormonů 2,4-D (2 mg.l^{-1}) a BAP (N^6 -benzylaminopurin; 1 mg.l^{-1}) v živném médiu na embryogenní kultury a jejich další vývoj. Jak autor uvádí, embrya ztrácela strukturu, pokud byla v médiu přítomna pouze 2,4-D. Při přítomnosti pouze BAP embrya extrémně rostla a vytvořila velkou embryogenní plochu. Jokinen a Durzan (1994) popisují typy embryogenních kultur podle podílu ESM a uvádí, že nevhodné kultivační podmínky (např. vysoká dávka 2,4-D, nevhodná doba subkultivace, osvětlení) mohou vést k vyšší produkci neembryogenního pletiva.

Při kultivaci embryogenního pletiva dochází k nízké produkci ethylenu, která se při nepřítomnosti 2,4-D v médiu může zvýšit až trojnásobně. Naopak 2,4-D bez přítomnosti BAP omezuje výrazně rychlost množení kultury (Kvaalen, 1994).

Krogstrup (1986) uvádí, že přípravek L-glutamin zlepšuje množení buněk embryogenního pletiva. Po přenesení pletiva na další média dochází k formování bipolárních struktur, které připomínají raná stadia zygotických embryí.

Vliv měnících se koncentrací sacharózy a formy dusíku na embryogenní kultury popisuje von Arnold (1987). Autorka uvádí, že na plném médiu LP je vhodnější nižší koncentrace sacharózy ($3 \text{ }\mu\text{M}$). Von Arnold a Hakman (1986) v jiné práci zkoumali vliv různých koncentrací sacharózy na indukci pletiva z nezralých embryí. Po pěti týdnech od počátku kultivace bylo možno rozlišit tři typy pletiva: 1/ typ pletiva tvořil adventivní pupeny

podobné těm, které se tvoří na zralých embryích po použití cytokininů; 2/ typ vytvářel stejnorodé kulaté buňky; 3/ typ bylo embryogenní pletivo s polarizovanými organizovanými strukturami.

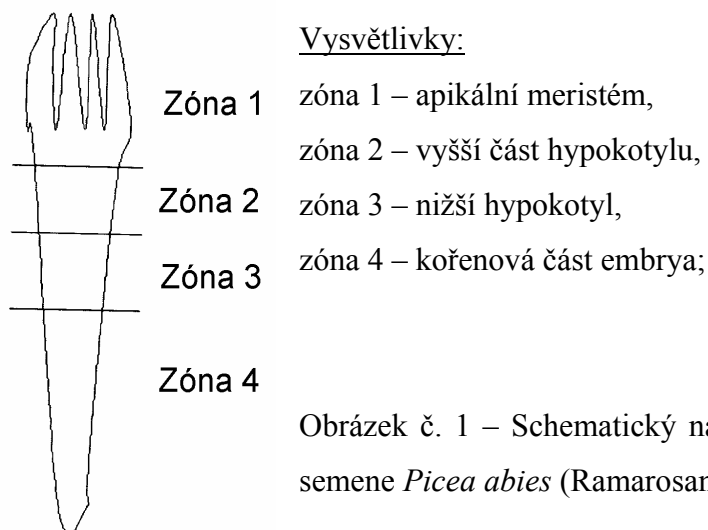
V současné době někteří autoři uvádějí, že embryogenní pletivo smrku lze získat i na médiu bez přídavku auxinů a cytokininů, zato za přítomnosti Nod faktoru (Dyachok a kol. 2000). Pozitivní vliv na tvorbu embryogenního pletiva a indukci tvorby časných embryí má kromě Nod faktoru také přítomnost některých enzymů (např. chitinázy) obsažených v extraktu ze semen. Lipochitooligosacharidy (LCO) jsou skupinou signálních molekul, které podporují dělení rostlinných buněk. LCO signály (Nod faktory), které vylučuje *Rhizobium*, indukují buněčné dělení v kořenové kůře což vede k formování nodulů, které mohou být následně kolonizovány (Spaink a kol., 1991; Truchet a kol., 1991). Nod faktory podporují vývoj větší proembryogenní hmoty (PEMs - proembryogenic masses) z malých shluků buněk *Picea abies* (Egertsdotter a von Arnold, 1998; Dyachok a kol., 2000).

Podrobnější studie naznačily, že Nod faktory mohou nahradit auxiny a cytokininy v podpoře dělení embryogenních buněk. Nod faktory byly nalezeny jako endogenní LCO složky v kondiciovaných médiích připravených z embryogenních kultur *Picea abies*. Částečně purifikovaná frakce LCO stimulovala formování proembryogenní hmoty a somatických embryí u *Picea abies* (Dyachok a kol., 2000). Jak u mrkve tak u smrku mohou Nod faktory nahradit chitinázy v jejich účinku na vývoj raných somatických embryí (De Jong a kol., 1993; Egertsdotter a von Arnold, 1998).

Možnost použití explantátů je dána i genetickými faktory. Produkce embryogenního pletiva je možná často jen u určitého procenta explantátů. Högberg a kol. (1998) uvádí jednu třetinu genotypů *Picea abies* jako vhodnou pro získání embryogenního pletiva. V jejich experimentech však nebyla nalezena žádná závislost mezi schopností embryogeneze a některou z dalších růstových a produkčních vlastností, nebo fenologických charakteristik.

Ramarosandrata a Staden (2003) uvádí, že signifikantní pro iniciaci ESM je právě ta část embrya, která je vložena na kultivační médium. Zygotické embryo autoři rozdělili na několik částí a určovali schopnost vzniklých pletiv aktivovat ESM. Vyšší část hypokotylu (zóna 2) a přilehlé části autoři považují za nejvíce embryogenní část ze zygotického

embrya. Nižší hypokotyl (zóna 3) a apikální meristém (zóna 1) mohou také vytvářet ESM. Zóna 4 (kořenová část embrya) nemá embryogenní schopnost. Frekvence embryogenity ze 1. a 3. zóny byla 0,6 %, z 1. a 2. zóny 7 % a schopnost embrya produkovat ESM ze zóny 2. a 3. dosahovala až 16 %.



Obrázek č. 1 – Schematický náčrt jednotlivých zón u zralého semene *Picea abies* (Ramarosandrata a Staden, 2003);

4.2.3. Zásobní látky

Zygotická embrya vyvíjející se v semeni akumulují během zrání zásobní látky. Zásobní látky slouží především jako zdroj energie a stavebních prvků pro kultivaci *in vitro* (ze zralých semen) nebo slouží jako metabolický zdroj během klíčení, kdy jsou pletiva ještě heterotrofní. Významnou podporou je jim zároveň samičí gametofyt, který v semeni jehličnanů představuje hlavní zásobní orgán.

Rostliny využívají tři hlavní skupiny zásobních látek: polysacharidy (především škrob), lipidy (především triacylglyceroly) a zásobní proteiny. Hlavními zásobními látkami v semenech jehličnanů jsou lipidy, které mohou tvořit až 50 % čerstvé hmotnosti zralých zygotických embryí (Feirer a kol., 1989).

Porovnání somatických a zygotických embryí se výrazně liší v množství zásobních látek. Somatická embrya obsahují podstatně více škrobu, ale méně lipidů a proteinů. Somatická embrya *Picea abies* obsahovala méně triacylglycerolů než embrya zygotická, což bylo pravděpodobným důvodem špatného klíčení (Feirer a kol., 1989). U somatických embryí *Picea glauca* byl oproti zygotickým embryím obsah zásobních lipidů snížen na 1/6, zásobních proteinů na 1/3 a navíc chyběly některé proteinové frakce (Joy a kol., 1991). Obsah škrobu v ranných fázích SE u *Picea glauca* zkoumal Joy a kol. (1991). Škrob byl přítomen v somatických embryích u *Picea glauca* (Joy a kol., 1991) stejně jako u *Picea*

abies (Lipavská a kol., 2000a) v suspenzorových buňkách v podobě malých škrobových zrn.

Velice důležitou úlohu v minerální výživě rostlinných buněk hraje fytát (kyselina fytová). Je to nejrozšířenější inositolfosfát na Zemi (Strunecká, 2005) a je hlavní formou zásobního fosforu v semenech rostlin. Představuje 50-85 % fosforu v semenech obilovin, olejnin a luštěnin (Irvine, 2005). Jedná se o plně fosforylovaný ester myo-inositolu a kyseliny fosforečné (myo-inositolhexafosfát, IP6) (Raboy, 2003). Fytát tak představuje zásobní formu nejen fosforu, ale i dalších minerálních živin. V semenech se fytát koncentruje především v tzv. globoidech, které jsou součástí bílkovinných tělísek. Globoidy se vyskytují v celém samičím gametofytu, v základním meristému a prokambiu zygotických i somatických embryí. Vedle globoidů je možno rozlišit ještě tzv. železem bohaté částice (iron-rich particles), jejichž základem je také fytát. Tyto částice, narozdíl od globoidů, mají vysoký obsah železa, zatímco množství ostatních kationtů (K^+ , Mg^{2+}) je snižené. Od globoidů se liší také tím, že jsou součástí proplastidů a kromě samičího gametofytu, resp. základního meristému a prokambia, byly lokalizovány i v protodermu embryí (Reid a kol., 1999b).

Autoři Reid a kol. (1999a) stanovili obsah minerálních živin v somatických embryích a v semenech *Picea glauca*. Bylo zjištěno, že samičí gametofyt obsahuje naprostou většinu fosforu (a jeho zásobní formy – fytátu), hořčíku a železa z jejich celkového obsahu v semeni, zatímco vápník je velmi významně zastoupen především v semenných obalech. Draslík a zinek jsou pak v semeni distribuovány rovnoměrněji. Somatická embrya, vztaženo k hmotnosti sušiny, měla při bližším zkoumání nižší obsah všech jmenovaných minerálních prvků (s výjimkou vápníku) v porovnání s embryi zygotickými. Nižšímu obsahu minerálních prvků pak odpovídají i menší globoidy a železem bohaté částice (Reid a kol., 1999b). Autoři dále zmiňují, že v embryích tvoří fosfor vázaný ve fytátu podstatně menší díl celkového fosforu. Množství fytátu v embryích není tedy limitováno nízkou koncentrací myo-inositolu (prekursoru fytátu) v médiu, jelikož jeho vynechání z média obsah fytátu v embryích neovlivňuje. Exogenní myo-inositol může sice sloužit jako zdroj uhlíkového skeletu pro biosyntézu fytátu, v jeho nepřítomnosti však buňka zajistí tvorbu molekuly z jiného sacharidu (Reid a kol., 1999a).

4.3. Udržování (proliferace) embryogenní kultury

Založenou embryogenní kulturu je třeba udržovat při životě s maximální snahou o zachování embryogenního potenciálu a růstových vlastností. Udržování a množení ESM většinou probíhá na médiu se stejným nebo obdobným složením růstových regulátorů jako při indukci. Koncentrace růstových regulátorů bývá stejná (Guevin a kol., 1994; Guevin a Kirby, 1997) nebo nižší (Nørgaard a Krogstrup, 1991). Bozhkov (1995) ve své práci uvádí, že existuje závislost kvality kultivovaných linií embryogenního pletiva na kultivačním médiu.

4.3.1. Anatomie a morfologie

Embryogenní kultury smrku se mohou projevovat ve stejných indukčních a proliferačních podmínkách různou morfologií a vnitřní strukturou. Tento jev je pravděpodobně genotypově specifický, což se následně projeví rozdíly v maturačním potenciálu kultury. Poprvé tento aspekt somatické embryogeneze jehličnanů popsali Jalonen a von Arnold (1991) u *Picea abies*. Na základě morfologické stavby raných somatických embryí v ESM rozlišili dvě morfologické skupiny, i když později se ukázalo, že mohou existovat i typy přechodné (Egertsdotter a kol., 1993):

- 1) A1 – polární somatická embrya; mají zřetelnou meristematickou hlavičku, jejíž buňky k sobě těsně přiléhají. K hlavičce je přichycen suspensor, takže celý útvar je bipolární.

A2 – solární somatická embrya; narozdíl od skupiny A1 vykazují radiální symetrii. Vzhledem k tomu, že skupina A1 a A2 mohou vzájemně přecházet z jedné struktury do druhé, řadíme je obě do jedné hlavní skupiny A. Bylo zjištěno, že polární embrya se vyskytují především v pomaleji rostoucích kulturách, zatímco solární embrya v rychle rostoucích a v suspenzních kulturách. Kultury typu A vytvářejí v tekutém médiu shluky (Egertsdotter a von Arnold, 1995).

- 2) B – nevyvinutá somatická embrya; jsou bipolární, meristematická hlavička sestává jen z několika volně nahloučených buněk a není zřetelně oddělena od suspensoru. Kromě toho se v ESM typu B nacházejí samostatné vakuolizované buňky (kulovité i protáhlé) nebo jejich shluky. V tekutém médiu nedochází k agregaci embryí (Egertsdotter a von Arnold, 1995).

4.3.2. Kultivace

Kultivace v této fázi je možná na pevných i tekutých živných médiích. Použití kapalného média umožňuje přesněji určit rychlosti množení buněk a lepší přístup živin k jednotlivým buňkám, nicméně stoupá riziko kontaminace. Nutnost provzdušňování vyžaduje použití třepacího zařízení nebo rolleru. Nevýhodou kultivace suspenzní kultury je problém s menší fenotypovou stabilitou materiálu.

Pevná média snižují možnost kontaminace a značně technicky zjednodušují kultivaci. Jako jedno z prvních pevných živných médií bylo použito pro *Picea abies* LP médium a médium 59 (von Arnold a Hakman, 1986). Média byla obohacena růstovými regulátory 2,4-D (10 μ M) a BAP (5 μ M). Velmi úspěšnou kultivaci *Picea abies* na pevném živném médiu v této fázi uvádějí autoři Vágner a kol. (1998). Na médiu se zvětšovala čerstvá hmota po 7 dnech 3,2-4,8x a během 13 měsíců nebylo zaznamenáno snížení rychlosti nárůstu (Vágner a kol., 1998). V jejich pokusu bylo použito médium GD (Gupta a Durzan 1986) obohacené o 2,4-D (5 μ M), kinetin (2 μ M) a BAP (2 μ M).

Z proliferující embryogenní hmoty, kultivované na pevném živném médiu, je možné připravit také suspenzní kulturu (vynecháním zpevňující složky). Kultivace na suspenzním médiu je podle mnohých autorů ekonomičtější (Pilate a kol., 2002). Vysoká frekvence iniciace embryogenních kultur, s následnou produkcí embryí, byla dosažena Chalupou (1997). V tomto pokusu bylo embryogenní pletivo po iniciaci na pevném médiu převedeno a úspěšně množeno v suspenzní kultuře na médiu tekutém.

4.3.3. Zásobní látky

Někteří autoři poukazují na významnou úlohu dusíku v proliferačním médiu. Nørgaard a Krogstrup (1991) u explantátových kultur jedle kavkazské (*Abies nordmanniana*) uvádí, že v ESM postupně klesá zastoupení raných somatických embryí a naopak stoupá procento samostatných suspenzorových buněk. Tento nepříznivý vývoj je možno do určité míry zvrátit modifikací kultivačních podmínek. Pozitivní vliv mají např. organické zdroje dusíku (L-glutamin, kasein hydrolyzát) jako doplněk proliferačního média. Po doplnění dusíku do média kultury obnovují původní uspořádání ESM a navyšují růstovou rychlost, a to až o 30 %. Zpracování organického dusíku je totiž energeticky méně náročné než asimilace anorganických forem. Ušetřená energie tak může být investována do dělení a růstu buněk (Nørgaard a Krogstrup, 1991).

Vliv měnících se koncentrací sacharózy (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 g.l⁻¹) a formy dusíku na embryogenní kultury popisuje von Arnold již v roce 1987. Autorka uvádí, že na plném médiu LP obohaceném o 2,4-D (10 µM) a BAP (5 µM) se ukázala jako vhodnější nižší koncentrace sacharózy (3 µM).

Detailní studii sacharidového metabolismu u embryogenní kultury smrku černého (*Picea mariana*) a smrku sivého (*Picea glauca*) provedli Iraqi a Tremblay (2001a). Autoři uvádějí, že během proliferace kultur na médiu s 1 % sacharózou zůstávala endogenní hladina sacharózy na počátku subkultivačního intervalu konstantní, ale později se v polovině čtrnácti denní udržovací periody objevil vyšší obsah hexóz. Současně aktivita invertáz a sacharózafosfátsyntázy (SPS) dosáhla mezi pátým až sedmým dnem vrcholu, zatímco aktivita sacharózasyntázy (SuSy) a hladina sacharózy zůstaly během celé periody nezměněné. Autoři uvádí, že během této fáze invertázy generují hexózy pro zajištění růstu a vývoje embryogenní kultury, zatímco SuSy a SPS umožňují udržet stabilní hladiny sacharózy. Tyto výsledky korespondují s výsledky získanými u embryogenních kultur *Picea abies* (Lipavská a kol., 2000b; Konrádová a kol., 2002). I vzhledem k rozdílným udržovacím podmínkám (týdenní subkultivační interval, médium obsahující 3 % sacharózu) byla na konci udržovací periody zjištěna vysoká aktivita invertáz a nízká aktivita SuSy, přičemž endogenní hladina sacharidů byla charakteristická vysokým obsahem hexóz a téměř nepřítomnou sacharózou.

4.3.4. Stabilita embryogenních kultur a kryoprezervace

Embryogenní kultury jehličnanů jsou považovány vesměs za stabilní. Udržování embryogenní kultury po dlouhou dobu může vést k redukci embryogenního potenciálu a k anatomicko-morfologickým změnám způsobeným somaklonální variabilitou (Gupta a Grob, 1995). Některé embryogenní linie jehličnanů jsou stabilní po mnoho let, zatímco jiné ztrácejí embryogenní potenciál již po několika měsících kultivace na proliferačním médiu (Mo a von Arnold, 1991; Högberg a kol., 1998). Především dlouhodobé působení některých složek proliferačního média (např. 2,4-D) může mít vliv na embryogenní potenciál kultury (Tautorus a kol., 1991; Gupta a Grob, 1995). Jako řešení se nabízí např. optimalizace kultivačního protokolu s ohledem na použitý rostlinný druh nebo použití metody kryoprezervace.

Kryoprezervace skýtá možnost, jak uchovat embryogenní kulturu po dlouhou dobu. Při kryoprezervaci je embryogenní kultura zamrzána (aniž by došlo k narušení životaschopnosti kultury) a uchovávána při nízkých teplotách, obvykle při teplotě bodu varu tekutého dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). V buňkách rostlin jsou při této teplotě veškeré procesy téměř zastaveny, a tím lze buňky uchovat po téměř neomezeně dlouhou dobu.

Existují dvě základní metody kryoprezervace - klasická a vitrifikační.

Klasická metoda spočívá v řízeném mrznutí vzorků, kdy dochází k extracelulární tvorbě ledových krystalů a vymrzání vody z pletiv.

Vitrifikační metoda je založena na tvorbě skla, tedy amorfní pevné hmoty, které umožňuje překonání ultranízkých teplot bez poškození vzorků.

Nejčastěji se pro kryoprezervaci používají dva mrazicí systémy. Kryotrubice (cryotubes), které se vkládají do kryoboxu (Mr. Frosty, Nalgene). Ten se posléze naplní isopropanolem a nechá se zamrazit v laboratorním zamrazovači nebo zamrazovacím boxu (Glacies, Sky-lab). Po prvotním zamrazení jsou kryotrubice vloženy do tekutého dusíku. Teplota je po celou dobu monitorována termometrem umístěným v kryotrubici (Vágner a kol., 2005a).

Při vyjímání kryotrubic z tekutého dusíku se nejprve celá kryotrubice ponoří do sterilní vody ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$ /cca 1 min), kdy roztaje náplň. Poté se opět celá trubice ponoří do sterilní vody ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) na dobu několika minut. Po sterilizaci náplně kryotrubic (70 % ethanol) se kultury umístí na proliferační médium do Petriho misek. Po sterilizaci v ethanolu se kultury obvykle umístí na filtrační papír, z důvodu snazší manipulace s kultivačním materiálem. Kultury jsou přenášeny na čerstvé médium každý den. Filtrační papír je odstraněn po aktivaci kultur – po opětovné proliferaci ESM, která obvykle nastane již po jednom týdnu od zamrazení kultur (Vágner a kol., 2005a).

Kryoprezervace je velmi důležitá pro uchovávání ESM jehličnanů, a to jak z hlediska uchování nekontaminovaných kultur, zachování embryogenní kapacity, tak i z důvodů ekonomických. Dlouhodobá kultivace v *in vitro* podmínkách je ekonomicky náročná, vzhledem k finančním nákladům na vybavení laboratoří, chemikálií pro přípravu optimálních kultivačních podmínek a školený personál.

Dlouhodobá kultivace je pak pro některé druhy nezbytná, např. pro transformované jedince cypřišku tupolistého (*Chamaecyparis obtusa*). Transformované rostliny obsahují určitý kvalitativní znak - pylová zrna, která nepůsobí těžké alergie (Maruyama a kol., 2005). Tento znak se nemůže projevit hned, ale až po mnoha letech kultivace. Kryoprezervace v podobných případech skýtá možnost uchování vzorků, jakožto náhradní variantu za dlouhodobou kultivaci, po kterou by musela být jinak ESM kultivována. Tato alternativa má oproti pravidelným subkultivacím význam hlavně pro uchování vegetativně množených druhů, u kterých lze rostliny z uchovaných pletiv dobře regenerovat.

Výhodou kryoprezervace je především relativně vysoká bezpečnost uchování vzorků po delší dobu, malá náročnost na prostor a údržbu během uchovávání a nízké udržovací náklady oproti pěstování rostlin v polních podmínkách nebo v kulturách *in vitro*.

Pro embryogenní kultury několika druhů jehličnanů byla tato metoda úspěšně využita. ESM jehličnanů jsou pro tento účel obzvláště vhodné, protože obsahují meristematické buňky s vysokým podílem sušiny na čerstvé hmotnosti. Zmrazení v tekutém dusíku, jemuž předchází specifická ošetření kultury, přežije pouze malé procento meristematických buněk v embryonální hlavičce. Z nich ovšem mohou regenerovat celistvá embrya (Nørgaard a kol., 1993). Z embryogenních kultur je posléze možné vypěstovat rostliny, které vykazují normální růst (Gupta a Grob, 1995; von Arnold a kol., 1995; Högborg a kol., 1998). Bercetche a kol. (1990) uvádí, že zamrazení kultur v tekutém dusíku zvyšuje embryogenní schopnost.

Rozdílné embryogenní linie snáší zamrazení rozdílně, bližší vztah mezi kryotolerancí (schopnost snášet nízké teploty) a morfologickým uspořádáním embryogenních kultur však dosud není znám (Nørgaard a kol., 1993b).

Již v roce 1987 publikoval Gupta a kol. práci o úspěšném zvládnutí kryoprezervace druhu *Picea abies*. Find a kol. (1998) se ve své práci zabývali kryotolerancí, optimální hustotou buněčných kultur (SCV - sedimented cell volume) u *Picea abies* používaných ke kryoprezervaci a následnou regeneraci kultur po zamrazení. Maximální tolerance k zamrazení kultur byla podle autorů zjištěna 7 dní po ukončení zrání na maturačním médiu. Nezbytnou podmínkou jsou dobře vyvinutá - formovaná embrya a optimální hustota SCV. Embrya, která měnila barvu ze světle nažloutlé-bílé na bílo-hnědou

v posledním týdnu kultivace byla méně tolerantní k zamražení. Optimální hustota kultur před zamražením byla stanovena u *Picea abies* stejně jako u smrku sitky (*Picea sitchensis*) na 50 % (v/v). Autoři dále uvádí, že regenerace kultur po zamražení byla vyšší u *Picea sitchensis* než u *Picea abies*.

Na příkladu *Abies nordmanniana* bylo zjištěno, že existují značné rozdíly v kryotoleranci mezi jednotlivými genotypy. Linie s dobrou regenerační schopností přežívají zmrazení nejlépe (Nørgaard a kol., 1993a).

Úspěšnou kryoprezervaci dále popisuje u borovice montereyské (*Pinus radiata*) Hargreaves a kol. (2004). Po dobu 7, 14 a 28 dní byly testovány embryonální dělohy u 72 genotypů. 79-87 % zamrazeného materiálu produkovalo po ukončení kryoprezervace prýty alespoň v jednom ze tří druhů ošetření a 59 % produkovalo prýty ve všech druzích ošetření.

Vágner a kol. (2005a) uvádí, že není pochyb o tom, že kryoprezervace působí na kultury velkým selekčním tlakem, a že pravděpodobně může měnit i jejich embryogenní potenciál.

4.4. Zrání (maturace) somatických embryí

Během této fáze embryo mění svou strukturu, roste a hromadí zásobní látky. Fáze zrání vyžaduje změnu kultivačních podmínek, a to především vynechání růstových regulátorů použitých při indukci a proliferaci. U jehličnanů je maturace významně podpořena aplikací kyseliny abscisové (ABA) (Bozhkov a kol., 1992; Lulsdorf a kol., 1992; Vágner a kol., 1998; von Arnold a Hakman, 1998) a snížením osmotického potenciálu média, na kterém kultivace probíhá, případně použití média bez růstových regulátorů (Tremblay, 1990).

Maturace je jednou z nejobtížnějších fází SE. Znalosti morfologie a anatomie embryogenní kultury, znalosti dynamiky ukládání zásobních látek v embryích a také informace o působení jednotlivých složek kultivačních médií na růst a vývoj embryogenní kultury mohou pomoci rozeznat schopnost embryogenní kultury optimálně se vyvíjet.

4.4.1. Anatomie

Maturační potenciál embryogenních kultur smrku je značně ovlivněn genotypem. Jalonen a von Arnold (1991) se zaměřili na studium maturační schopnosti různých linií smrku ztepilého. Na základě morfologické stavby raných somatických embryí v ESM byly rozlišeny embryogenní kultury typu A (1 a 2) a B (Egertsdotter a kol., 1993), viz. kap. 4.3.1. Rozdíly ve schopnosti uvedených typů kultur úspěšně projít maturační fází v přítomnosti ABA jsou značné. Jak uvádí autoři Jalonen a von Arnold (1991), plně vyvinutá zralá embrya vytváří pouze typ A1, embrya typu A2 sice zrají, ale předčasně klíčí. Kultury typu B nejsou schopny tvorby plně vyvinutých embryí. Na médiu s ABA vznikají pouze noduly, které hnědnou, kalusovají nebo vytváří kořeny. Noduly s touto anatomickou stavbou nemohou regenerovat v rostliny. V horším případě kultura na působení ABA vůbec nereaguje.

Jedno z možných vysvětlení je, že embrya typu B jsou fyziologicky zablokována ve velmi raných fázích vývoje, kdy ještě nejsou fyziologicky připravena reagovat na signální působení ABA (Jalonen a von Arnold, 1991). Analogická situace se vyskytuje ještě v podobném systému: Filonova a kol. (2000) uvádí, že raná somatická embrya *Picea abies* se tvoří z tzv. proembryonální hmoty (PEM – proembryonal mass), která se skládá z méně vyvinutých útvarů. PEM jako taková není schopna dostatečně odpovědět na působení ABA, protože se nachází ve velmi raném vývojovém stádiu. Citlivost vůči ABA se objevuje až u dobře vyvinutých raných somatických embryí, jejichž intenzivnější tvorbu je možno stimulovat přechodnou kultivací PEM na médiu bez růstových regulátorů (Bozhkov a kol., 2002a).

Rozdíly v anatomii a maturačním potenciálu linií jsou pravděpodobně podmíněny biochemickými ději uvnitř kultury. Záměrnými manipulacemi je totiž možné navodit změnu typu B na typ A, ne naopak. Egertsdotter a kol. (1993) zjistili, že oba typy kultur uvolňují specifické extracelulární proteiny. Pokud byly proteiny produkované linií typu A přidány ke kultuře typu B, embrya typu B se vyvinula lépe, a měla větší meristematické hlavičky, čímž se připodobnila typu A. Egertsdotter a von Arnold (1995; 1998) popisují možnost trvale změnit charakter linie typu B pomocí proteinových extraktů ze semen. Po aplikaci proteinů na médiu s ABA vznikla zralá somatická embrya. Podrobná analýza odhalila, že kultura typu A uvolňuje 5x více specifických glykoproteinů než kultura typu

B. Obě linie produkují proteiny specifické jen pro daný typ (Egertsdotter a kol., 1993; Egertsdotter a von Arnold, 1995).

Autoři dále uvádějí, že aktivním agens navozující změnu morfologie a obnovu maturačního potenciálu u linií typu B mohou být zmiňované glykoproteiny. Jejich sacharidovou složkou jsou totiž arabinogalaktany, které mohou reagovat se složkami buněčné stěny, a tak zlepšovat soudržnost embryonálního pletiva (Egertsdotter a von Arnold, 1995). Egertsdotter a von Arnold (1998) dále popisují, že některé frakce ze semenných extraktů linií typu A obsahují protilátku proti chitináze. Chitinázy nebo Nod-faktor podporují tedy vznik raných embryí ze shluků meristematických buněk v kultuře typu B. Vystává hypotéza, že stimulační agens má charakter chitinázy a štěpením blíže neurčeného substrátu (obdobně jako to dělají Nod-faktory) zajišťuje produkci oligosacharidů. Oligosacharidy by pak byly tím signálem, který spouští příslušné morfogenetické procesy.

4.4.2. Morfologie

Během zrání somatických embryí dochází k zastavení proliferace, embrya zvětšují svoji velikost, zakládají se typické struktury nezbytné pro další vývoj. Zrající somatická embrya jehličnanů je možno na základě jejich morfologie rozdělit do kategorií podle dosaženého stupně vývoje. Jednu z prvních a zároveň nejpoužívanějších klasifikací vytvořily von Arnold a Hakman (1988):

Stádium 1 – embrya založená v ESM: meristematická hlavička je tvořena malými buňkami s hustou cytoplazmou; hlavička je spojena se suspenzorem tvořeným vakuolizovanými buňkami; stádium typické pro embrya v proliferační kultuře a na počátku zrání.

Stádium 2 – embrya mají zvětšenou meristematickou část, která již vyčnívá nad povrch ESM; stále je přítomen suspensor; stádium 2 dosahují embrya po přenosu na maturační médium.

Stádium 3 – u embryí se vyvíjí dělohy; embrya na konci tohoto stádium jsou podobná zralým zygotickým embryím.

Stádium 4 – zelené rostliny.

V současnosti jsou již známy i jiné klasifikační systémy morfologie embryí (Flinn a kol., 1991; Schuller a kol., 2000), které však nejsou obecněji používány. Přehled vývoje vnitřní struktury zrajících somatických embryí embryogenní kultury *Picea abies* genotypové linie AFO 541 (označení linie embryogenní kultury smrku ztepilého) vytvořili Svobodová a kol. (1999). Vývojová stadia somatických embryí byla rozdělena následujícím způsobem:

První týden zrání na maturačním médiu: základní architektura embryí je podobná raným somatickým embryím na proliferačním médiu. Globulární meristematické oblasti buněk jsou stále připojeny k suspenzorovým buňkám, ale buňky na bazálním pólu meristematické oblasti začínají vakuolizovat. Apikální oblast s meristematickými buňkami s hustou cytoplazmou prodělává časté dělení. Hovoříme o stádiu raného somatického embrya.

Druhý týden zrání: embrya jsou v cylindrickém stádiu vývoje. Počátek histodiferenciace je spojen s tvorbou protodermu. Nad povrch zbytkové hmoty vystupují jasně rozeznatelná embrya. Meristematické buňky na bazálním pólu pokračují ve své vakuolizaci a suspenzorové buňky jsou stále přítomny.

Třetí týden zrání: pokračuje diferenciaci vnitřní struktury embryí. Na bazálním pólu se objevuje kořenová čepička s dobře vyvinutou kolumelou. Vnitřní histodiferenciace dále pokračuje, ve střední části embrya jsou patrné základy prokambia. Toto stádium se označuje jako prekotyledonární.

Čtvrtý týden zrání: během čtvrtého týdne zrání se kořenová čepička stává více zřetelnou a formující se suspenzor odumírá a zůstává připojen k vlastnímu embryu v podobě shluku vitrifikovaných buněk.

Pátý týden zrání: toto období je charakteristické počínajícím růstem děloh. Základy apikálního meristému kořene a prýtu získávají konkrétní podobu; kolem apikálního dómu se zakládají primordia děloh; celé embryo se zvětšuje a dále roste. Od chvíle, kdy se objevují jasně zřetelné dělohy nazýváme toto stádium kotyledonárním.

Šestý týden zrání: embryo se přestává prodlužovat, stejně tak dělohy, dochází k prvním náznakům dezintegrace kořenové čepičky. Zralé somatické embryo má zřetelně vyvinutý apikální meristéum, prokambiální základy, dobře vyvinuté dělohy a kořenový meristéum. Delší kultivace nevede k dalšímu prodlužování embrya a ani žádný další strukturální

vývoj se neobjevuje. V této chvíli jsou všechny strukturální části embrya definovány a žádná nová primordia nebo vnitřní struktury se neobjevují.

Morfologickými abnormalitami je často doprovázena snížená produkce somatických embryí spojená s dlouhodobým udržováním (subkultivacemi) kultury (Dunstan a kol., 1993). Abnormálně utvářená embrya se však často vyskytují i při použití kultivačního média nevhodného složení. Například Iraqi a Tremblay (2001b) pozorovali větší množství abnormálně vyvinutých embryí na médiu s 3,16 % glukózou a 3,16 % fruktózou, ve srovnání s kultivací na médiu s 6 % sacharózou. Také aplikace vyšších koncentrací PEGu (polyethylenglykol) v maturačním médiu může vést ke změnám ve vnitřní stavbě somatických embryí, které mohou mít negativní vliv na další vývoj kultur.

4.4.3. Kultivace

Zrání představuje důležitou fázi vývoje somatických embryí. Z ESM se zakládají embryonální pletiva a orgány, v embryích se ukládají zásobní látky. Je známa celá řada protokolů používaných během fáze zrání.

Zlepšení výtěžku a kvality somatických embryí může být dosaženo působením osmotického stresu. Stres podporuje a synchronizuje zrání somatických embryí, inhibuje předčasné klíčení, stimuluje hromadění zásobních látek a navozuje toleranci k desikaci (Attree a Fowke, 1993).

Osmotický stres může být navozen přidavkem osmotika do maturačního média. Používána jsou obvykle penetrující osmotika, jako např. sacharóza, manitol, aminokyseliny a anorganické soli, nebo nepenetrující osmotika, např. polyethylenglykol (PEG) nebo dextran (Stasolla, 2002). Rozdíl mezi penetrujícími a nepenetrujícími osmotiky spočívá i v odpovědi buňky na jejich působení. Nízkomolekulární látky způsobují plazmolýzu buněk a po jejich vstupu do cytosolu dochází k osmotickému vyrovnání. Jejich osmotický efekt je časově omezený. Při použití vysokomolekulárních osmotik, např. PEGu, molekula (větší než 3 nm) nemůže prostupovat buněčnou stěnou a zůstává v kultivačním médiu. Tímto způsobem je zaručen časově neomezený osmotický účinek. V buňkách nedochází k plazmolýze a celkově se tato podoba osmotického stresu blíží přirozeným podmínkám v semeni (Attree a Fowke, 1993). Embrya reagují na signál nízkého osmotického potenciálu ve svém okolí jen v určitém stádiu svého vývoje, přesný časový úsek může být genotypově specifický.

Nejčastěji používané osmotikum pro navození osmotického stresu je PEG-4000. Přítomností PEGu v médiu dochází k odčerpávání molekul vody z buněk, tím vznikne snížení turgoru a vyvolání osmotického stresu. Pozitivní vliv PEGu na zrání somatických embryí jehličnanů bylo popsáno mnoha autory (Attree a kol., 1992; Kong a kol., 1997; Nørgaard, 1997; Vooková a kol., 1998; Svobodová a kol., 1999; Lipavská a kol., 2000a; Salajová a kol., 2004).

Vliv různých osmotik (sacharóza, manitol, PEG-200, PEG-400, PEG-600, PEG-1000, PEG-4000 a vysokomolekulární dextran) na zrání somatických embryí *Picea glauca* sledovali autoři Attree a kol. (1995). Po aplikaci vysokomolekulárního osmotika došlo ke zlepšení zrání somatických embryí. Bylo získáno 3-7x více embryí než u kontrolní, PEGem neošetřené varianty. S přidavkem PEG-4000 a s vysokomolekulárními dextransy embrya zrála v hojném počtu, měla vysoký podíl sušiny, hromadila zásobní látky a bez problémů přežila desikaci i zmrazení (cca -20 °C) po dobu 1 roku. Autoři dále popisují, že vysoká koncentrace PEGu, manitolu nebo sacharózy, vede k degradaci - odumření kultury. Při dlouhodobé kultivaci na médiu obohaceném o vysoké koncentrace osmotik dochází k poškození buněk a následnému příjmu molekul PEGu buňkami, což vede ke změnám v osmotickém působení s možným následkem poškození a degradace embryí (Attree a kol., 1995).

Jako podstatné se ukázalo nalézt optimální koncentraci PEGu, která by zajistila vysoké výtěžky kvalitních somatických embryí. Kong a Yeung (1995) se ve své práci zabývali vlivem různých koncentrací PEGu (PEG-3350) na zrání somatických embryí u *Picea glauca*. Do maturačního média přidávali 0, 1, 4 a 7 % PEG. Nejlépe podpořila zrání a výtěžky embryí aplikace 4 % PEGu. Kong a kol. (1998) zjistili, že PEG zabraňuje pokračování proliferace na maturačním médiu, zřejmě proto, že snižuje hladinu endogenních polyaminů.

Naopak Stasolla a kol. (2003) uvádí jako optimální koncentraci pro zrání somatických embryí u *Picea glauca* 7,5 % PEG. Autoři dále popisují, že při vyšší koncentraci PEGu byl již růst embryí inhibován. Zvýšení výtěžků somatických embryí *Picea abies* pozoroval Find (1997) po aplikaci 5 % PEGu do maturačního média. Embrya však byla menší a pod apikálním meristémem se vyskytovaly mezibuněčné prostory.

Anatomickou studii zaměřenou na vývoj somatických embryí *Picea abies* na základním maturačním médiu a na maturačním médiu obohaceném o PEG publikovala Svobodová a kol. (1999). Embrya se na médiu s přidavkem 3,75 % PEGu vyvíjela rychleji, a po pěti týdnech byla plně vyvinutá. Embrya na médiu bez přítomnosti PEGu a na médiu s 7,5 % PEGem zrála shodně šest týdnů. Embrya zrající na médiu s 7,5 % PEGem obsahovala velké trhliny ve středu embrya a četné krátké řady mrtvých buněk v kortexu. Tyto trhliny se začínaly objevovat od pátého týdne zrání. Embrya na médiu s 3,75 % PEGem obsahovala trhliny velmi zřídka. U embryí zrajících na médiu bez PEGu žádné trhliny pozorovány nebyly. Embrya zrající na médiu s 3,75 % nebo 7,5 % PEGem byla celkově delší než embrya zrající na médiu bez PEGu. Delší kořenová čepička byla pozorována u embryí rostoucích na médiu s přidavkem 7,5 % PEGu (Svobodová a kol., 1999).

Bozhkov a von Arnold (1998) se zaměřili na anatomii a výtěžnost zralých somatických embryí v médiu obohaceném o PEG–4000. Pro pokusy bylo použito 17 různých genotypů *Picea abies*. U 13 genotypů byl zjištěn pozitivní efekt 7,5 % PEGu na zrání somatických embryí a pouze u jednoho genotypu byl vývoj celkově zastaven. U genotypů, které byly tolerantní k sníženému osmotickému potenciálu média, byla pozorována lepší synchronizace zrání a vývoj embryí byl také rychlejší. Přidání PEGu do maturačního média vedlo k výrazným změnám v anatomii zralých somatických embryí. Embrya ošetřená PEGem byla tvořena menšími buňkami a byla celkově menší, zatímco kořenová čepička těchto embryí byla delší. Kolumela obsahovala více buněk, a v jejím okolí bylo pozorováno velké množství mezibuněčných prostor. Dále byla pozorována degradace klidového centra doprovázená smršťováním protoplazmy buněk.

Chalupa (1997) použil pro zrání somatických embryí u *Picea abies* maturační médium se 7,5 % PEGem, což ve srovnání s kulturou zrající na maturačním médiu bez PEGu podpořilo synchronizaci zrání embryí, omezilo předčasné klíčení, stimulovalo akumulaci zásobních proteinů a zvýšilo schopnost embryí přežít desikaci.

Stasolla a kol. (2003) se zaměřili na sledování změn v genové expresi během vývoje somatických embryí po aplikaci PEGu do maturačního média. Zjistili, že dochází ke změně v expresi několika genů (např. geny zodpovědné za citlivost k růstovým regulátorům nebo za kontrolu buněčného dělení a diferenciaci buněk). Autoři uvádějí, že PEG přispívá ke správnému utváření meristémů (zvýšená exprese genů Zwiller a Scarecrow). Autoři dále popisují, že aplikace PEGu do média způsobila zvýšení hladiny

transkriptů pro antioxidační enzymy a také pro hydrofilní proteiny Tyto látky mají za úkol chránit buněčné struktury před dehydratací a pravděpodobně souvisejí se zvýšenou tolerancí embryí k desikaci (LEA proteiny). Změněná hladina transkriptů byla prokázána i u genů, které mají podíl na cukerném metabolismu a asimilaci dusíku (Stasolla a kol., 2003). Osmotický stres může indukovat expresi tzv. rab genů (responsive to ABA) (Skriver a Mundy, 1990).

Aplikace PEGu do média se osvědčila také při pěstování somatických embryí *Picea glauca* v tekutém médiu. Embrya snášela lépe desikaci a byla životaschopnější v porovnání se zygotickými embryi pěstovanými na pevném médiu o stejné koncentraci PEGu (7,5 %). Dělohy somatických embryí byly po 7 týdnech dobře vyvinuty a obsahovaly velké množství zásobních lipidů (Attree a kol., 1994).

V protokolech o somatické embryogenezi jehličnanů se velmi často vyskytuje maturační médium s obsahem polyethylenglykolu v kombinaci s kyselinou abscisovou, protože interakce obou látek má významný vliv na zrání somatických embryí (Stasolla a kol., 2002).

Vyvíjející se zygotická embrya jehličnanů jsou v semeni obklopena megagametofytem, který je hlavním zdrojem ABA pro zárodek (Kong a kol., 1999). Některé účinky osmotického stresu u rostlin se podobají účinkům kyseliny abscisové. V plasmatické membráně rostlinných buněk jsou rozmístěny osmosenzory, které reagují na počáteční ztrátu turgoru. Od nich se pak odvíjí signální dráha založená na sekundárních poslech (myoinositol-1,4,5-trifosfát a Ca^{2+}). Signální dráha pak aktivuje příslušnou fyziologickou odezvu. Část odpovědi je pravděpodobně zprostředkována zvýšením hladiny ABA v reakci na osmotický stres, ABA by se tak stává „terciárním“ poslem.

Na základě fyziologicko-biochemických studií (interakce ABA a osmotikum) někteří autoři (Stasolla a kol., 2002) poukazují na to, že v průběhu zrání somatických embryí se jedná o odlišné principy regulace, jejichž účinek je aditivní a pro vývoj zralých somatických embryí prospěšný. Výtěžek zralých embryí byl na médiu s ABA, v porovnání s médiem bez ABA, desetinásobný (von Arnold a Hakman, 1988). Stejně tak kultury *Picea glauca* × *engelmannii* na médiu bez ABA hnědly či odumíraly, pouze výjimečně se vytvořily neorganizované struktury. V přítomnosti ABA probíhala morfogeneze lépe (Roberts a kol., 1990a).

Při aplikaci ABA do maturačního média je důležité zvolit optimální koncentraci ABA a také přiměřenou délku kultivace. Podle autorů Jalonen a von Arnold (1991) je pro raná somatická embrya před ošetřením ABA nezbytná specifická morfologická organizace, jinak nejsou embrya schopná na přítomnost ABA reagovat. Jednou z prvních reakcí embryogenní kultury na přítomnost ABA v médiu je omezení proliferace buněk a zahájení vývoje somatických embryí (Stasolla a kol., 2002). Po příliš dlouhém působení nebo příliš velkých koncentracích kyseliny abscisové kultura hnědne a na povrchu embryí se tvoří kalus (von Arnold a Hakman, 1988; Svobodová a kol., 1999).

Jako optimální koncentraci ABA Svobodová a kol., (1999); Lipavská a kol. (2000b) u *Picea abies* (linie AFO 541) uvádí 20 μM . Von Arnold a Hakman (1988) ve svých pokusech zjistili, že největší výtěžek somatických embryí *Picea abies* byl na médiu s přídavkem 7,6 μM ABA. Ruaud a kol. (1992) uvádí, že u *Picea abies* postačí koncentrace 2 μM ABA. V jiné studii bylo zdárné zrání somatických embryí *Picea abies* podpořeno přídavkem ABA s rozdílnými koncentracemi (5-40 μM), protože optimální koncentrace ABA v médiu se u různých genotypů liší (Vágner a kol., 1998).

ABA podporuje přechod embryogenní kultury z proliferační fáze do fáze zrání, dokáže potlačit vývoj abnormálních embryí a výskyt polyembryonie (Boulay a kol., 1988). V období zrání přispívá ABA ke snižování obsahu vody v embryích (Attree a kol., 1995). Podle Hoekstra a kol. (2001) zajišťuje ABA zpomalením metabolismu udržení takových hladin sacharidů, které chrání membrány při osmotickém stresu.

ABA mj. velmi intenzivně podporuje akumulaci zásobních látek ve zrajících embryích. U *Picea abies* či *Picea glauca* byla např. akumulace škrobu, lipidických inkluzí a zásobních proteinů pozorována jen u embryí, která zrála na médiu s ABA (Hakman a von Arnold, 1988; von Arnold a Hakman, 1988). U *Picea abies* podpořila hromadění lipidů 20 μM ABA (Feirer a kol., 1989). Zásobní proteiny se hromadí až v pozdních fázích maturace. ABA může podpořit jejich akumulaci už tím, že zabrání předčasnému klíčení embryí, a umožní tak plně dokončit zrání (Roberts a kol., 1990a; Flinn a kol., 1993). Aktivací specifické genové exprese na úrovni transkripce ovšem přímo reguluje i vlastní proteosyntézu (Misra a kol., 1993). U *Picea abies* (von Arnold a Hakman, 1988), *Picea sitchensis* (Krogstrup a kol., 1988) a *Picea glauca* (Dunstan a kol., 1988) autoři uvádí, že přídavek auxinů či cytokininů do maturačního média proces zrání embryí obvykle brzdí.

Existují ovšem práce dokumentující naopak pozitivní vliv nízkých koncentrací IBA v kombinaci s ABA.

Kong a Yeung (1995) sledovali změny endogenní hladiny ABA v somatických embryích *Picea glauca*. Endogenní hladina kyseliny abscisové se v průběhu zrání na médiu bez PEGu příliš neměnila, zatímco na médiu s přídavkem 4 % PEGu došlo ke zvyšování hladiny od 14 dne zrání. Maximum obsahu ABA nastalo po 21 dnech (stádium raných kotyledonárních embryí), poté se endogenní hladina kyseliny abscisové opět snižovala. Autoři z této skutečnosti vyvozují, že vliv PEGu může podmiňovat syntézu kyseliny abscisové. Dále byl sledován vliv 4 % PEGu na zrání somatických embryí u *Picea glauca* na médiích obohacených různou koncentrací ABA (0, 1, 5, 10 a 50 μM). Z výsledků je patrné, že PEG podporoval tvorbu zralých somatických embryí na všech těchto médiích. Byla zjištěna také zvyšující se produkce embryí v závislosti na zvyšující se koncentraci ABA v médiu. Po dodání ABA do maturačního média pozorovali Vágner a kol. (1998) u somatických embryí *Picea abies* rychlé zvýšení obsahu endogenní ABA. Někteří autoři (Find, 1997; Vágner a kol., 1998) uvádí, že endogenní hladina ABA v somatických embryích *Picea abies* je závislá na exogenní koncentraci ABA a na osmotickém potenciálu média.

Bozhkov a kol. (2002a) považují za důležité vývojové změny, ke kterým dochází u kultur *Picea abies* po přenosu ESM z proliferačního média na médium maturační. Tyto změny mohou mít zásadní vliv na výtěžek a kvalitu zralých somatických embryí. Autoři se domnívají, že přítomnost ABA v prvním týdnu zrání není pro vývoj somatických embryí nezbytná. Bozhkov a von Arnold (1998) spolu s Högberg a kol. (2001) zmiňují negativní vliv ABA na následný růst rostlin po přesazení do *ex vitro* podmínek.

Bozhkov a kol. (2002b) proto upravili kultivační protokol pro *Picea abies*. Po kultivaci na proliferačním médiu byla ESM přenesena na médium bez růstových regulátorů (kultivace po dobu jednoho týdne). Krátce po přenosu autoři pozorovali výrazný nárůst počtu raných somatických embryí a zároveň aktivaci procesu programované buněčné smrti (u embryí, která nejsou schopná dalšího vývoje). V nepřítomnosti ABA dochází k okyselování kultivačního média. Acidifikace zprostředkuje programovanou buněčnou smrt (PCD) proembryí, která se nepřeměnila v raná somatická embrya. Poté následuje pětítýdenní kultivace na maturačním médiu s přídavkem ABA (30 μM). Po porovnání dosažených výsledků s výsledky embryogenní kultury rostoucí po celou dobu na médiu s ABA bylo

zjištěno, že vynechání růstových regulátorů vedlo k rychlému nárůstu somatických embryí (zjištěné maximum bylo již po 7 dnech, zatímco na médiu s ABA až po 11 dnech). Výsledkem pak byl větší výtěžek kvalitních somatických embryí na konci zrání (Bozhkov a kol., 2002b).

Ethylen je produkován rostlinnými pletivy a hromadí se uvnitř kultivační nádoby. Účinek ethylenu na somatická embrya je podmíněn genotypem (El Meskaoui a Tremblay, 1999; 2001).

Někteří autoři používají AgNO_3 jako specifický inhibitor působení ethylenu (blokuje ethylenový receptor). U *Picea glauca* způsobila aplikace AgNO_3 zvýšení počtu zralých somatických embryí na médiu bez ABA a bez PEGu, případně na médiu bez ABA, ale s PEGem. Stimulační účinky AgNO_3 se přitom projeví jen při absenci nebo nízkých koncentracích exogenní ABA, při vyšších koncentracích ABA neměl AgNO_3 na počet embryí žádný vliv. Spolu se zjištěním, že AgNO_3 navodila zvýšení endogenní hladiny ABA v prvních fázích maturace, tento fakt poukazuje na to, že není možné jeho účinek vysvětlit pouze blokováním biologické funkce ethylenu. Vzhledem k tomu, že Ag^+ je iontem těžkého kovu, může navozovat stres vedoucí k posílení endogenní koncentrace ABA s pozitivním účinkem na zrání somatických embryí (Kong a Yeung, 1995).

Výsledky získané při kultivaci *Picea mariana* rovněž zpochybňují vliv ethylenu. Vstříknutí ethylenu do kultivační nádoby, jeho odstranění pomocí KMnO_4 , ani aplikace AgNO_3 počet embryí neovlivnily. Přídavek kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové (ACC, prekursor biosyntézy ethylenu), nebo chloridu kobaltnatého (CoCl_2 , inhibitor biosyntézy ethylenu) zvýšil, resp. snížil hladinu ethylenu v kultivační nádobě, v obou případech ale došlo k snížení počtu vytvořených embryí (El Meskaoui a Tremblay, 1999). Zdá se, že ethylen nemá velký vliv na tvorbu somatických embryí smrku. Významné ale může být ovlivnění aktivity enzymů, které se podílejí na jeho biosyntéze.

U *Picea mariana* produkují embryogenní linie s nízkým maturačním potenciálem větší množství ethylenu než dobře zrající genotypy. Aplikace inhibitorů biosyntézy nebo biologického působení ethylenu pak u špatně zrající kultury vylepšuje tvorbu embryí, u responsivních linií dochází spíše ke zhoršení. Popsané efekty je možno zvrátit aplikací ethylenu do kultivační nádoby. Určitá hladina ethylenu je tedy pro bezchybný průběh zrání zřejmě nezbytná – u kultur s vysokým maturačním potenciálem se blíží optimu, u

nezrajících genotypů je však příliš vysoká, a blokuje vývojové procesy (El Meskaoui a Tremblay, 2001).

Manitol je nízkomolekulární cukerný alkohol, který není embryogenními kulturami jehličnanů metabolizován, nemůže tedy sloužit jako zdroj uhlíku a energie (Tremblay a Tremblay, 1991). U *Picea mariana* nebyl ani vhodným osmotikem (Tremblay a Tremblay, 1995). Roberts (1991) uvádí, že přidavek 6 % manitolu do média s ABA zvýšil o 100 % počet globulárních embryí u *Picea glauca* × *engelmannii*. Jako negativní vliv manitolu na kulturu autor zmiňuje inhibici tvorby kotyledonárních embryí. Kotyledonární embrya se tvořila jen po přenosu globulárních embryí na médium bez manitolu. Po vývoji primordií děloh, bylo nutné přenést kulturu na médium se zvýšenou koncentrací manitolu (13-20 %), kultury tak inhibovaly předčasné klíčení (Roberts, 1991).

Tremblay a Tremblay (1991) zjistili, že vzrůstající koncentrace sacharózy má na zrající embrya také osmotický účinek, protože částečným nahrazením sacharózy osmotikem (manitol, sorbitol, myo-inositol) nebyl ovlivněn počet vytvořených embryí. Interpretace těchto výsledků je velmi obtížná, protože nízkomolekulární osmotika mohou být přirozenou složkou rostlinných buněk (myo-inositol) nebo pokud nejsou pro daný rostlinný druh přirozeným sacharidem, pravděpodobně nejsou ani zcela inertní (Lipavská a Vreugdenhil, 1996), popř. mohou být v určité míře metabolizovány (Thompson a kol., 1987; Swedlund a Locy, 1993).

4.4.4. Zásobní látky

Kromě morfologicko-anatomických parametrů je maturační potenciál embryogenních kultur charakterizován také akumulací příslušných zásobních látek. Množství a složení těchto metabolických rezerv ovlivňuje schopnost embrya projít dalšími fázemi. Na spektrum a ukládání zásobních látek má významný vliv složení maturačního média. Dynamika obsahu zásobních látek v pletivech embryí je ukazatelem zdárného postmaturačního vývoje.

Prvkem minerální výživy, který nejvíce ovlivňuje úspěšnost zrání somatických embryí, je patrně dusík, přesněji řečeno forma, v níž je embryogenní kultuře přítomen. Embryogenní kultury s různou morfologií (A1, A2 a B, viz. kap. 4.3.1.) vykazují rozdíly v příjmu různých forem dusíku. Zatímco kultura typu A přijímá dusík poměrně rychle, typ B se

vyznačuje nulovou nebo velmi nízkou absorpcí. Rozdíl v příjmu se dále odráží i v pH kultivačního média (Find a kol., 1998).

Někteří autoři uvádí, že použití organických forem dusíku v maturačním médiu výrazně podporuje proces zrání embryí na rozdíl od kultivace na médiích obsahujících anorganický dusík. Vhodným zdrojem dusíku je L-glutamin, protože působí také jako osmotikum, případně kompatibilní solut. U *Picea mariana* vznikalo na médiu s přídavkem L-glutaminu (2-3 g.l⁻¹) dvakrát více zralých embryí než na médiu bez organického dusíku. Vyšší koncentrace však působí inhibičně, protože se v kultuře hromadí amoniak (Khlifi a Tremblay, 1995). Ve srovnání s tím se u kultur *Picea glauca* po aplikaci organické formy dusíku (L-glutamin nebo kasein hydrolyzát) zrychlil růst kultury, počet embryí se však nezvýšil, vztaženo na jednotku čerstvé hmotnosti kultury byl dokonce nižší (Barrett a kol., 1997).

V raných somatických embryích *Picea glauca* (Joy a kol., 1991) a *Picea abies* (Lipavská a kol., 2000b) se škrob prakticky nevyskytuje, malá škrobová zrna obsahují výjimečně suspenzorové buňky. Akumulace začíná záhy po přesazení ESM na maturační médium. Škrob se nejprve objeví v suspenzoru, později, když je utvářena vnitřní struktura embrya, se hromadí v buňkách kořenové čepičky. V kotyledonárních embryích je škrob uložen i v kortikálních vrstvách hypokotylu, případně v dělohách, i když v menším množství než v kořenové čepičce. Ke konci zrání se obsah škrobu výrazně snižuje. Somatická embrya, která na konci zrání obsahovala velké množství škrobu, měla většinou abnormální vzhled a často na povrchu kalusovatelů (Svobodová a kol., 1999). Ani zygotická embrya *Picea glauca* neobsahovala detekovatelné množství škrobu (Joy a kol., 1991). Z výše uvedených výsledků vyplývá, že při hromadění energetických rezerv v somatických embryích neplní polysacharidy významnější úlohu (Lipavská a kol., 2000a).

Hlavními zásobními látkami v semenech jehličnanů jsou lipidy (Feirer a kol., 1989). Intenzivní tvorba lipidů začíná u *Picea glauca* brzy po zahájení maturace a lokalizací odpovídá hromadění škrobu. Nejdříve se lipidy ukládají do suspenzoru a kořenové čepičky, později také do kortikální vrstvy hypokotylu (Joy a kol., 1991). V průběhu zrání somatických embryí nedochází ke zvyšování celkového obsahu lipidů, ale mění se spektrum vyšších mastných kyselin. Výsledné složení je obdobné jako u zygotických embryí (Attree a kol., 1992).

V somatických embryích *Picea glauca* způsobil přídavek PEGu-4000 (7,5 %), v porovnání s kontrolním médiem (médiem s ABA, bez přídavku PEG), devítinásobné zvýšení obsahu zásobních lipidů. Obsah lipidů se navýšil na úroveň obvyklou v zygotických embryích, vztaženo na jednotku v sušině. Spektrum vyšších mastných kyselin přitom nebylo ovlivněno (Attree a kol., 1992; 1994; 1995).

Zásobní proteiny se začínají tvořit až v pozdních fázích maturace (kotyledonární stádium). Proteiny nahromaděné během zrání embryí plní především nutritivní roli při klíčení, kdy jsou rychle hydrolyzovány (Tautorus a kol., 1991). Hromadění zásobních proteinů somatických embryí u *Picea abies* bylo zjištěno především v dělohách, dále v oblasti suspensoru a podél osy embrya (Hakman, 1993). Spektrum a množství proteinů obsažených v somatických embryích jehličnanů (*Picea abies*, *Picea glauca* × *engelmannii*) neodpovídá vždy spektru zjištěnému v embryích zygotických (Hakman a kol., 1990; Flinn a kol., 1993). Po přidání PEGu (7,5 %) do maturačního média vykazovala somatická embrya shodné spektrum zásobních proteinů, jako embrya zygotická (Misra a kol., 1993). Manitol podobně jako PEG indukuje hromadění zásobních proteinů v somatických embryích *Picea glauca* × *engelmannii* (Roberts, 1991; Flinn a kol., 1993).

Jak uvádí Gutman a kol. (1996) pouze u embryí zrajících na médiu s ABA byla pozorována akumulace zásobních proteinů. U somatických embryí *Picea glauca* × *engelmannii* zrajících na médiu s přídavkem ABA (40 µM) se hromadily stejné zásobní proteiny jako u zygotických embryí (Roberts a kol., 1990a). Také u somatických embryí *Picea glauca* stimulovala ABA (testováno pro 1,9-30 µM ABA) akumulaci zásobních látek, především lipidů, ale také proteinů a sacharidů (Hakman a von Arnold, 1988). Somatická embrya *Picea abies* zrající na médiu s přídavkem ABA měla obdobný vzhled, shodné růstové parametry a vyžadovala stejné kultivační podmínky jako izolovaná zygotická embrya kultivovaná v podmínkách *in vitro* (von Arnold a Hakman, 1988). Na základě pokusů s embryi *Picea glauca*, zrajících na médiu s přídavkem ABA autoři Misra a kol. (1993) předpokládají, že osmotický stres reguluje syntézu zásobních proteinů na úrovni translace. Autoři uvádí, že na daném médiu se ve zrajících embryích akumulovaly transkripty; kompletní proteinové spektrum však bylo získáno jen při působení osmotického stresu. Vliv na průběh somatické embryogeneze mohou mít i cukerné alkoholy (manitol).

Významnou metabolickou, osmotickou a signální úlohu ve stádiu maturace hrají sacharidy. Mezi jejich základní funkce patří: 1/ jsou zdrojem uhlíku a energie; 2/ působí jako osmotika a stresové protektanty; 3/ mohou plnit funkci signálních molekul.

Rozlišení jednotlivých úloh sacharidů je velmi obtížné, protože jejich úlohy jsou úzce provázány (Lipavská a Konrádová, 2004). Exogenně aplikovaný sacharid může významným způsobem ovlivnit metabolismus sacharidů v buňce: 1/ může nasměrovat metabolismus k jednotlivým dalším metabolickým drahám; 2/ může ovlivnit osmotickou aktivitu média; 3/ může být metabolizován na složky různé kvality s ohledem na sacharidovou signalizaci (Pien a kol., 2001; Rolland a kol., 2002).

Účinek sacharózy na indukci, udržování a zrání somatických embryí popsala řada autorů (např. Finer a kol., 1989; Tremblay a Tremblay, 1991; Schuller a Reuther, 1993).

Počáteční nárůst hladiny endogenních rozpustných sacharidů je pravděpodobně způsoben zvýšenou dostupností exogenního sacharidu po přenesení na médium bohaté sacharózou (Iraqi a Tremblay, 2001b). Mírný nárůst celkového obsahu sacharidů 1. týden po přenesení na maturační médium byl zjištěn také u *Picea abies*, kde byla 3 % koncentrace sacharózy v proliferačním médiu zachována i v médiu maturačním (Lipavská a kol., 2000b). Dále byl během vývoje embryí *Picea abies* v kultuře s týdenním subkultivačním intervalem sledován pokles celkového obsahu sacharidů za současného nárůstu obsahu sacharózy v embryogenním pletivu. Pokles obsahu sacharidů v embryu je způsoben poklesem obsahu hexóz, a proto je pro vývoj embrya typický nárůst poměru sacharóza : hexóza (Lipavská a kol., 2000b).

Iraqi a Tremblay (2001a) pozorovali změny v sacharidovém metabolismu u *Picea mariana* a *Picea rubens* (smrk červený) vyvolané nahrazením 6 % sacharózy v maturačním médiu ekvimolárním množstvím fruktózy a glukózy. Nahrazení vedlo ke změnám v obsahu zásobních látek a výsledkem bylo snížení kvality somatických embryí. Příliš vysoké koncentrace sacharózy (9-12 %), podle autorů Tremblay a Tremblay (1991), působí na produkci somatických embryí spíše inhibičně. Podobné výsledky dosáhli i u *Picea glauca* Lu a Thorpe již v roce 1987.

Tremblay a Tremblay (1995) a Taber a kol. (1998) prokázali, že sacharóza je v médiu štěpena na glukózu a fruktózu. Někteří autoři považují hydrolýzu sacharózy za hlavní stimulační efekt pro vývoj embrya. Hydrolizační účinek sacharózy nemůže být nahrazen

aplikací glukózy, fruktózy nebo jejich vzájemnou ekvimolární kombinací do média (Taber a kol., 1998; Iraqi a Tremblay, 2001a).

Jako další možné sacharidy byly testovány (Tremblay a Tremblay, 1991) např. glukóza, fruktóza, maltóza, laktóza, celobióza, manitol, sorbitol a myo-inositol. Autoři Tremblay a Tremblay (1991) zjistili, že dalším účinným sacharidem na vývoj embryí *Picea rubens* je 6 % fruktóza a zároveň prokázali prospěšný účinek maltózy a celobiózy. Ve většině případů byla ale potvrzena jejich nižší stimulační účinnost.

Po aplikaci PEGu do maturačního média dochází, mimo jiné, ke změnám v obsahu endogenních nestrukturních sacharidů v somatických embryích (Lipavská a kol., 2000a). Somatická embrya *Picea abies* zrající na maturačním médiu s PEGem (3,75 %) měla celkový obsah nestrukturních sacharidů nižší než embrya zrající bez přítomnosti PEGu. Ve srovnání s kontrolní variantou (médiem bez obsahu PEGu) byl u embryí ošetřených 3,75 % PEGem vyšší poměr sacharózy než hexózy. Vyšší koncentrace PEGu (7,5 %) v médiu se projevila odlišnou akumulací nestrukturních sacharidů. Obsah sacharózy, fruktózy i glukózy byl vyšší než u embryí zrajících na médiu bez PEGu, případně s 3,75 % PEGem. Pozorované narušení rovnováhy sacharidového metabolismu po aplikaci PEGu (7,5 %) koreluje se zjištěnými abnormalitami na anatomické úrovni (Svobodová a kol., 1999). Specifické kultivační podmínky mimo jiné indukují změny v obsahu endogenních sacharidů (Bomal a kol., 2002).

4.5. Desikace

Desikace simuluje přirozený vývoj zygotických embryí v semeni a zlepšuje klíčení somatických embryí jehličnanů (Roberts a kol., 1991; Attree a Fowke, 1993; Bomal a Tremblay, 1999). Proces desikace se dá popsat jako pomalé „vysoušení“ zralých somatických embryí za kontrolovaných teplotních podmínek. Na počátku vede pomalá desikace k částečným ztrátám vody, což je považováno za signál vedoucí ke spuštění desikační tolerance (Black a kol., 1999; Bomal a kol., 2002). Proces desikace tak umožňuje změnu mezi zráním embrya a jeho klíčením.

Během desikace se odehrávají metabolické, fyziologické a molekulárně genetické procesy, které jsou důležité pro následující vývojové fáze. Tyto procesy zahrnují především syntézu specifických sacharidů, proteinů, degradaci mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) a degradaci endogenní ABA (Roberts a kol., 1991; Attree a

Fowke, 1993). Desikace nahrazuje přirozené vysoušení embrya v semeni při jeho zrání. Přirozené vysoušení podporuje toleranci k nepříznivým podmínkám prostředí, desikace pak pozitivně ovlivňuje dosažené výsledky při kultivaci *in vitro* (Webster a kol., 1990).

4.5.1. Vodní stres

Vývoj semen některých rostlin je často ovlivněn působením vodního stresu. Schopnost semen (embrya) přežít proces desikace, kdy obsah vody v semeni může klesnout i pod 10 % obsahu výchozího, je výsledkem tzv. desikační tolerance (Golovina a kol., 2000). Snížená hladina vody v semenech prodlužuje období metabolického klidu, a tím i jejich životnost. Po následné rehydrataci mají semena vyšší klíčivost a klíčící rostliny lépe rostou (Kermode, 1990).

Zralá embrya nabývají tolerance k desikaci působením ABA v kombinaci s působením subletálního stresoru - vodního stresu. Vodní stres může být způsoben zvýšenou koncentrací PEGu, sacharózy, tepelným šokem nebo chladovým působením (Hoekstra a kol., 2001; Pond a kol., 2002). Attree a kol. (1995) navodili toleranci k desikaci u *Picea glauca* působením maturačního média s přidavkem ABA a PEGu (7,5 %; Mr= 4000). U takto ošetřených zralých embryí došlo k poklesu obsahu vody z 96 % na 47 %.

Jako velmi důležitý faktor v nabývání tolerance k desikaci se projevila rychlost vysychání somatických embryí (Attree a kol., 1995; Bomal a kol., 2002). Částečná pomalá ztráta vody (o 45 % z původního obsahu) u *Picea glauca* (Attree a kol., 1995) a (o 55 % z původního obsahu) u *Picea mariana* (Bomal a kol., 2002) vedla k získání plné tolerance k rychlému vysychání.

Zralá embrya *Picea glauca*, která byla vystavena rychlé desikaci, po osmém týdnu zrání na maturačním médiu (s přidavkem ABA a PEG) měla 5 % obsahu vody. Rychlá desikace u embryí navodila stav metabolického klidu. Takto ošetřená embrya byla zmrazena a uchována (-20 °C) po dobu jednoho roku. Po roce, jak autoři uvádí (Attree a kol., 1995), embrya klíčila bez problémů.

Uchování zralých embryí ve stavu klidu po delší dobu by v průmyslové produkci umožnilo celoroční produkci rostlin a synchronizovanou výsadbu v příznivém ročním období.

4.5.2. Zásobní látky

Studie kvality semen odhalily významnou úlohu sacharidů k získání tolerance k desikaci a tolerance k nízkým teplotám (Bernal-Lugo a Leopold, 1995). Chladové působení na zralá embrya má vliv na změny v metabolismu zásobních látek, které byly nahromaděny během zrání embrya. Sacharidy mají významnou úlohu při regulaci osmotických poměrů, při signalizaci či regulaci genové exprese (Carrier a kol., 1997; Johnson a kol., 1997). K nejvýznamnějším zásobním sacharidům patří škrob, sacharóza, oligosacharidy rafinózové řady (RFO) a fruktany.

Jak u somatické (Lipavská a kol., 2000a), tak i zygotické embryogeneze *Picea abies* (Gösslová a kol., 2001) autoři uvádí úbytek celkové hladiny endogenních nestrukturních sacharidů na maturačním médiu a postupný nárůst sacharózy. Bomal a kol. (2002) popisují vztah mezi tolerancí embrya k desikaci a obsahem sacharidů u *Picea mariana*. Obsah sacharózy byl ve srovnání s kontrolní nedesikovanou variantou, po 24 h pomalé desikace dvojnásobný, po 48 h se obsah sacharózy oproti počátečnímu stavu ztrojnásobil a byla také detekována rafinóza. Současně s postupující pomalou desikací klesal obsah škrobu. Vysoké hladiny sacharózy a přítomnost rafinózy v somatických embryích zajišťují toleranci nejen k pomalé ale i rychlé desikaci (Bomal a kol., 2002).

Hromadění RFO u rostlin pozitivně koreluje s působením chladu (Bachman a kol., 1994; Lipavská a kol., 2000b), vysokých teplot i tolerancí k desikaci (Downie a Bewley, 2000; Bomal a kol., 2002).

Působení RFO na somatická embrya je srovnatelné s morfologickými procesy v zygotických embryích. Po dokončení morfologických změn se v zygotických embryích kumulují oligosacharidy rafinózové řady (RFO). Rafinóza a stachyóza představují až 50 % z celkového množství sacharidů u zygotických embryí (Gösslová a kol., 2001), což naznačuje přirozenost procesu akumulace těchto sacharidů.

Kumstýřová a kol. (2000) prokázaly u zralých embryí *Picea abies*, vystavených pomalé desikaci, zvyšující se obsah RFO. Konrádová a kol. (2003) popisuje, že možné působení chladu lze považovat za alternativu k desikaci pokud se týká hromadění RFO. Semena *Picea glauca* a *Picea abies*, která prošla nízkými teplotami (4 °C) vykazovala postupný nárůst obsahu RFO (stachyózy a rafinózy). Akumulace RFO byla provázena mobilizací škrobu (Konrádová a kol., 2003). Zdravá embrya obsahují relativně malé zásoby škrobu,

kteře sice postačují pro krytí energetických požadavků během několikatyđenní desikace, ale nepokřývají mobilizaci škrobu s následným nárůstem obsahu sacharózy (Lipavská a kol., 2000b).

RFO (α -1,6-galaktosyl_n-sach) se běžně vyskytuje v zásobních orgánech a semenech (Bachmann a kol., 1994; Obendorf 1997; Muzquiz a kol., 1998) rostlin, kde působí jako zásobní a transportní forma sacharidu (Bachman a kol., 1994). RFO zastávají ve vyvíjejících se semenech (embryích) důležitou úlohu (Bachman a kol., 1994; Sun a kol., 1994; Bernal-Lugo a Leopold, 1995) a umožňují toleranci k vodnímu stresu ještě před plnou zralostí semen. Bernal-Lugo a Leopold (1995) uvádí, že životnost semen roste s poměrem RFO ku sacharóze. Autoři Bomal a kol. (2002) na příkladu *Picea mariana* uvádí, že samotný nárůst obsahu sacharózy nemůže zajistit desikační toleranci, zatímco přítomnost sacharózy spolu s akumulací RFO desikační toleranci zajistí.

Snižování obsahu vody v semeni vede k vyšším koncentracím solutů. Soluty pak v buňce krystalizují (Williams a Leopold, 1989). Caffrey a kol. (1988) zjistili, že RFO mohou zabránit krystalizaci solutů sacharózy v buňce. Jedním z důsledků působení desikace na somatická embrya *Picea abies* a *Picea mariana* je právě kumulace RFO (Kumstýřová a kol., 2000; Bomal a kol., 2002). Sacharóza za přítomnosti RFO nekrystalizuje a navozuje v cytoplasmě stav o vysoké viskozitě tzv. vitifikaci (glassy state). Pomocí vitifikace se uchovávají vodíkové vazby mezi molekulami vody a hydrofilními skupinami makromolekul, což omezuje pohyb organel i molekul a způsobuje pokles metabolické aktivity (Williams a Leopold, 1989; McKersie, 1996). Z tohoto důvodu se jeví poměr RFO ku sacharóze důležitější než celkový stav sacharidů v buňce. Například embrya rýže nabyly tolerance k desikaci po dosažení poměru sacharóza ku RFO 20:1 (Brenac a kol., 1997).

Přítomnost RFO je důležitá pro ochranu pletiv před poškozením dehydratací (v semenech) a také před působením chladu. V zimním období je obsah RFO v terminálním pupenu *Picea abies* výrazně vyšší než v ostatních obdobích (Lipavská a kol. 2000a). Ochranný mechanismus RFO spočívá v tom, že zabraňují krystalizaci sacharózy, a tím zachovávají její ochrannou funkci. Sacharóza se podílí na udržení membrán ve stavu tekutého krystalu při osmotickém stresu (chlad, sucho, zasolení atd.) (Caffrey a kol., 1988).

Sacharidová ochrana je však jen jednou z několika ochranných složek v průběhu desikace. V pozdních fázích zrání, kdy embryo začíná trpět nedostatkem vody, dochází k zásadním změnám v genové expresi. V embryu se začínají objevovat tzv. LEA proteiny (late embryogenesis abundant) (Hughes a Galau, 1991). Během desikace zastoupení LEA proteinů v buňce roste a podílí se spolu s RFO na ochraně buněčných struktur během vodního deficitu (Goyal a kol., 2005). Jedná se také o jeden z projevů působení kyseliny abscisové v průběhu somatické i zygotické embryogeneze. LEA proteiny, mimo jiné, stabilizují buněčné bílkoviny a nukleové kyseliny v období sníženého obsahu vody, případně regulují specifickou genovou expresi (Skriver a Mundy, 1990).

4.5.3. Kultivace

Chladové ošetření, ještě před samotnou indukcí ESM, bývá součástí kultivačních protokolů z důvodu zlepšení klíčivosti somatických embryí a synchronizace vývoje orgánů. Působení chladu může zvýšit schopnost primárních explantátů produkovat ESM. Hakman a von Arnold (1985) uvádí, že růst a regenerace kalusů byla synchronní a efektivnější při předchozím chladovém ošetření materiálu. Šišky určené pro získání primárního explantátu byly minimálně po dobu dvou měsíců ponechány v chladu (4 °C). Vývoj somatických embryí a semenáček, jak uvádí Hakman a von Arnold (1985) také probíhal rychleji.

V laboratorních podmínkách je podstatná rychlost desikace a také konečný obsah vody v embryích. V *in vitro* podmínkách má desikace obvykle podobu částečného „vysoušení“ embryí při vysoké vzdušné vlhkosti (Roberts a kol., 1990b) a nízké teplotě (cca -18 °C). Metodu částečného vysoušení (HRH – treatment, high relative humidity) pak podrobně popisuje Bozhkov a von Arnold (1998).

Pomalá desikace umožňuje v průběhu několika týdnů snižování obsahu vody při vysoké relativní vlhkosti (Roberts a kol., 1990b). Důležitým aspektem je tzv. získání tolerance k desikaci. Zvýšení tolerance k desikaci může být navozeno právě ošetřením chladem, či aplikací ABA a PEG do maturačního média.

Attree a kol. (1995) popisuje přeměňování somatických embryí na rostliny. Po pomalém vysoušení a následném zmrazení (cca -20 °C) následovalo uskladnění po dobu jednoho roku. Samotná přeměna na životaschopné rostliny byla úspěšná ze 76-84 %, oproti nezmrazené kontrolní skupině, kde byla konverze na rostlinky úspěšná ze 77 %.

Vysoušení kromě možnosti delšího uchovávání prokazatelně zlepšovalo i klíčení. Podobnou metodu použili Webster a kol. (1990) u *Picea glauca* x *engelmannii*. Předchozí studie těchto autorů ukazují, že embrya během vysoušení ztrácí přibližně 15 % vody, což je srovnatelné s vysoušením v přirozených podmínkách a může to úspěšně simulovat.

Autoři Pond a kol. (2002) popisují tzv. rychlou desikaci (2 h při pokojové teplotě v laminárním flow-boxu). Rychlá desikace somatických embryí u *Picea glauca* byla úspěšná pouze po předchozím vystavení embryí teplotě 4 ± 1 °C (Pond a kol., 2002). Naopak somatická embrya *Picea glauca* x *engelmannii* nepřežila rychlou desikaci při pokojové vzdušné vlhkosti. Částečné vysoušení při relativně vysoké vzdušné vlhkosti zvýšilo efektivitu klíčení až na 90 %. Toto ošetření se také pozitivně projevilo v synchronizaci vývoje a prodlužování kořene, hypokotylu a zvětšování děloh během klíčení (Roberts a kol., 1989).

Desikace se u *Picea abies* jeví jako faktor zlepšující klíčení embryí ve srovnání s nedesikovanou kontrolou (Gupta a Grob, 1995; Gorbatenko a Hakman, 2001).

4.6. Klíčení (germinace)

Roberts a kol. (1991), Attree a Fowke (1993) a Stasolla a kol. (2002) upozorňují, že při zajištění vysoké úspěšnosti produkce somatických embryí hrají významnou roli kultivační podmínky během postmaturačních fází. Proces klíčení je zahájen imbibicí desikovaných embryí a končí s nástupem prodlužování, kořínku a hypokotylu. Během klíčení embryo spotřebovává zásobní látky, které nahromadilo během zrání, postupně zelená (zejména hypokotyl a dělohy) a přechází z heterotrofní na fotomixotrofní výživu. Klíčení je závislé na světelném režimu. Médium navozující germinaci neobsahuje růstové regulátory, obsah sacharidů je snížen a většinou je doplněno o aktivní uhlí (Gupta a Grob, 1995). Toto stádium, jak uvádí Lelu a kol. (1993), je velmi kritické a velmi závisí na použitém protokolu. Délka germinace je pak proměnlivá 1-5 měsíců (Lelu a kol., 1993).

4.6.1. Zásobní látky

Ke klíčení zralého somatického embrya je nutný dostatečný zdroj energie. Somatická embrya se vyvíjí bez endospermu, na rozdíl od embryí zygotických, a během zrání tedy musí nahromadit dostatek zásobních látek pro další vývoj. Úlohu zásobních látek plní u rostlin tři hlavní skupiny organických sloučenin: polysacharidy (především škrob), lipidy (především triacylglyceroly) a zásobní proteiny. Vzhledem k tomu, že syntéza zásobních

látek vychází ze sacharidů, odrážejí se změny v obsahu sacharidů v akumulaci těchto látek.

Hlavními zásobními látkami v semenech jehličnanů jsou lipidy. Lipidy mohou tvořit až 50 % čerstvé hmotnosti zralých zygotických embryí (Feirer a kol., 1989). Zásobní bílkoviny syntetizující se v průběhu vývoje embrya (semene), poskytují základní zdroj aminokyselin pro klíčení a další růst rostliny. Zásobní lipidy, které se nahromadily během zrání semene, jsou při klíčení odbourávány a přeměňovány na rozpustné sacharidy.

Takto získané sacharidy jsou transportovány do klíčícího embrya a posléze do semenáčku. Stone a Gifford (1999) to dokládají na minimálním obsahu zásobních sacharidů ve zrajících embryích borovice kadidlové (*Pinus taeda*) a na jejich rapidním nárůstu v době klíčení. Tento nárůst koreloval se snížením obsahu zásobních lipidů v megagametofytu. Lipidy tvořily 59 % všech zásobních látek, z toho 80 % zahrnoval megagametofyt. Odbourávání triacylglycerolů (TAG) probíhalo nejdříve v klíčícím embryu, ještě před prodlužováním kořínku. Nejintenzivněji se TAG odbourávaly v radikule a hypokotylu. Až v době raného růstu semenáčku (po objevení kořínku) se začaly TAG odbourávat v megagametofytu (Stone a Gifford, 1999).

Sacharidy a fytohormony mohou vzájemně ovlivňovat klíčení semen. Některé sacharidy jsou schopny inhibovat klíčení a to i při velmi nízkých koncentracích (Pego a kol., 1999). Optimální koncentrace glukózy pro vyvolání inhibičního účinku ABA jsou relativně nízké (Finkelstein a Lynch, 2000). Roberts a kol. (1990a) a Gupta a Grob (1995) používali 1-3,4 % sacharózu, jako nezbytnou složku média pro zajištění klíčení somatických embryí smrku a následného růstu rostlin. Koster a Leopold (1988), Downie a Bewley (2000), Kumstýřová a kol. (2000), Konrádová a kol. (2002) poukázali ve svých studiích se zygotickými a somatickými embryi *Picea abies* na rychlou degradaci RFO (2-3 dny) během raných stádií klíčení. Nahromaděná RFO z předchozí fáze SE slouží jako důležitý zdroj uhlíku a energie během počátečních fází klíčení (Downie a Bewley, 2000; Konrádová a kol., 2003).

4.6.2. Kultivace

Na počátku výzkumu SE jehličnanů autoři popisují zrání somatických embryí na médiu s výrazně sníženým obsahem auxinů a cytokininů, případně na médiu zcela bez růstových regulátorů (Hakman a von Arnold, 1985; Chalupa, 1985b; Hakman a Fowke, 1987).

Výtěžky klíčnicích rostlin však byly zpravidla velmi nízké. Např. u *Picea abies* se na médiích bez růstových regulátorů, nebo obsahujících kyselinu indolylmáseľnou (IBA) či zeatin tvořilo velmi malé množství rostlin, u kterých nebylo možno popsat přesnou morfologickou strukturu.

Při aplikaci ABA je nutné správně zvolit její koncentraci, zejména s ohledem na dostatečný výtěžek zralých embryí, která se přemění v klíčnicí rostlinu. Účinek působení ABA na embrya se během zrání snižuje. Optimální hodnota je pravděpodobně genotypově specifická. U *Picea abies* se nejlépe osvědčila koncentrace 7,6 μM ABA (von Arnold a Hakman, 1988), zatím co u jiného genotypu *Picea abies* postačila koncentrace 2 μM ABA (Ruaud a kol., 1992). Jak autoři uvádí, pro *Picea glauca* $\times$ *engelmannii* je nutno použít vyšší koncentrace. Koncentrace 1-10 μM ABA do maturačního média působí tvorbu embryí bez kořenového pólu. Embrya kultivovaná na médiu obohaceném o 10-20 μM ABA se vyvíjí normálně, ale předčasně klíčí. Zvýšení koncentrace ABA na 30-40 μM , jak uvádí Roberts a kol. (1990a) vede ke zdárnému dokončení maturace a počátku klíčení. Obdobné výsledky získali i Webster a kol. (1990). Při nižších koncentracích ABA embrya netvořila kořenový pól nebo předčasně klíčila, po zvýšení koncentrace na 40-60 μM ABA byl vývoj embryí optimální a embrya předčasně neklíčila. Předčasné klíčení somatických embryí *Picea glauca* zrajících v bioreaktoru se zastavilo při koncentraci 50 μM ABA (Attree a kol., 1994).

Důležitým faktorem je také doba, po kterou je embryogenní kultura vystavena působení ABA. Nadměrná doba působení ABA na klíčící embrya nebo příliš vysoká koncentrace mají za následek inhibici klíčení, špatný vývoj děloh a hypokotylu (Boulay a kol., 1988).

Vývoj somatických embryí zrajících na médiu v prvním týdnu bez růstových regulátorů po přenosu do podmínek *ex vitro* zkoumali Högborg a kol. (2001). Embrya vykazovala vysokou klíčivost (až 100 %). Mladé rostliny vykazovaly dynamický růst a měly dobře vyvinutý kořenový systém i s postranními kořeny. Oproti tomu rostliny, jež se vyvinuly z embryí zrajících po celou dobu na médiu s ABA, se přizpůsobovaly vnějším podmínkám hůř a rostly výrazně pomaleji.

Bozhkov a von Arnold (1998) v anatomické studii uvádí, že výrazný vliv na klíčení embryí má koncentrace PEGu používaná během stádia maturace, viz. kap. 4.4.3. Po aplikaci PEGu, i přes anatomické aberace v embryích byla u klíčnicích rostlin po

následném přenesení do podmínek *ex vitro* pozorována inhibice růstu hlavních i postranních kořenů. Ve venkovních podmínkách se podařilo aklimatizovat 56 % rostlin (u kontrolní varianty 100 %). Všechny aberace způsobené PEGem byly neznatelné již po půl roce pěstování rostlin v umělém substrátu (Bozhkov a von Arnold, 1998). Ke stejnému výsledku dospěli i Högborg a kol. (2001). Autoři uvádí, že po přenosu do *ex vitro* podmínek nebyl patrný žádný negativní vliv PEGu na přežívání rostlin ani růst kořene.

Přestože Kong a Yeung (1995) zjistili pozitivní vliv PEGu na výtěžek somatických embryí u *Picea glauca*, v následující fázi byla prokázána neschopnost embryí optimálně klíčit, a to i po desikaci. Naopak Attree a kol. (1995) popisuje, že při klíčení somatických embryí *Picea glauca* kultivovaných na médiu s 7,5 % PEGem nebyly pozorovány žádné abnormality.

Jiný autor (Find, 1997) poukázal na to, že somatická embrya *Picea abies* zrající na médiu s přídavkem 5 % PEGu klíčí jen s nízkou frekvencí, pravděpodobně kvůli morfologickým změnám ve vnitřní stavbě embryí. Embrya zrající na médiu bez PEGu se pak vyvíjí normálně, ale s menšími výtěžky. Autor dále popisuje, že i přes menší výtěžky vzniklá zralá embrya neobsahovala žádné abnormální mezibuněčné prostory a klíčila s vysokou frekvencí.

Někteří autoři používají aktivní uhlí (AC - activated carbon) jako nedílnou složku klíčícího média. Koncentrace 0,5-1 % AC v kultivačním médiu brání negativnímu působení fenolických látek a slouží k lepší difúzi plynů (Lulsdorf a kol., 1992). Pullman a kol. (2005) uvádí, že nedílnou složkou média u *Picea abies* v této fázi SE je ABA spolu s aktivním uhlím. Kombinace obou látek zaručuje vyšší výtěžky somatických embryí a zralá kotyledonární embrya. Somatická embrya po kultivaci jsou větší, mají větší apikální část a vyvinutější epykotyp, takže jsou lépe připravena na stádium klíčení. Kombinace ABA a AC je podrobně popsána v práci, která je patentována – U. S. Pat. No. 5034326 a No. 5036007 (Pullman a Gupta, 1991; Gusta a Grob, 1995).

4.7. Přeměna v rostlinu (konverze)

Stádium konverze završuje proces SE, kdy vyklíčené embryo přechází v plně autotrofní rostlinu. Během konverze je nutné, aby se embryo adaptovalo na podmínky *ex vitro*, především na plně autotrofní výživu v substrátech. Rostliny se přizpůsobují nejprve skleníkovým a poté polním podmínkám (nižší vzdušná vlhkost, přítomnost

mikroorganismů atd.). S vyšší vlhkostí souvisí možná kontaminace kultur plísňovými a houbovými chorobami. Nejčastěji se rostliny sází do směsi rašeliny a perlitu v poměru 1:1 (v/v). Pro některé druhy je optimální směs rašeliny, písku a perlitu (1:1:1 v/v/v) nebo substrát Klasman seedlings spolu s přidavkem písku.

Jeden z prvních úspěšných převodů somatických rostlin *Picea abies* do nesterilního prostředí se podařil autorům von Arnold a Hakman (1988). U stromů vypěstovaných *in vitro* nebyly pozorovány žádné odchylky v jejich růstu a morfologii ve srovnání se stromy vypěstovanými ze semen (Chalupa 1989, 1996). Stromy vypěstované ze somatických embryí měly ortotropní růst a nebyly u nich pozorovány žádné morfologické abnormality. Výškový a tloušťkový růst listnatých druhů dřevin, vzniklých ze somatických embryí, nebyl významně rozdílný od růstu stromů vypěstovaných ze semen (Chalupa, 2000).

4.8. Možné faktory regulující SE

SE se v mnoha směrech podobá embryogenezi zygotické. Informace o fyziologických a biochemických procesech v semenech resp. zygotických embryích jehličnanů jsou zatím nedostatečné. Zygotická embrya se rychle stala modelovým materiálem pro studium somatické embryogeneze. Přestože oba embryonální systémy jsou rozdílné, je možno považovat některé děje a fyziologické charakteristiky v zygotické embryogenezi za paralelní a poplatné i v embryogenezi somatické.

4.8.1. Genotyp

Proces embryogeneze je významným způsobem ovlivněn genotypem. Během embryogeneze probíhá exprese embryo-specifických genů, jejichž mRNA se objevuje a je degradována v různých fázích vývoje embrya. U nahosemenných rostlin můžeme vývojově regulované geny, které se exprimují během vývoje embrya, rozdělit do několika skupin (Misra, 1994).

První skupinou jsou geny konstitutivně exprimované, jejichž produkty jsou přítomny ve všech stádiích vývoje embrya, jiná skupina genů je exprimována pouze během časně embryogeneze a další skupina pouze během klíčení. Poslední skupinou jsou geny exprimované hojně v období pozdní embryogeneze (late embryogenesis abundance - LEA).

Expres každé sady genů je kontrolována specifickými regulačními signály. Vlivy aktivující specifické geny během konkrétních vývojových fází embryogeneze nejsou dosud dobře známy; von Arnold a kol. (2002) vytvořili hypotézu rozpustných signálních molekul.

K podpoře embryogeneze některých kultur je používáno kondiciované médium z embryogenních kultur. Např. kondiciované růstové médium z vysoce embryogenních kultur může indukovat embryogenezi u neembryogenních kultur mrkve (Hari, 1980). Růstové médium prekondiciované suspenzí kulturou také může indukovat embryogenezi u buněk kultivovaných za nízké buněčné hustoty (de Vries a kol., 1988). Tato schopnost kondiciovaného média udržet nebo stimulovat somatickou embryogenezi ukazuje, že vylučované rozpustné signální molekuly hrají významnou úlohu.

LEA geny (proteiny) jsou skladovány v dehydratovaném semeni a jsou rychle degradovány během hydratace a klíčení semen (Skriver a Mundy, 1990). Obecně LEA proteiny plní ochrannou funkci v rostlinné buňce během stresových situací. Expres většiny LEA genů je stimulována stresovým ošetřením rostliny, jako jsou poranění, zasolení a chlad. LEA geny jsou hydrofilní. Jejich ochranná funkce spočívá ve stabilizaci ostatních proteinů a pravděpodobně i membrán. Tímto ochranným mechanismem zřejmě působí během desikace, dormance a opětovné hydratace semen (Dure a kol., 1989). Během zrání somatických embryí má pozitivní vliv na hladinu těchto genů přítomnost ABA a osmotika (Skriver a Mundy, 1990).

4.8.2. Proteiny

Analýzou kondiciovaných médií embryogenních kultur bylo zjištěno, že kultury vylučují během svého zrání některé látky do média např. arabinogalaktanové proteiny, enzymy a lipochitooligosacharidy (De Jong a kol., 1992; Egertsdotter a kol., 1993; Dyachok a kol., 2002). Egertsdotter a kol. (1993) prokázali přítomnost extracelulárních proteinů v kultivačním médiu u několika embryonálních buněčných linií *Picea abies*. Některé zjištěné proteiny byly společné u všech studovaných linií, jiné byly specifické pro některé linie. Autoři se domnívají, že extracelulární proteiny mohou stimulovat embryogenní procesy. Egertsdotter a von Arnold (1998) uvádí, že endochitináza z cukrové řepy stimuluje rané fáze vývoje somatických embryí u *Picea abies*. Jedním z extracelulárních proteinů běžně se nacházejícím v kultivačním médiu jsou arabinogalaktanové proteiny (AGP).

AGP jsou heterogenní skupinou komplexů makromolekul složených z polypeptidů, rozsáhle větvených glykanových řetězců a lipidů (Majewska-Sawka a Nothnagel, 2000). AGP jsou přítomny v buněčných stěnách a plazmatických membránách a během kultivace se uvolňují do média. Extrakt AGP z kultivačního média a ze semen *Picea abies* podpořil vývoj a zrání somatických embryí u málo embryogenních linií *Picea abies* (Egertsdotter a von Arnold, 1995). Při analýze extraktu ze zralých semen byl zjištěn protein podobný chitináze z cukrové řepy. Tento protein měl pozitivní vliv na časný vývoj somatických embryí *Picea abies* (Egertsdotter a von Arnold, 1993). Iraqi a kol. (2005) pomocí imunodetekce zjistili, že během zrání somatických embryí *Picea mariana* kultura vylučuje do média enzym, apoplastickou invertázu, která zde štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Autoři předpokládají, že invertáza stimuluje zrání somatických embryí tím, že vytváří potřebné množství hexóz, které se podílejí na vývoji embrya.

Mezi další molekuly, které jsou do média vylučovány embryogenní kulturou, patří lipochitooligosacharidy (LCO). Jde o skupinu signálních molekul, které podporují dělení rostlinných buněk. Přítomnost LCO v médiu stimuluje buněčné dělení a vývoj embryogenní kultury a somatických embryí u *Picea abies* (Dyachok a kol., 2002). Pokusy s *Picea abies* dokazují, že endogenní hladina LCO spolu s Nod faktorem brzdí programovou buněčnou smrt (programmed cell death - PCD) a stimuluje proliferaci ESM a formování somatických embryí. Hladina LCO vylučovaná do média může být ukazatelem embryogenního potenciálu proliferující kultury (Wiweger, 2003).

4.8.3. Ostatní vlivy

Většina kultivačních protokolů SE jehličnanů využívá pro celý proces kultivace pevná kultivační média. Kvalita somatických embryí pěstovaných na pevných médiích je v současnosti vyšší než na médiích tekutých a zároveň proces kultivace na pevných médiích je jednodušší. Dosavadních zkušeností s kultivací na tekutých médiích souvisí s využitím bioreaktorů, u kterých produkce somatických embryí může dosáhnout až 10 000 embryí na litr média (Gupta a kol., 1993). Tautorus a kol. (1990) zjistili, že produkce embryí na tekutých médiích je 3x vyšší, ale stabilita embryogenní kultury v bioreaktorech je nižší ve srovnání s kultivací na pevných médiích. Hakman a von Arnold (1988) úspěšně ověřili možnost dlouhodobé kultivace udržovací embryogenní kultury *Picea glauca* na tekutém kultivačním médiu.

Vágner a kol. (2001) uvádí, že na pevných živných půdách je možné získat u jehličnanů podstatně lepší výsledky ve srovnání se suspenzními kulturami: nikoli kvantita, ale kvalita získaných somatických embryí je vyšší.

Další možností na tekutých médiích je spojena s použitím prámků (LifeRafts, Osmotec, Israel), což bylo publikováno u řady rostlinných explantátových kultur (např. Watad a kol., 1995). Výhodou této metody je, že během kultivace nedochází ke kontaktu pracovních nástrojů a embryogenní kultury, protože je přenášén celý prámek. Tento způsob kultivace také zajišťuje snadnou manipulaci a zvýšení výměny látek mezi embryogenní kulturou díky dostatečnému provzdušnění kultur. Kultivaci na prámcích u *Picea abies* používají např. Pâques a kol. (1992), Gorbatenko a Hakman (2001) a Vágner a kol. (2005b).

Kultivační nádoba představuje uzavřený systém s velmi omezenou možností výměny látek s vnějším prostředím. Atmosféra, která se uvnitř nádoby vytváří, tak oproti atmosférickému vzduchu vykazuje výrazné odlišnosti.

Plynná fáze je charakterizována vysokou vzdušnou vlhkostí, dosahující téměř 100 %. Respirací a uvolňováním plyných látek rostlinnými pletivy se složení atmosféry dále mění (klesá obsah kyslíku, zvyšuje se koncentrace oxidu uhličitého a ethylenu), což může zpětně ovlivňovat morfogenezi *in vitro*. Obecně lze říci, že proces zrání somatických embryí je podporován nízkým parciálním tlakem kyslíku (pO_2) a vysokým parciálním tlakem oxidu uhličitého (pCO_2). Jak uvádí Kvaalen a von Arnold (1991) u *Picea abies*, mohou být tyto podmínky vhodným signálem zahajujícím maturaci a zajišťujícím její bezproblémový průběh (nedochází např. k hnědnutí kultury). Obdobné výsledky byly získány i u *Picea mariana* autory El Meskaoui a Tremblay (1999). V uzavřených nádobkách (nízký pO_2 , vysoký pCO_2) byl výtěžek zralých embryí 10x vyšší, než v nádobkách s možností výměny plynů, kde se tvořila především předčasně klíčící embrya (El Meskaoui a Tremblay, 1999). Jak uvádí Kvaalen a von Arnold (1991) záleží i na koncentraci ABA v maturačním médiu. Stimulační efekt popsanych podmínek byl u *Picea abies* evidentní při použití 7,6 μM ABA; na médiu s 60,8 μM ABA byl požadavek na pO_2 a pCO_2 spíše opačný (Kvaalen a von Arnold, 1991).

Nízký obsah kyslíku a naopak vysoký obsah oxidu uhličitého simulují podmínky, jimž je přirozeně vystaveno zygotické embryo v semeni. Semenné obaly totiž také představují

bariéru, která znemožňuje volnou výměnu plynů s okolní atmosférou (El Meskaoui a Tremblay, 1999).

Bozhkov a kol. (2002a) pozorovali změny pH média během kultivace a zjistili, že tyto změny hrají významnou roli při utváření raných somatických embryí *Picea abies*. Krátce po přenosu na maturační médium, kdy u sledovaného genotypu *Picea abies* docházelo ke zvýšení počtu raných somatických embryí, pozorovali výrazný pokles pH média, zvláště u varianty bez růstových regulátorů v první pasáži, kde došlo k poklesu až na pH 4,0. Pufrování média na pH 4,5, popřípadě 5,8 vedlo k pozastavení tvorby raných somatických embryí a inhibici programované buněčné smrti.

Mezi další vlivy, které mohou významně ovlivnit SE patří např. světelný režim (von Arnold, 1987; Jokinen a Durzan, 1994; Kvaalen a Appelgren, 1999; Latkowska a kol., 2000), interval pasážování (von Arnold, 1987; Jokinen a Durzan, 1994), klíčivost semen (Tremblay, 1990), kultivační teplota (Chalupa, 1997) atd.

5. Materiál a metody

5.1. Rostlinný materiál

K pokusům byla použita embryogenní kultura smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.), linie **AFO 541**. AFO 541 bylo získáno jako dar od RNDr. Martina Vágnera, CSc z Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Linie AFO 541, byla odvozena ve francouzském institutu AFOCEL z děloh pětidenních semenáčků (Galerie a kol., 1992; Ruaud a kol., 1992).

Zároveň byla použita semena (*Picea abies* /L./ Karst.) z rozdílných proveniencí v rámci České Republiky, viz. tab. č. 1. K pokusům byla použita zralá semena (sběry v letech 1999-2003) z níže zmíněných přírodních lesních oblastí (PLO):

Kód lokality	PLO - název lokality	LVS	Nadmořská výška	Klíčivost
7.5.	7 - Brdská vrchovina	5 - jedlobukový	700 m n.m.	83 %
12.5.	12 - Předhoří Šumavy a Novohrad. hor	5 - jedlobukový	600 m n.m.	75 %
25.6.	6 - Orlické hory	6 - smrkobukový	750 m n.m.	70 %
16.6.	16 - Českomoravská vrchovina	6 - smrkobukový	750 m n.m.	80 %

Tabulka č. 1 – Lokality

Embryogenní linie jsou označeny tříčíselným kódem (PLO, LVS, jedinečný identifikátor). Klíčivost semen byla zjišťována na začátku jednotlivých pokusů (ČSN 48 1211). Sterilizace semen byla provedena 15 % roztokem chlornanu sodného (SAVO), po dobu 20 minut, následovalo promytí semen ve sterilní destilované vodě (3x). Aby se dala embrya ze semen snadno vyjmout, byla semena ponechána po dobu čtyř hodin ve sterilní destilované vodě (Tremblay, 1990). Po skončení doby nabobtnání byla semena opět sterilizována (10 % roztok SAVO/20 minut) a následovalo promytí ve sterilní destilované vodě.

5.2. Kultivační podmínky

Iniciace i všechny další experimenty byly prováděny na Katedře dendrologie a šlechtění lesních dřevin Fakulty lesnické a dřevařské, České zemědělské univerzity v Praze (KDŠLD, FLD, ČZU).

Kultury byly založeny a dále pasážovány za aseptických podmínek v laminárním flow-boxu (Heraeus LaminAir HP48), viz. obr. O1. Kultivace probíhala v klimatizované kultivační místnosti buď tmavé (stádium iniciace a proliferace) nebo v místnosti s pravidelnou fotoperiodou v závislosti na fázi vývoje embryogenní linie. Stádium maturace, germinace a konverze probíhalo v kultivační místnosti s 16 hodinovou světelnou fází (zářivkové osvětlení Philips o výkonu 36 W a svítivosti $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 8 hodinovou temnostní fází. Kultivační místnosti mají stálou teplotu $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Všechna média použitá při pokusech byla složena ze tří složek. Složky A (makroelementy; Sigma) a B (mikroelementy; Sigma) byly uchovávány odděleně ve formě zásobních roztoků při 4°C . Složka C (růstové regulátory; Sigma) byla před přidáním do média uchovávána v mrazicím boxu při teplotě -18°C ve formě zásobních roztoků. Růstové regulátory byly rozpuštěny v 1M KOH bez další úpravy pH.

Do připravovaného média byla ke ztužovacímu činidlu (agar; RNDr. Jan Kulich, s.r.o.) přidána složka A, B i C před sterilizací.

Koncentrace složek A, B a C jsou proměnlivé dle typu média a managementu pokusu, základní složení viz. tab. č. 2. LP (1-11) médium bylo ve většině stádií SE obohaceno o myo-inositol (100 mg.l^{-1}), kasein hydrolyzát (500 mg.l^{-1}), glutamin (450 mg.l^{-1}), sacharózu (30 g.l^{-1} ; Lach-Ner, s.r.o.) a agar (6 g.l^{-1}), pokud není uvedeno jinak. GD (1-7) médium bylo ve většině stádií SE obohaceno o myo-inositol (1000 mg.l^{-1}), kasein hydrolyzát (500 mg.l^{-1}), glutamin (450 mg.l^{-1}), sacharózu (30 g.l^{-1} ; Lach-Ner, s.r.o.) a agar (6 g.l^{-1}), pokud není uvedeno jinak. Po úpravě pH na 5,8 byla média sterilizována v autoklávu (20 minut při 121°C a $0,144 \text{ MPa}$). Po sterilizaci byla média rozlita do kultivačních nádob s rozdílným objemem v závislosti na daném stádiu SE. Všechny chemikálie byly použity od firmy Sigma pokud není uvedeno jinak.

	Složka A a B	Médium	
		LP [mg.l ⁻¹]	GD [mg.l ⁻¹]
		(Von Arnold a Erikson 1981)	(Gupta a Durzan, 1986)
Makroelementy	NH ₄ NO ₃	1200	275
	KNO ₃	950	2340
	CaCl ₂ .2H ₂ O	102,5	166
	MgSO ₄ .7H ₂ O	185	185
	KH ₂ PO ₄	170	85
	FeSO ₄ .7H ₂ O	13,9	19
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	18,6	14
	MnSO ₄ .4H ₂ O	11,2	8,45
Mikroelementy	ZnSO ₄ .4H ₂ O	4,3	4,915
	H ₃ BO ₃	3,1	3,1
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01	0,0125
	KI	0,4	0,415
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01	0,0068
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,12	0,125
	Thiamin HCl	1	0,5
	Nikotinová kyselina	0,5	0,25
	Pyridoxin HCl	0,5	0,25
	Glycin	2	1
	Myo–inositol	100	1000

Tabulka č. 2 – Složení média LP a GD

5.3. Iniciace ESM

K iniciaci ESM byla použita modifikovaná média GD (1-4) a LP (1-5), viz. tab. č. 2, s rozdílnými hladinami růstových regulátorů, viz. tab. č. 3. Tato média byla vybrána na základě protokolů von Arnold (1987), Becwar a kol. (1988), Attree a kol. (1995), Vágner a kol. (2005a). Médium bylo po upraveno na pH 5,8 a nalito do kultivačních nádob typu lékovka (cca 25 ml roztoku v 100 ml nádobě), viz. obr. č. O5. Médium bylo odměřeno pomocí dávkovače Hirschmann Ceramus.

		Růstové regulátory [mg.l ⁻¹ (μM)]			
		2,4-D	BAP	kinetin	NAA
Médium	LP1	2 (10)	1 (5)	x	x
	LP2	1 (5)	1 (5)	x	x
	LP3	2 (10)	1 (5)	x	1 (10)
	LP4	2 (10)	1 (5)	1 (5)	x
	LP5	x	1 (5)	1 (5)	x
	GD1	x	0,4 (2)	0,4 (2)	x
	GD2	x	0,8 (4)	0,8 (4)	x
	GD3	1,1 (5)	0,4 (2)	0,4 (2)	x
	GD4	2,2 (10)	0,8 (4)	0,8 (4)	x

Tab. č. 3 – Iniciační média a hladiny růstových regulátorů

Jako primární explantát byla použita zralá zygotická embrya *Picea abies* ze čtyř PLO. Embrya byla po sterilizaci a nabobtnání semen asepticky vypreparována ve flow-boxu pomocí skalpelu, pinzet a chirurgických jehel. Do každé kultivační nádoby byla vložena celkem tři embrya. Semena byla při preparaci řezána tak, aby nedošlo k poškození, případně došlo jen k minimálnímu poškození embryí.

Výsledky indukce byly vyhodnocovány v průběhu 4-8 týdnů. Jako optimální výsledek fáze indukce je embryogenní pletivo schopné dalšího vývoje, proto vzniklá pletiva byla rozčleněna na embryogenní a neembryogenní (Egertsdotter a kol., 1993; 1995). Embrya nereagující na kultivační podmínky, vytvořené neembryogenní pletivo a stejně tak kultury kontaminované byly počítány jako neembryogenní. Do dalších fází SE bylo možno zařadit jen ty embryogenní linie, které vytvořili ESM.

5.4. Proliferace

K pokusu s proliferací byla použita rovněž živná média LP (1, 3-5) a GD (3 a 4), viz. tab. č. 2. Tato média byla zvolena na základě metodik autorů von Arnold a Hakman (1986), Jokinen a Durzan (1994), Vágner a kol. (1998). Srovnávací médium pro linii AFO 541 bylo zvoleno na základě metodiky Vágner a kol. (1998, 2005a). Média se lišila proměnlivou koncentrací auxinů a cytokininů (2,4-D, BAP, NAA a kinetin), viz. tab. č. 4.

		Růstový regulátor [mg.l ⁻¹ (μM)]			
		2,4-D	BAP	kinetin	NAA
Médium	LP1	2 (10)	0,4 (2)	x	x
	LP3	2 (10)	0,4 (2)	x	1 (10)
	LP4	2 (10)	0,4 (2)	1 (5)	x
	LP5	x	0,4 (2)	1 (5)	x
	GD3	1 (5)	0,4 (2)	0,4 (2)	x
	GD4	2 (10)	0,8 (4)	0,8 (4)	x

Tab. č. 4 – Proliferační média a hladiny růstových regulátorů

Vzniklé embryogenní pletivo z předchozí fáze bylo změřeno a sterilní pinzetou umístěno na proliferační médium vždy po jedné embryogenní linii v jedné lahvičce. Kultivační nádoby byly použity stejně jako v předchozím stádiu – typ lékovka (cca 25 ml roztoku v 100 ml nádobě), viz. obr. č. O5. Médium bylo odměřeno pomocí dávkovače Hirschmann Ceramus.

Měření ESM bylo prováděno v lahvičce pomocí milimetrového papíru. Pro měření přírůstu byl použit milimetrový papír, který byl pro vyhodnocování výsledků umístěn pod kulturami, viz. obr. č. O7-8. K vyhodnocení vhodného média pro potřebu proliferace bylo použito metody plošného přírůstu ESM v čase. Odečítala se plocha ESM podle zakrytých okének na milimetrovém papíře (okénka plně zakrytá byla počítána jako 1 mm², částečně zakrytá okénka po obvodě byla sečtena a vydělena dvěma, poté přičtena k plně zakrytým okénkům). Jiné metody měření (např. vážení čerstvé ESM, stanovení sušiny) nebyly vzhledem k možné kontaminaci kultur prováděny.

Počáteční stav ESM byl zaznamenán (týden 0), přírůsty ESM pak byly sledovány v intervalu 4 a 8 týdnů po nasazení na pokusná média. Vždy po dvou týdnech kultivace byly kultury makroskopicky sledovány a přeneseny ve sterilních podmínkách na čerstvé živné médium stejného složení.

Pro udržování embryogenní kultury je důležité, aby neztratila embryogenní schopnost a byla schopna maximálního růstu, vzhledem k dalším fázím SE (maturace). Za optimální stav byl při vyhodnocování fáze proliferace považován maximální nebo významný přírůst ESM v čase (v porovnání s 0 týdnem) beze změn v embryogenní schopnosti ESM, viz. kap. 4.3.1. Jako nevyhovující byly vyhodnoceny ty linie, které ztratily embryogenní schopnost (hnědly, kalusovatěly, apod.), neměnily nebo zmenšovaly svou velikost. Počet opakování pokusu je rozdílný, vzhledem rozdílné růstové dynamice ESM jednotlivých embryogenních linií.

5.5. Maturace

Pro navození procesu zrání somatických embryí byla ESM přenesena na maturační médium, které se od proliferačního média výrazně liší ve složce C (vynecháním auxinů a cytokininů). Jako maturační média byla použita modifikovaná LP (6-7) a GD (5) média, viz. tab. č. 2. Média, hladiny růstových regulátorů a osmotik byla volena na základě protokolů Attree a kol. (1995), Vágner a kol. (1998) a Ulrychová (2004). Do maturačního média byly přidány proměnlivé koncentrace kyseliny abscisové ($\pm$ cis, trans-ABA, Sigma), viz. tab. č. 5. Zásobní roztok ABA byl připravován rozpuštěním v 1M KOH a uchováván v chladicím boxu (-18 °C) vždy jen po minimálně nutnou dobu. K navození osmotického stresu bylo použito vysokomolekulární nepenetrující osmotikum polyethylenglykol 4000 (PEG-4000, Sigma) s konstantní hladinou (20 g.l⁻¹), viz. tab. č. 5. Médium GD5 bylo doplněno o pufr MES (kyselina 2-N-morfolinoethansulfonová 60 mg.l⁻¹; Sigma).

		Růstový regulátor [mg.l ⁻¹ (μ M)]	Osmotikum [g.l ⁻¹ (%)]
		ABA	PEG
Médium	LP6	2 (7,5)	20 (2)
	LP7	6 (23)	20 (2)
	LP8	10 (38)	20 (2)
	GD5	5 (19)	20 (2)

Tab. č. 5 - Maturační média a hladiny růstových regulátorů

Proliferující ESM byla přenesena na maturační médium. Velikost ESM odpovídala 8 týdnu na proliferačním médiu. Do jedné lahvičky byly umístěny 1-4 kusy embryogenního pletiva, v závislosti na velikosti. Plocha média byla zakryta ze 60-80 % z důvodu

optimální synchronizace zrání. V této fázi SE byly použity jiné kultivační nádoby (objem nádobky 200 ml, množství média 30 ml). Cílem bylo vypěstovat na médiu jasně diferencovaná optimálně vyvinutá somatická embrya s maximálním výtěžkem. Jako optimální výsledek této fáze byla vyhodnocena ta embrya, která měla mezi 4-8 děloh, dobře vyvinutý hypokotyl a založenou kořenovou čepičku, viz. O9. Embrya s jiným morfologickým uspořádáním (menší resp. větší počet děloh, nevyvinutý hypokotyl apod., viz. kap. 4.4.2. a kap. 7.3.) neměla optimální parametry pro další vývoj, a s velkou pravděpodobností by nebyla schopna přejít do další fáze SE. Morfologická kritéria byla volena na základě protokolů Egertsdotter a von Arnold (1995), Svobodová a kol. (1999) a Stasolla a kol. (2002).

Vzhledem k výsledkům z první a druhé fáze SE byly ve fázi maturace použity pouze ty embryogenní linie, které měly optimální růstové schopnosti. Počet linií i materiálu pro opakování pokusu se snížil, protože z hlediska morfologie nevyhovovaly daným kritériím všechny kultury.

Byl sledován vývoj vznikajících somatických embryí, barevné změny a počet vyvinutých embryí na 1 cm² (určován jako průměrná hodnota z deseti měření), vzhledem k použité koncentraci ABA. Kultury byly ponechány na maturačním médiu nejdéle 8 týdnů, vždy s ohledem na růstovou dynamiku embryí. Po 4 týdnu pak byly přeneseny na čerstvá živná média stejného složení.

5.6. Desikace

Po stádiu maturace byla polovina zralých somatických embryí vystavena působení desikace (Roberts a kol., 1990b). Kontrolní nedesikovaná varianta byla z maturačního média sterilně přenesena na médium germinační.

Somatická embrya byla desikována postupem tzv. pomalé desikace (HRH), tzn. za vysoké relativní vzdušné vlhkosti po dobu 3 týdnů (Roberts, 1991). Embrya byla pinzetou vyjmuta z kalusu a ve flow-boxu přenesena do předem připravené Petriho misky, viz. obr. č. O13a. Uzavřené Petriho misky (ø = 10 resp. 15 cm) obsahovaly tři vrstvy filtračního papíru a 1-4 otevřených Petriho misek (ø = 4 resp. 6 cm) s jednou vrstvou filtračního papíru (Vágner a kol., 2005a). Vše bylo zabaleno proti vnikání přebytečné vlhkosti a sterilizováno. Soubor misek byl vysterilizován autoklávováním (20 minut při 121 °C a 0,144 MPa).

Ve sterilních podmínkách bylo na trojvrstvý filtrační papír nalito cca 10-15 ml sterilní destilované vody, na suchý filtrační papír ve vnitřních miskách bylo horizontálně umístěno 10-40 izolovaných somatických embryí. Aby nedošlo k prudkému vysušení, byla již izolovaná SE udržována v uzavřené Petriho misce. Uzavřená Petriho miska byla utěsněna dvěma vrstvami parafilmu. Desikace probíhala v kultivačním klimatizovaném boxu se světelným režimem 16 h světlo/8 h tma, při teplotě 17 °C a za vysoké relativní vzdušné vlhkosti. Přibližně jednou za 5 dní byla kontrolována těsnost uzavření a obsah vlhkosti uvnitř Petriho misek. V případě nutnosti byla v aseptických podmínkách dolita sterilní destilovaná voda a misky opět utěsněny parafilmem.

Pro desikaci byla vybírána embrya, která makroskopicky nejevila žádné abnormality či poruchy v morfologické struktuře a měla plně vyvinuté dělohy.

5.7. Germinace

Ve stádiu klíčení (desikovaná i nedesikovaná varianta) byla zralá somatická embrya sterilně přenesena na kultivační médium LP a ½ GD, viz. tab. č. 2, zcela bez fytohormonů nebo jen se slabým přídatkem fytohormonů (IBA) a aktivním uhlím, viz. tab. č. 6. Média v této fázi byla vybrána na základě protokolů Becwar a kol. (1989) a Gupta a Grob (1995).

		AC [g.l ⁻¹ (μM)]	Růstový regulátor [mg.l ⁻¹ (μM)]
		AC	IBA
Médium	LP9	x	x
	LP10	3 (250)	x
	1/2 GD6	4 (333)	x
	GD7	x	x
	LP11	x	0,4 (2)

Tab. č. 6 – Germinační média, hladiny růstových regulátorů a AC

LP (9-11) i ½ GD (6) médium bylo obohaceno o myo-inositol (100 mg.l⁻¹), kasein hydrolyzát (500 mg.l⁻¹), glutamin (450 mg.l⁻¹), sacharózu (10 g.l⁻¹; Lach-Ner, s.r.o.) a agar (6 g.l⁻¹). Médium ½ GD6 bylo doplněno o pufr MES (60 mg.l⁻¹; Sigma). Po úpravě pH na 5,8 byla média sterilizována v autoklávu (20 minut při 121 °C a 0,144 MPa). Po sterilizaci byla média rozlita do kultivačních nádob (Erlenmayerova baňka – objem 300 ml, obsah

média 50 ml, viz. obr. O16-17). Média s aktivním uhlím byla pravidelně promíchávána až do vychladnutí, aby se aktivní uhlí neusazovalo na dně baňky a bylo rozptýleno rovnoměrně. Do jedné Erlenky bylo sterilně vloženo maximálně 8 embryí jedné embryogenní linie.

V této fázi bylo cílem kultivace dosáhnout rozvoje juvenilních rostlinek ze zralých somatických embryí, tedy jejich prodloužení a vývoje kořínků i nadzemních částí. Stav pokusu byl vizuálně hodnocen po čtyřech až pěti týdnech kultivace (materiál byl pokládán na čerstvé médium každé 2-3 týdny). Byl hodnocen stav rostlinek – vývoj nadzemní a kořenové části rostliny. Za vyhovující byla považována rostlina, schopná dalšího vývoje, s vyvinutou nadzemní i kořenovou částí a s fenolovým (červeným) proužkem, viz. kap. 7.4. Za nevyhovující byly považovány ty rostliny, které vykazovaly morfologické abnormality nebo neměly vyvinuté některé životně důležité části (dostatečně vyvinutá kořenová část atd.) pro přenesení rostlin do podmínek *ex vitro* podmínek, viz. kap. 7.4. Základní morfologická kritéria pro stádium germinace byla volena na základě protokolů Bozhkov a von Arnold (1998) a Stasolla a kol. (2002),.

5.8. Přehled experimentů

Tato kapitola poskytuje stručný přehled prováděných experimentů. Bude zde podrobně uvedeno množství hodnoceného materiálu a počet opakování pro jednotlivé fáze pokusů.

Ve všech stádiích SE byly makroskopicky sledovány základní anatomické a morfologické parametry kultur nezbytné pro další optimální vývoj explantátů; tyto parametry jsou podrobně rozebrány a uvedeny v kapitole diskuse (kap. 7.1.-7.4.). V žádném z těchto experimentů nebyla použita anatomická, histologická, morfologická či jiná doplňující analýza (biochemický rozbor, barvení vzorků, apod.), protože by došlo k narušení kultur a tím narušení kontinuity pokusů. Všechny následující hypotézy byly testovány na hladině významnosti 0,05.

5.8.1. Stádium iniciace

- 1) ověření hypotézy: č. 1 - Médium má signifikantní vliv na iniciaci ESM vzniklé ze zralých semen *Picea abies*.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi médii.

H1: Existují signifikantní rozdíly mezi médii.

- 2) ověření hypotézy č. 2 - Lokalita má signifikantní vliv na indukci ESM vzniklé ze zralých semen *Picea abies*.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi lokalitami.

H2: Existují signifikantní rozdíly mezi lokalitami.

- 3) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejúspěšnější média (GD1-4, LP1-5).
- 4) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejvhodnější hladiny růstových regulátorů (2,4-D, BAP, kinetin a NAA).
- 5) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejvhodnější lokality, resp. vhodné embryogenní linie, pro stádium iniciace.

K tomuto pokusu bylo použito celkem 4320 zralých semen. U každého média (celkem 9 médií) byly testovány čtyři lokality (**7.5.**, **12.5.**, **25.6.**, **16.6.**). Na jedno opakování bylo použito 40 semen, počet opakování pro jednu lokalitu byl tři. Na počátku stádia iniciace bylo celkem 4320 primárních explantátů, na konci fáze iniciace bylo jen 383 embryogenních linií.

5.8.2. Stádium proliferace

- 6) ověření hypotézy č. 6 - Na růst ESM kultur *Picea abies* má signifikantní vliv kultivační médium pro 4, resp. 8 týdnů kultivace.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi médii.

H6: Existují signifikantní rozdíly mezi médii.

- 7) ověření hypotézy č. 7 - Embryogenní linie (genetická dispozice) má signifikantní vliv na proliferaci embryogenních kultur *Picea abies* pro 4, resp. 8 týdnů kultivace.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi embryogenními liniemi.

H7: Existují signifikantní rozdíly mezi embryogenními liniemi.

- 8) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejúspěšnější média, resp. nejvhodnější hladiny růstových regulátorů, pro dané stádium (4. a 8. týden).
- 9) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejvhodnější lokality, resp. vhodné embryogenní linie, pro stádium proliferace (4. a 8. týden).

- 10) Na základě statisticky zpracovaných výsledků bude stanovena (ne)vhodná délka subkultivace s ohledem na maximální výtěžek proliferující ESM.

K tomuto pokusu byly použity embryogenní linie z předchozí fáze označené třímístným identifikátorem, viz. kap. 5.1. Ve stádiu proliferace bylo sledováno celkem 43 embryogenních linií.

K porovnání výsledků nárůstu ESM v čase, jako vzorek 0, slouží linie AFO 541. AFO 541 je modelový systém, na kterém se zkoumají vlivy jednotlivých médií, růstových regulátorů, sacharidů, osmotik atd., viz. např. Svobodová a kol. (1999), Vágner a kol. (2005a, b). Linie AFO 541 je pro tento účel obzvláště vhodná, protože se v laboratorních podmínkách chová „standardně“ tedy bez větších výkyvů.

K tomuto pokusu bylo použito celkem 5 živných médií (LP1, 3-5 a GD3-4), které se lišily rozdílnými hladinami růstových regulátorů (2,4-D, BAP, kinetin a NAA). ESM byla sledována v čase (0., 4. a 8. týden) jako absolutní hodnota v poměru jednotlivých týdnů.

Vzhledem k rozdílné embryogenní schopnosti jednotlivých linií, která se začala projevovat po iniciaci ESM je počet opakování pokusu proměnlivý. Celkový počet opakování pro všechna média byl 1715; pro média GD (3 a 4) bylo použito celkem 1215 opakování a pro média LP 500 opakování. Pozorování proběhlo opět na čtyřech lokalitách (7.5., 12.5., 25.6., 16.6.).

5.8.3. Stádium maturace

- 11) ověření hypotézy č. 11 - Na výtěžek zralých somatických embryí *Picea abies* má signifikantní vliv kultivační médium (LP 6-8, GD5), resp. hladina ABA.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi médii.

H11: Existují signifikantní rozdíly mezi médii.

- 12) ověření hypotézy č. 12 - Embryogenní linie (genetická dispozice) má signifikantní vliv na výtěžek zralých somatických embryí *Picea abies*.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi liniemi.

H12: Existují signifikantní rozdíly mezi liniemi.

- 13) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejúspěšnější média, resp. nejvhodnější hladiny ABA pro dané stádium.

- 14) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejvhodnější lokality, resp. vhodné embryogenní linie, pro stádium maturace.

K tomuto pokusu byly použity všechny linie, které si uchovaly embryogenní schopnost ve stádiu proliferace (ESM). U všech linií (32 embryogenních linií včetně linie AFO 541) byl minimální počet opakování 5 a maximální pak 30 opakování pro jednu embryogenní linii. U linie AFO 541 bylo zvoleno pro maximální objektivitu výsledků zvoleno 30 opakování pro každé médium. Celkem bylo nasazeno 891 vzorků (včetně linie AFO 541). Pozorování proběhlo opět na čtyřech lokalitách (7.5., 12.5., 25.6., 16.6.).

5.8.4. Desikace a stádium germinace

- 15) ověření hypotézy č. 15 - Pomalé vysoušení (desikace) má signifikantní vliv na počet a kvalitu klíčnic rostlin *Picea abies* vzniklých ze SE.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi desikovanou a nedesikovanou variantou.

H15: Existují signifikantní rozdíly mezi desikovanou a nedesikovanou variantou.

- 16) ověření hypotézy č. 16 - Na kvalitu a počet klíčnic rostlin *Picea abies* má signifikantní vliv kultivační médium ve stádiu germinace.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi médii.

H16: Existují signifikantní rozdíly mezi médii.

- 17) ověření hypotézy č. 17 - Embryogenní linie (genetická dispozice) má signifikantní vliv na počet a kvalitu klíčnic rostlin *Picea abies* vzniklých při SE.

H0: Neexistují signifikantní rozdíly mezi liniemi.

H16: Existují signifikantní rozdíly mezi liniemi.

- 18) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejvhodnější média, resp. přísady germinačního média, pro danou fázi.

- 19) Na základě statisticky zpracovaných výsledků budou vyhodnoceny nejvhodnější lokality, resp. embryogenní linie, pro stádium germinace.

K tomuto pokusu byla použita zralá embrya ze všech linií, které se dostaly až do fáze germinace (klíčení). Celkem bylo použito 31 linií, včetně linie AFO 541. Jako germinační médium bylo zvoleno pět velmi rozdílných médií (GD 6, 7 a LP 9-10). Desikace embryí je vyhodnocena až v této fázi, protože vysoušení, jako samostatný proces, přímo navazuje

na fázi klíčení. Změny, které se v embryích vytváří při pomalém vysoušení se projeví až při klíčení. Bližší anatomická nebo morfologická studie během fáze desikace by embrya narušila natolik, že by nebyla schopna dalšího vývoje. Celkem bylo použito 1312 zralých embryí, z toho bylo vystaveno desikaci 877 embryí. Pozorování proběhlo opět na čtyřech lokalitách (7.5., 12.5., 25.6., 16.6.).

5.8.5. Proces somatické embryogeneze

- 20) Na základě statistických výsledků bude stanoveno, zda médium má signifikantní vliv na kultivaci *in vitro* kultur vzniklých ze zralých semen *Picea abies* ve většině fází SE.
- 21) Na základě statistických výsledků bude stanoveno, zda dispozice primárního explantátu má signifikantní vliv pro kultivaci *in vitro*, resp. na většinu fází SE.
- 22) Na základě statisticky zpracovaných výsledků bude stanoveno zda pro somatickou embryogenezi v praxi (studium i komerční propagaci) jsou vhodné jen některé (vybrané – ověřené) embryogenní linie (genotypy) *Picea abies* nebo jestli je tento proces vhodný i pro širší (komerční) využití.

6. Výsledky

U každého experimentu bylo stanoveno vyhodnocení dle základních kritérií, viz. kap. 5.1.-5.7., resp. kapitola 5.8.

Výsledky byly zpracovány matematicko-statistickými metodami s využitím programů STATGRAPHICS Centurion XV (<http://www.statgraphics.com/>) a SAS 9.1. Byly vypočítány základní statistické charakteristiky souborů dat, jakými jsou průměr, rozptyl, směrodatná odchylka, variační koeficient a příslušné kvantily. V případě splnění podmínek pro parametrické testování byla pro vyhodnocení použita analýza rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 %. Pokud nebyla splněna podmínka homogenity rozptylů popřípadě normality rozdělení dat, byla použita logaritmická transformace dat. Pakliže se ani po transformaci nepodařilo dosáhnout homogenity rozptylů a normality rozdělení, byl použit pro vyhodnocení neparametrický Kruskal-Wallisův test. Pro samotné vyhodnocování byly použity procedury ANOVA, Variance check, Kruskal-Wallisův test, Tukeyho test a další.

6.1. Iniciace

Pro fázi iniciace byl zjišťován vliv použitých médií, resp. hladiny růstových regulátorů na výsledky kultivace ESM. Stejně tak byl zjišťován vliv původu primárních explantátů na optimální průběh fáze iniciace (výsledný požadovaný stav – ESM), viz. kap. 5.8.1.

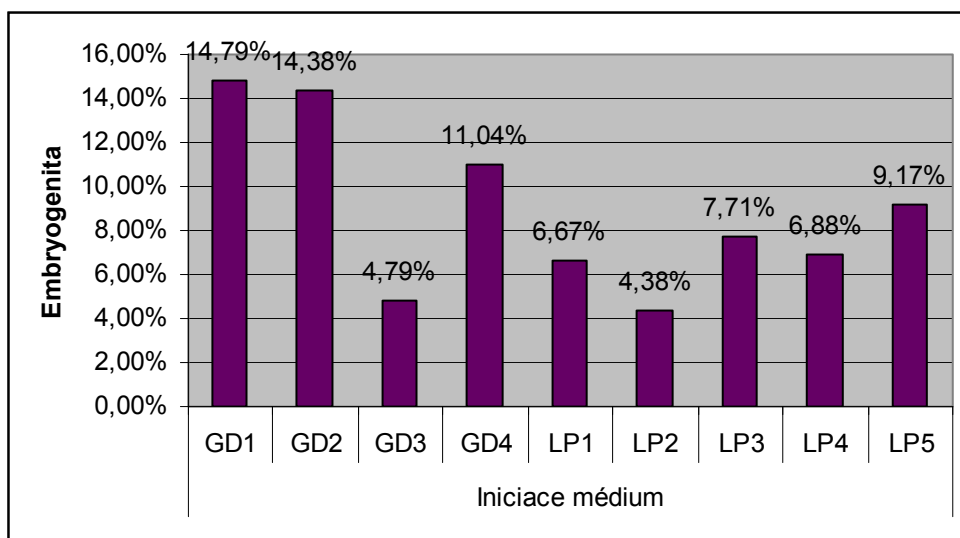
Průměrný počet vytvořené ESM v rámci celého pokusu byl 3,55 na 40 nasazených semen, tedy přibližně 8,87 %, při standardní odchylce 2,28, viz. tab. č. 7.

Embryogenita	Médium									Celkový průměr
Lokalita	GD1	GD2	GD3	GD4	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	
12.5.	18,33 %	19,17 %	8,33 %	11,67 %	8,33 %	6,67 %	7,50 %	11,67 %	13,33 %	11,67 %
16.6.	16,67 %	11,67 %	5,00 %	16,67 %	11,67 %	7,50 %	13,33 %	10,00 %	15,83 %	12,04 %
25.6.	8,33 %	15,83 %	4,17 %	6,67 %	4,17 %	2,50 %	6,67 %	3,33 %	2,50 %	6,02 %
7.5.	15,83 %	10,83 %	1,67 %	9,17 %	2,50 %	0,83 %	3,33 %	2,50 %	5,00 %	5,74 %
Celkový průměr	14,79 %	14,38 %	4,79 %	11,04 %	6,67 %	4,38 %	7,71 %	6,88 %	9,17 %	8,87 %

Tabulka č. 7 - Embryogenita ve stádiu iniciace

Nejvyšší embryogenity bylo dosaženo na GD1 médiu a to v průměru 5,92 embryogenních semen na 40 nasazených (14,79 % schopnost tvořit ESM z primárního explantátu), viz. kap. Přílohy Iniciace 12.1.1. (tab. č I1 a graf I1). Při použití Tukeyho testu statistické významnosti odlišnosti výsledků, (viz. tab. č. I3 a graf č. I2) bylo zjištěno, že statisticky

srovnatelných výsledků bylo dosaženo ještě na médiích GD2 a GD4 a to 5,75 resp. 4,42 průměrné hodnoty embryogenity na 40 semen (14,38 % resp. 11,04 %).



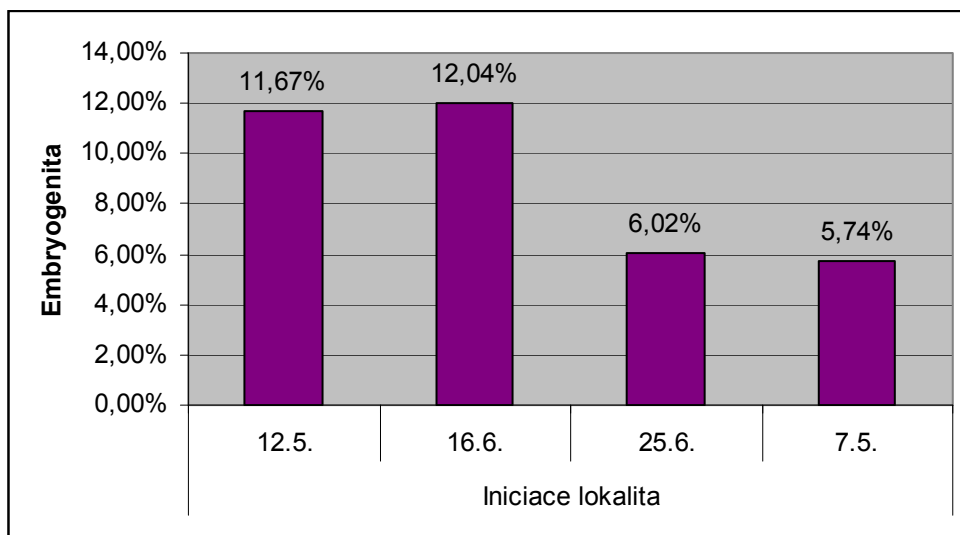
Graf č. 1 - Průměrná embryogenita podle médií

Při bližším zkoumání je patrné, že média GD1, GD2 a GD4 se liší pouze v rozdílné hladině růstových regulátorů; optimální hladina pro iniciaci ESM je tedy spíše nižší (2 μ M BAP a 2 μ M kinetinu, resp. 4 μ M BAP a 4 μ M kinetinu + 10 μ M 2,4-D).

Naopak nejhorších výsledků dosáhla ESM na médiích LP2 (průměrná embryogenita 1,72 na 40 nasazených semen, resp. 4,4 %) a GD3 (1,92, resp. 4,8 %), viz. graf č. 1. Podrobné výsledky jsou uvedeny v Příloze Inicie.

Jako nejúspěšnější, z hlediska lokality původu, byla pro iniciaci ESM vyhodnocena lokalita 16.6., a to v průměru 4,81 na 40 nasazených semen (12 % úspěšnost tvorby ESM). Při použití Tukeyho testu statistické významnosti odlišnosti výsledků bylo zjištěno, že statisticky srovnatelných výsledků bylo dosaženo ještě u lokality 12.5. (4,67 resp. 11,67 %), viz. tab. I7 a graf I5.

Nejhůře se iniciace ESM dařila u semen z lokalit 7.5. (průměr 2,3 resp. 5,7 %) a 25.6. (průměr 2,4 resp. 6 %), viz. graf č. 2. Podrobné výsledky jsou uvedeny také v Příloze Inicie.



Graf č. 2 - Průměrná embryogenita podle lokalit

Všechny vzniklé embryogenní linie z lokality 16.6., resp. 12.5. jsou na základě statistických výsledků úspěšné ve fázi iniciace. Tyto linie reagují na změnu kultivačních podmínek a netrpí morfologickými abnormalitami, z tohoto hlediska jsou vhodným materiálem pro další fáze somatické embryogeneze.

Obě stanovené hypotézy (H1 i H2) pro fázi iniciace byly potvrzeny na základě analýzy rozptylu dat na hladině pravděpodobnosti 95 % (H0 byla v obou případech zamítnuta). Médium a lokalita mají tedy signifikantní vliv na iniciaci ESM vzniklé ze zralých semen *Picea abies* (byla zjištěna závislost embryogenity semen jak na zvoleném kultivačním médiu, tak na lokalitě, odkud semena pocházela). Z hlediska srovnání významnosti média a lokality při použití R-kvadrát koeficientu k vysvětlení získaných dat v rámci modelu se ukázalo, že byl zjištěn vyšší příspěvek zvoleného média (R-kvadrát 40,4 %) oproti lokalitě původu (R-kvadrát 27,8 %). Podrobné výsledky jsou uvedeny v Příloze Iniciace.

6.2. Proliferace

Pro fázi proliferace byl zjišťován vliv použitých médií, resp. hladiny růstových regulátorů na proliferaci ESM v časovém horizontu 4, resp. 8 týdnů. Stejně tak byl zjišťován vliv původu primárních explantátů na optimální průběh fáze proliferace (výsledný požadovaný stav – proliferující ESM). Jako další jev byl sledován maximální přírůst ESM v čase, tedy optimální délka subkultivace, viz. kap. 5.8.2.

I přesto, že na konci fáze iniciace bylo zaznamenáno 383 embryogenních linií, ve fázi proliferace je sledováno pouze linií 43. Proto, aby byla dodržena statistická kritéria (počet

opakování) bylo nutné každou embryogenní linii namnožit na požadované množství. U většiny linií se to nezdařilo vůbec, u zbylých 43 linií jen částečně, ty pak jsou předmětem dalšího pozorování. I tento jev vypovídá o adaptabilitě jednotlivých kultur na kultivační (laboratorní) podmínky.

Bohužel se nepodařilo namnožit dostatečné množství materiálu na některých médiích (GD4) pro určité embryogenní linie. Výsledky jsou tedy popsány v několika krocích, které se snaží s tímto faktem vypořádat. Jako doplňující statistická metoda zde byl zvolen program SAS.

V této fázi byly sledovány přírůsty ESM pro jednotlivé embryogenní linie na zvolených médiích po 4, resp. 8 týdnech vzhledem k množství nasazenému v nultém týdnu. Velikost přírůstu byla zaznamenána v mm^2 , viz. kap. 5.4. Pro vyhodnocení byl použit poměr hodnot ze 4. resp. 8. týdne vzhledem k nultému týdnu. Srovnávací hodnotou je tedy relativní proměnná vyjadřující násobek původně nasazeného množství (kolikrát se zvětšila plocha ESM po 4 resp. 8 týdnech). V této fázi SE byla úspěšnost proliferace vzniklých embryogenních linií porovnávána s úspěšností kultury AFO 541. Kultura AFO 541 by měla dávat velmi vyrovnané výsledky, a tak umožnit standardizované srovnání.

Výsledky pro 4. týden nárůstu ESM

Poměr hmoty ve 4. týdnu vzhledem k nultému týdnu byl v průměru v rámci celého pokusu 2,22. Tedy ESM zvětšila svou plochu za 4 týdny v průměru 2,22x. Medián celého vzorku dat byl 1,77 násobný nárůst ESM oproti nultému týdnu, viz. kap. Přílohy Proliferace 12.2.1. (tab. č. P1 a tab. č. P2).

V této fázi se výrazně projevila adaptabilita jednotlivých linií na kultivační podmínky, případně na subkultivační interval. Některé embryogenní linie přirůstaly velmi rychle, jiné nereagovaly na laboratorní podmínky (růstové regulátory, živná média atd.), kdy plocha nasazené ESM zůstávala stejná nebo se dokonce zmenšovala. Výsledná nestandardizace rozdělení dat u posuzovaných vzorků, způsobená pravděpodobně rozdílnou růstovou dynamikou ESM, se nepodařila odstranit ani po logaritmické transformaci. Vzhledem k nehomogenosti rozptylů byl pro ověření vlivu jednotlivých proměnných použit neparametrický Kruskal-Wallisův test na hladině pravděpodobnosti 95 %, viz. tab. P7.

Tento test potvrdil hypotézu č. 6 (H6), tedy signifikantní vliv použitého média pro proliferaci ESM při středně dlouhém intervalu subkultivace - 4 týdny (H0 byla zamítnuta). Podrobný popis výsledků pokusu v Příloze Proliferace.

Z hlediska médií v rámci celého vzorku největší nárůst ESM nastal na LP4 médiu (ESM se zvětšila v porovnání s týdnem nula 4,25x), dále pak následovala média LP5 (3,51x) a LP3 (3,34x). Nejmenší nárůst byl zaznamenán na médiu GD3 (1,69x) a GD4 (1,79x), viz. tab. č. P1 a P2.

Kruskal-Wallisův test na hladině pravděpodobnosti 95 % také potvrdil hypotézu č. 7 (H7), tedy signifikantní vliv jednotlivých embryogenních linií (genetická dispozice) na proliferaci ESM ve 4. týdnu (H0 byla zamítnuta). Při sledování úspěšnosti jednotlivých embryogenních linií se ukázalo, že nejlepších výsledků dosahovala linie 25.6.1. (nárůst ESM 3,88x). Dále pak následovaly linie 25.6.2. (3,18x), 16.6.1. (3,17x), 16.6.3. (3,14x) a 7.5.9. (3,09x), viz. tab. č. P10.

Z hlediska úspěšnosti lokality dosáhly embryogenní linie AFO 541 nejnižšího nárůstu ESM (v průměru 1,84x) a linie z lokality 12.5. (1,91x), viz. tab. č. P13.

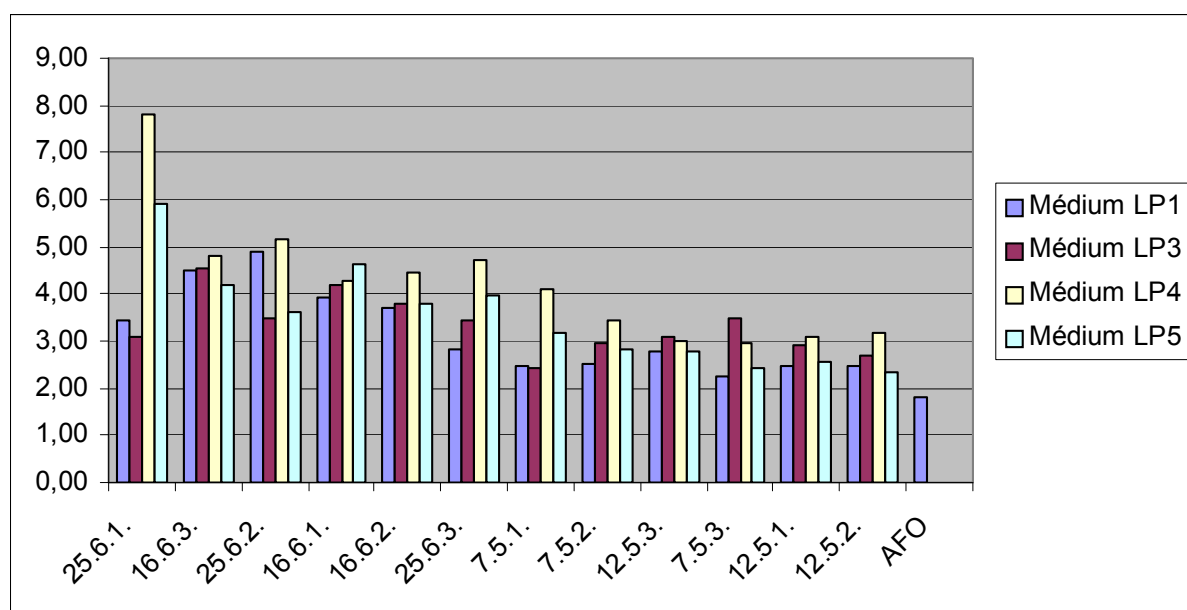
U linie AFO 541 a u linií z lokality 12.5. se může jednat o nevhodně zvolenou dobu pasážování nebo nevhodné kultivační podmínky, případně o genetickou dispozici. Na základě těchto výsledků a výsledků uvedených níže (vyhodnocení nejlépe rostoucích embryogenních linií) lze konstatovat, že pro linii AFO 541 je vhodná kratší doba subkultivace. Podle pozorované růstové dynamiky kultur se tato doba bude pohybovat v rozmezí méně než dvou týdnů.

Pro další srovnání byly použity pouze hodnoty pro vzorky na LP médiích (LP1, LP3, LP4 a LP5), viz. tab. č. 8. Zde dosahovaly nejlepších výsledků proliferace média LP4 (zvětšení ESM v průměru 4,25x) a LP5 (3,51x), přičemž výsledky druhých dvou médií LP3 (3,34x) a LP1 (3,18x nepočítáme-li výsledek AFO 541 linie) byly statisticky srovnatelné.

Průměr z poměru 4-0	Médium				Celkový průměr
Linie	LP1	LP3	LP4	LP5	
12.5.1.	2,45	2,90	3,09	2,54	2,75
12.5.2.	2,46	2,70	3,20	2,32	2,67
12.5.3.	2,76	3,07	3,00	2,77	2,90
16.6.1.	3,91	4,17	4,27	4,62	4,24
16.6.2.	3,69	3,80	4,43	3,78	3,93
16.6.3.	4,49	4,55	4,83	4,19	4,51
25.6.1.	3,44	3,08	7,82	5,90	5,06
25.6.2.	4,89	3,48	5,16	3,62	4,29
25.6.3.	2,82	3,43	4,71	3,98	3,73
7.5.1.	2,48	2,45	4,10	3,18	3,05
7.5.2.	2,53	2,94	3,43	2,84	2,94
7.5.3.	2,26	3,49	2,94	2,43	2,78
AFO 541	1,80				1,80
Celkový průměr	2,98	3,34	4,25	3,51	3,50

Tabulka č. 8 - Poměr nárůstu ESM 4. týden vzhledem k 0. týdnu – jen LP média

Nejúspěšnější embryogenní linií zde byla linie 25.6.1., která v průměru narostla 5,06x v porovnání s nultým týdnem. Dále následovaly linie 16.6.3. (4,51x), 25.6.2. (4,29x) a 16.6.1. (4,24x), viz. graf č. 3.



Graf č. 3 – Průměrný nárůst ESM na LP médiích ve 4. týdnu

Absolutně nejlépe se pak dařilo linii 25.6.1. na LP4 médiu, kde ESM zvětšilo svoji plochu 7,82x během 4 týdnů. Dále v nárůstu ESM následovala linie 25.6.2. na LP4 médiu (5,16x) a 25.6.2. na LP1 médiu (4,89x), jak je vidět v tabulce č. 8 a grafu č. 3.

Vzhledem k tomu, že nejvíce linií bylo nasazeno na GD3 médiu, některé z nich na jiných médiích ani nemohly být vyhodnoceny, jsou zde jeho výsledky samostatně prezentovány.

Na GD3 médiu se nejlépe dařilo embryogenním liniím z lokality 7.5. – a to konkrétně liniím 7.5.9. (3,09 násobný nárůst ve 4. týdnu oproti nultému týdnu kultivace), 7.5.11. (2,78x), 7.5.7. (2,42x) atd., viz. tab. č. P2.

Hned za liniemi z lokality 7.5. se umístila kontrolní line AFO 541 s nárůstem 1,94 násobným. Vzhledem k nehomogenitě rozptylů zde opět musel být použit Kruskal-Wallisův test na hladině pravděpodobnosti 95 %. Tento test potvrdil signifikantní vliv embryogenních linií na výsledek proliferace, podrobné výsledky v Příloze Proliferace.

Výsledky pro 8. týden nárůstu ESM

Poměr ESM v 8. týdnu vzhledem k nultému týdnu byl v průměru v rámci celého pokusu 6,62. Tedy ESM po 8 týdnech kultivace zvětšila v průměru svou plochu 6,62x. Medián tohoto poměru byl 4,42, viz. Příloha Proliferace kap. 12.2.2. (tab. č. P14).

Vzhledem k tomu, že ani po logaritmické transformaci dat se nepodařilo odstranit nehomogennost rozptylů, byl pro ověření vlivu jednotlivých proměnných použit neparametrický Kruskal-Wallisův test na hladině pravděpodobnosti 95 %. Tento test potvrdil hypotézu č. 6 (H6) tedy signifikantní vliv použitého média pro stádium proliferace ESM i při delší kultivaci -8 týdnů (H0 byla zamítnuta), viz. tab. č. P19.

Z hlediska médií největší nárůst ESM nastal na LP4 médiu (ESM narostla v průměru 17,72x), dále pak následovaly média LP5 (14,9x) a LP3 (12,16x). Nejmenší nárůst byl zaznamenán na médiu GD4 (3,03x) a GD3 (3,64x), viz. tab. č. P15.

Kruskal-Wallisův test na hladině pravděpodobnosti 95 % také potvrdil hypotézu č. 7 (H7), tedy signifikantní vliv jednotlivých embryogenních linií na proliferaci v 8. týdnu kultivace (H0 byla zamítnuta), viz. tab. č. P23.

Při sledování úspěšnosti jednotlivých embryogenních linií se ukázalo, že nejlepších výsledků dosahovala linie 16.6.1. (nárůst ESM 13,16x v porovnání s 0. týdnem). Dále pak následují linie 16.6.2. (12,72x), 16.6.3. (12,39x), 25.6.2. (12,22x) a 25.6.1. (10,41x), viz. tab. č. 9.

Při sledování výsledků pro jednotlivé lokality bylo zjištěno, že nejnižšího nárůstu dosáhly v průměru linie AFO 541 (3,09x) a linie z lokality 12.5. (5,73x), viz. tab. č. P26.

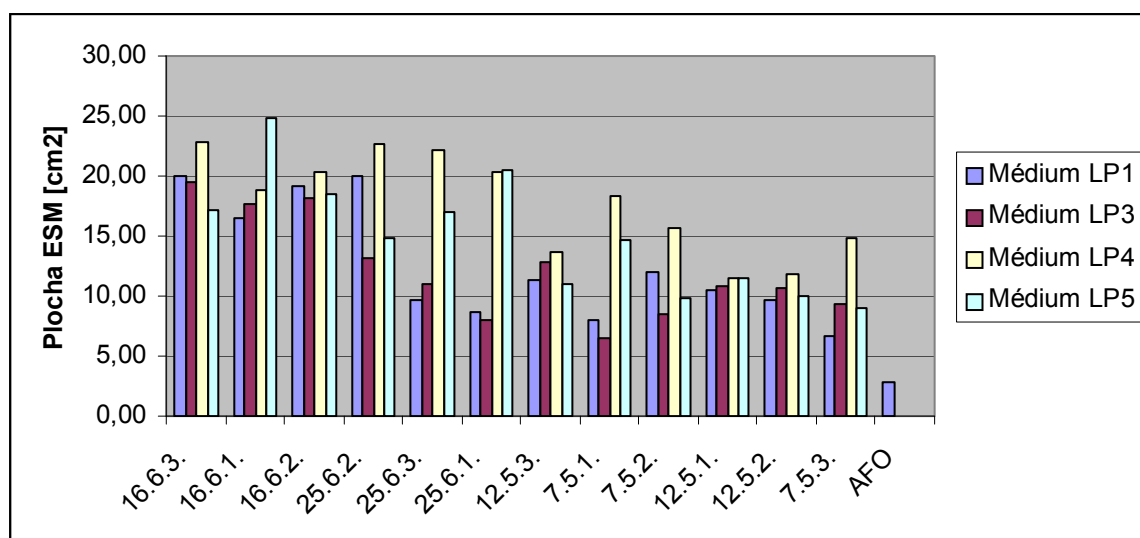
Tyto výsledky opět potvrzují domněnku, že linie AFO 541 vyžaduje kratší dobu subkultivace. I přesto, že je tato doba je u jednotlivých embryogenních linií specifická právě z výsledků linie AFO 541 se dá usuzovat, že k nárůstu ESM je nutné nejen vhodné kultivační podmínky, ale i správná doba subkultivace.

Pro další srovnání byly použity pouze hodnoty pro vzorky na LP médiích (LP1, LP3, LP4, LP5). Zde dosahovaly nejlepších výsledků média LP4 (ESM se v průměru zvětšila 17,72x) a LP5 (14,90x), přičemž výsledky druhých dvou médií LP1 (12,66x) a LP3 (12,16x) byly statisticky srovnatelné, viz. tab. č. 9.

Průměr z poměr 8-0 Embryogenní linie	Médium				Celkový průměr
	LP1	LP3	LP4	LP5	
12.5.1.	10,43	10,88	11,51	11,57	11,10
12.5.2.	9,64	10,62	11,79	9,96	10,50
12.5.3.	11,37	12,76	13,59	11,00	12,18
16.6.1.	16,43	17,64	18,79	24,76	19,41
16.6.2.	19,10	18,15	20,31	18,54	19,02
16.6.3.	19,97	19,44	22,91	17,23	19,89
25.6.1.	8,59	8,06	20,30	20,53	14,37
25.6.2.	20,05	13,08	22,60	14,84	17,64
25.6.3.	9,69	10,97	22,12	16,98	14,94
7.5.1.	7,97	6,54	18,26	14,67	11,86
7.5.2.	11,98	8,47	15,63	9,84	11,48
7.5.3.	6,74	9,27	14,86	8,94	9,95
AFO 541	2,88				2,88
Celkový průměr	11,27	12,16	17,72	14,90	13,90

Tabulka č. 9 - Poměr nárůstu ESM 8. týden vzhledem k 0. týdnu – jen LP média

Nejúspěšnější embryogenní linií zde byla linie 16.6.3., kdy ESM v průměru narostla 19,89x. Dále následovaly linie 16.6.1. (19,41x), 16.6.2. (19,02x) a 25.6.2. (17,64x).



Graf č. 4 – Průměrný nárůst ESM na LP médiích v 8. týdnu

Absolutně nejlépe se pak dařilo linii 16.6.1. na LP5 médiu, kde se ESM zvětšila během 8 týdnů 24,54x. Dále následovala linie 16.6.3. na LP4 médiu (20,91x), 25.6.2. na LP4 médiu (20,60x) a 25.6.3. na LP4 médiu (22,12x), viz. tabulka č. 9 a graf č. 4. Při srovnání těchto výsledků s linií AFO 541 (standardizovaný vzorek) je patrné, že délka subkultivace je genotypově specifická, viz. tab. č. P25.

Vzhledem k tomu, že nejvíce linií bylo nasazeno na GD3 médiu, některé z nich na jiných médiích ani nemohly být vyhodnoceny, jsou zde jeho výsledky samostatně prezentovány. Na GD3 médiu se po osmi týdnech opět nejlépe dařilo liniím z lokality 7.5. – konkrétně embryogenním liniím 7.5.9. (7,03 násobný nárůst v 8. týdnu oproti nultému týdnu), 7.5.11. (6,05x), 7.5.7. (5,37x) atd., podrobné výsledky v Příloze Proliferace (kap. 12.2.2).

Zde kontrolní linie AFO 541 nedosahovala již tak dobrých výsledků a s průměrným nárůstem 3,28 byla hodnocena až v druhé polovině sledovaných linií.

4. a 8. týden

Při porovnání jednotlivých linií bylo použito programu SAS. Z Tukeyho testu byly vybrány homogenní skupiny embryogenních linií mezi jejichž průměry (průměry relativních přírůstků) není statisticky signifikantní rozdíl. Do první homogenní skupiny byly zařazeny linie 25.6.1., 7.5.9. (pro 4. týden) a 16.6.2., 16.6.1., 25.6.1. (pro 8. týden). Do druhé homogenní linie pak bylo zařazeno celkem 9 linií pro 4. týden a 13 embryogenních linií pro 8. týden. Samostatné tabulky zde nejsou prezentovány, vzhledem k rozsáhlosti informací a stránek.

6.3. Maturace

Pro fázi maturace byl zjišťován vliv použitých médií, resp. hladiny růstových regulátorů na výtěžky zralých embryí. Stejně tak byl zjišťován vliv původu primárních explantátů na optimální průběh a výsledek (maximální výtěžek zralých somatických embryí) fáze zrání. Sledovanou hodnotou byl průměrný počet embryí na cm^2 , viz. kap. 5.8.3.

Vzhledem k rozdílné růstové dynamice embryogenních linií vznikl nestejný počet provedených pozorování pro jednotlivá média. Tato skutečnost je řešena při statistickém vyhodnocování ve více krocích. Nejprve byl proveden rozbor celého souboru výsledků. Následuje rozbor výsledků pouze pro LP média (6, 7 a 8) a embryogenní linie mimo linie kontrolní (AFO 541). Jako třetí krok následuje rozbor výsledků všech linií včetně linie kontrolní (AFO 541) na zvoleném GD5 médiu a na závěr rozbor výsledků kontrolní linie AFO 541 pro LP a GD média.

Vzhledem k tomu, že se ani po logaritmické transformaci dat se nepodařilo dosáhnout podmínky homogenity rozptylů pro celkový soubor dat, byl pro vyhodnocení použit neparametrický Kruskal-Wallisův test. Tento test potvrdil hypotézy č. 11 a 12 (H11 a H12). Kruskal-Wallisův test prokázal statistické rozdíly mezi výsledky pro jednotlivá média a pro jednotlivé embryogenní linie (z rozdílných lokalit) na hladině pravděpodobnosti 95 % (H_0 byla v obou případech zamítnuta), viz. Přílohy Maturace kap. 12.3. (tab. č. M2 a M6). Z této skutečnosti vyplývá, že médium i embryogenní linie (genetická informace dané linie) mají signifikantní vliv na zrání somatických embryí.

Pro celý soubor dat bylo nejvyššího průměrného počtu embryí na cm^2 dosaženo na médiu LP7 (15,16 embryí/ cm^2). Dále následovala média LP8 (10,12 embryí/ cm^2) a GD5 (6,57 embryí/ cm^2). Nejnižšího výsledku bylo dosaženo na médiu LP6 (4,85 embryí/ cm^2), viz. tab. č. 10.

Průměr z počtu embryí/ cm^2	Médium			
	GD5	LP6	LP7	LP8
Celkový průměr	6,57	4,85	15,16	10,12

Tabulka č. 10 – Průměrné počty embryí na cm^2 ve fázi maturace podle médií

Při sledování výsledků jednotlivých embryogenních linií přes všechna média bylo zjištěno, že nejvyššího celkového průměru bylo dosaženo u linie 16.6.3. (16,13

embryí/cm²), dále pak u linie 25.6.2. (15,48 embryí/cm²), 7.5.7. (14,19 embryí/cm²) a 25.6.10. (12,15 embryí/cm²), viz. tab. č. 11.

Průměrný počet embryí na cm ²		Průměrný počet embryí na cm ²	
Embryogenní linie	Celkový průměr	Embryogenní linie	Celkový průměr
12.5.1.	11,48	25.6.3.	9,89
12.5.10.	5,07	25.6.6.	3,41
12.5.2.	2,93	25.6.7.	4,30
12.5.4.	4,37	25.6.8.	1,07
12.5.7.	11,93	25.6.9.	11,70
12.5.9.	2,63	7.5.1.	11,63
16.6.1.	11,13	7.5.10.	3,81
16.6.2.	10,79	7.5.2.	8,74
16.6.3.	16,13	7.5.3.	10,22
16.6.4.	4,90	7.5.4.	6,70
16.6.5.	6,73	7.5.5.	5,85
16.6.7.	1,44	7.5.6.	4,07
16.6.8.	2,56	7.5.7.	14,19
16.6.9.	5,22	7.5.8.	1,85
25.6.10.	12,15	7.5.9.	1,44
25.6.2.	15,48	AFO 541	3,20

Tabulka č. 11 – Průměrné počty embryí na cm² ve fázi maturace podle linií

Tyto dva výsledky (tab. č. 10 a 11) jsou však zatíženy chybou vzhledem k nestejnému počtu provedených pozorování pro jednotlivé linie a pro daná média. Celkový přehled výsledků viz. tab. č. M1 a M4.

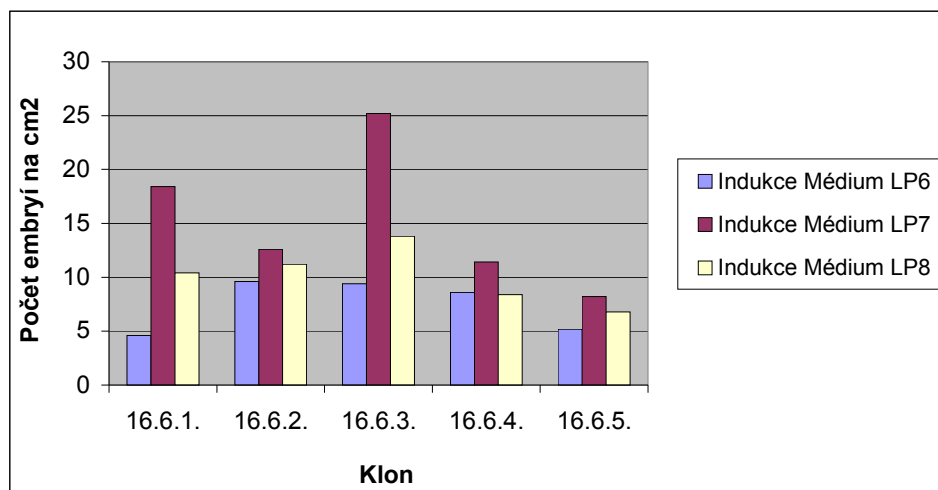
Nejucelenější soubor dat byl k dispozici pro linie z lokality Českomoravská vrchovina (16.6.) kultivovaná na médiích LP6, LP7 a LP8. Pro tato média (LP 6-8) a jednotlivé embryogenní linie byla po transformaci dat splněna podmínka homogenity rozptylů a byla provedena analýza rozptylů na hladině pravděpodobnosti 95 %, vše v Příloze Maturace.

Analýza rozptylů opět prokázala signifikantní vliv nejen použitých médií, ale i zvolených embryogenních linií na počet embryí na cm² ESM. Na hladině pravděpodobnosti 95 % byla tedy potvrzena hypotéza 11 (H11) a 12 (H12) (H0 byla v obou případech zamítnuta). V tabulce č. 12 je pak kompletní křížová tabulka s výsledky průměrného počtu embryí na cm² pro jednotlivá média a linie. Podrobné výsledky v Příloze Maturace.

Průměr z počtu embryí/cm ²	Indukce Médium			Celkový průměr
Embryogenní linie	LP6	LP7	LP8	
16.6.1.	4,6	18,4	10,4	11,13
16.6.2.	9,6	12,6	11,2	11,13
16.6.3.	9,4	25,2	13,8	16,13
16.6.4.	8,6	11,4	8,4	9,47
16.6.5.	5,2	8,2	6,8	6,73
Celkový průměr	7,48	15,16	10,12	10,92

Tabulka č. 12 – Průměrné počty embryí na cm² pro LP média a vybrané linie

Při křížovém srovnání výsledků bylo zjištěno, že nejlépe se z nich dařilo linii 16.6.3. na médiu LP7 (25,2 embryí/cm²). Dále pak linii 16.6.1. na LP7 médiu (18,4 embryí/cm²) a embryogenní linii 16.6.3. na LP8 médiu (13,8 embryí/cm²), viz. tab. č. 12 a graf č. 5.



Graf č. 5 – Průměrné výsledky maturace vybraných embryogenních linií na LP médiích

Srovnání na GD5 médiu

Při samostatném srovnání všech sledovaných embryogenních linií na GD5 médiu bylo zjištěno, že nejvyšší průměrný počet embryí na cm² dosahovaly linie 25.6.2. (15,48 embryí/cm²), 7.5.7. (14,19 embryí/cm²) a 25.6.10. (12,15 embryí/cm²). Jelikož ani po logaritmické transformaci data nesplňovala podmínku homogenity rozptylů, byl proveden Kruskal-Wallisův test, který prokázal závislost průměrného počtu embryí/cm² na daném médiu, na hladině pravděpodobnosti 95 %, viz. tab. č. M2.

Srovnání pro linii AFO 541

Samostatně byly pak vyhodnoceny i výsledky médií GD5 a LP6 pro kontrolní linii AFO 541. Tato data splňovala podmínku homogenity rozptylů a byla na nich provedena analýza rozptylů na hladině pravděpodobnosti 95 %.

Z výsledků vyplývá vyšší úroveň průměrného počtu embryí na cm^2 u GD5 média, a to 3,73 embryí/ cm^2 , oproti 2,67 embryí/ cm^2 na médiu LP6, viz. Příloha Maturace. Linie AFO 541 dosahuje poměrně malého počtu zralých embryí na centimetr čtvereční. Důvodů proč má kontrolní linie právě takovou dynamiku tvorby zralých embryí může být několik (nevhodné kultivační podmínky, stáří linie atd.), viz. kapitola 7.3. Tato skutečnost je způsobena pravděpodobně nevhodnou dobou kultivace v předchozí fázi (proliferace). Počet preformovaných embryí (PEM) v ESM se snižuje, pokud je překročena doba subkultivace. Konkrétní příčinu by bylo možno odhalit morfologickou studií, která by ale kultury poškodila natolik, že by nebyly schopné další kultivace.

6.4. Desikace a germinace

Pro fázi germinace byl zjišťován vliv použitých médií, resp. hladiny růstových regulátorů na klíčící rostliny a vliv vysoušení (desikace). Stejně tak byl zjišťován vliv původu primárních explantátů na optimální průběh a výsledek fáze germinace. Sledovanou hodnotou byl počet klíčících rostlin (sledována byla optimální anatomická stavba) schopných dalšího vývoje (přenos do nesterilního prostředí) k celkovému počtu nasazených vzorků. Výsledky vzorků neošetřených desikací byly použity jako nulová srovnávací varianta při posuzování dosažených výsledků, viz. kap. 5.8.4.

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo namnožit potřebný počet vzorků pro všechny embryogenní linie na všech médiích, jsou výsledky rozděleny do několik kroků.

Pro statistické vyhodnocení vlivu desikace bylo z důvodu nehomogenosti rozptylů nutné provést logaritmickou transformaci dat. Analýza rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 % prokázala signifikantní vliv desikace na klíčení embryí a tím také byla potvrzena hypotéza č. 15 (H15); desikace má signifikantní vliv počet a kvalitu klíčících rostlin *Picea abies* vzniklých ze SE (H0 byla zamítnuta). Vzorky ošetřené desikací dosahovaly v průměru 2-4x vyššího poměru klíčících rostlin než vzorky neošetřené, viz. tab. č. 13. Podrobné výsledky viz. Přílohy Germinace kap. 12.4.1.

Průměr klíčících rostlin			
Klíčení	BEZ	DES	Celkový průměr
Celkový průměr	7,29 %	17,09 %	12,19 %

Tabulka č. 13 – Srovnání průměrných výsledků vzorků s a bez desikace ve fázi germinace

Další testy byly prováděny odděleně na výsledcích vzorků s a bez ošetření desikací.

Desikace:

Při použití analýzy rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 % byl prokázán signifikantní vliv použitého média na klíčivost somatických embryí, tzn. na základě statistických výsledků byla potvrzena hypotéza č. 16 (H16). Tedy na kvalitu a počet klíčících rostlin *Picea abies* má signifikantní vliv kultivační médium ve stádiu germinace (H0 byla zamítnuta). Podrobné výsledky v Příloze Germinace (kap. 12.4.).

Pro celkové srovnání médií byly vybrány dvě embryogenní linie (16.6.2. a 16.6.4.), pro které se podařilo namnožit dostatečný počet embryí na všech médiích. Zde bylo nejlepších výsledků dosaženo na médiu LP10 (v průměru přežilo 34,7 % životaschopných klíčících rostlin). Následovala média LP9 (24,96 %), LP11 (18,45 %), GD6 (14,58 %) a GD7 (6,73 %). Výsledky byly přitom statisticky srovnatelné pro obě embryogenní linie. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 14.

Linie	Médium					Celkový průměr
	GD6	GD7	LP10	LP11	LP9	
16.6.2.	13,33 %	8,20 %	34,78 %	19,05 %	24,00 %	19,87 %
16.6.4.	15,83 %	5,26 %	34,62 %	17,86 %	25,93 %	19,90 %
Celkový průměr	14,58 %	6,73 %	34,70 %	18,45 %	24,96 %	19,89 %

Tabulka č. 14 – Výsledky Germinace podle médií s desikací, linie 16.6.2. a 16.6.4.

Při porovnání výsledků médií na celém souboru vzorků bylo třeba provést logaritmickou transformaci dat, po které bylo možno provést analýzu rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 %. Nejlepších výsledků dosaženo opět na médiu LP10 (30,06 % klíčících embryí). S tímto výsledkem byly ještě statisticky srovnatelné výsledky média GD6 (22,4 %) a LP9 (20,5 %). Tyto výsledky jsou však zatíženy chybou vyplývající z různorodosti použitých embryogenních linií na jednotlivých médiích. Výsledky analýzy

rozptylu pro transformovaná data viz. tab. č. G10. Podrobné výsledky jsou v Příloze Germinace (kap. 12.4.3.).

Pro celkové srovnání úspěšnosti embryogenních linií byly vybrány výsledky na GD6 a LP10 médiích, které byly statisticky srovnatelné. Nejlepších výsledků zde dosahovala embryogenní linie 7.5.7. (na médiu GD6) s průměrem 45,83 % klíčících rostlin. Následovaly linie 25.6.10. (GD6, 40,83 %), 7.5.3. (GD6, 36,67 %), 16.6.2. (LP10, 34,78 %), 16.6.4. (LP10, 34,62 %). Nejhůře si naopak vedly linie 7.5.6. (GD6, 9,17 %) a 12.5.1. (13,33 %). Srovnávací AFO 541 linie zde dosáhly 21,74 % klíčivosti, viz. tab. č. 15. Podrobné výsledky v Příloze Germinace.

Průměr z poměru klíčících rostlin	Médium					Celkový průměr
Embryogenní linie	GD6	GD7	LP10	LP11	LP9	
12.5.1.	13,33 %	3,45 %				8,39 %
12.5.10.	24,17 %	12,20 %				18,18 %
12.5.2.	19,17 %	9,76 %				14,46 %
12.5.4.	14,17 %	7,89 %				11,03 %
12.5.7.	19,17 %	10,77 %				14,97 %
16.6.1.			21,21 %	11,43 %	13,16 %	15,27 %
16.6.2.	13,33 %	8,20 %	34,78 %	19,05 %	24,00 %	19,87 %
16.6.3.			31,91 %	15,91 %	24,44 %	24,09 %
16.6.4.	15,83 %	5,26 %	34,62 %	17,86 %	25,93 %	19,90 %
16.6.5.			27,78 %	13,64 %	15,00 %	18,80 %
16.6.7.	20,37 %	11,43 %				15,90 %
16.6.8.	15,07 %	11,11 %				13,09 %
16.6.9.	23,33 %	6,25 %				14,79 %
25.6.10.	40,83 %	16,92 %				28,88 %
25.6.2.	34,17 %	10,13 %				22,15 %
25.6.3.	19,17 %	8,51 %				13,84 %
25.6.6.	18,33 %	6,25 %				12,29 %
25.6.7.	19,17 %	9,76 %				14,46 %
25.6.8.	22,22 %	5,26 %				13,74 %
25.6.9.	20,83 %	10,67 %				15,75 %
7.5.1.	17,50 %	5,45 %				11,48 %
7.5.10.	33,33 %	7,14 %				20,24 %
7.5.2.	23,33 %	5,77 %				14,55 %
7.5.3.	36,67 %	15,22 %				25,94 %
7.5.4.	30,83 %	11,11 %				20,97 %
7.5.5.	17,50 %	7,55 %				12,52 %
7.5.6.	9,17 %	0,00 %				4,58 %
7.5.7.	45,83 %	17,91 %				31,87 %
7.5.8.	23,81 %	9,09 %				16,45 %
7.5.9.	14,81 %	5,26 %				10,04 %
AFO 541	21,74 %					21,74 %
Celkový průměr	22,40 %	8,83 %	30,06 %	15,58 %	20,51 %	17,09 %

Tabulka č. 15 – Souhrnné statistiky výsledků germinace podle médií a linií

Podobně jako pro média bylo při porovnání výsledků embryogenních linií na celém souboru vzorků bylo použito analýzy rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 %. Zde se však nepodařilo prokázat vliv embryogenních linií na klíčivost, tzn. hypotéza č. 17. (H17) byla zamítnuta, tedy embryogenní linie (genetická dispozice) nemá signifikantní vliv na počet a kvalitu klíčících rostlin *Picea abies* vzniklých při SE (H0 byla potvrzena), viz. tab. č. G11.

Tento výsledek je však opět zatížen systémovou chybou vyplývající z nedostatku namnožených vzorků pro všechna média.

Kontrolní varianta (bez desikace):

Po logaritmické transformaci dat byl za použití analýzy rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 % prokázán vliv použitého média na klíčivost embryí i u vzorků bez desikace, tzn. byla potvrzena hypotéza č. 16 (H16) (H0 byla zamítnuta), vše v Příloze Germinace (kap. 12.4.).

Pro celkové porovnání médií byly vybrány embryogenní linie 16.6.2. a 16.6.4., pro které se podařilo namnožit dostatečný počet vzorků na všech médiích. Zde bylo nejlepších výsledků dosaženo na médiu LP10 – v průměru 13,39 % klíčících rostlin. Následovala média GD6 (7,08 %), LP9 (6,09 %) a LP11 (2,38 %). Na médiu GD7 byla úspěšnost klíčení 0 %. Tyto výsledky byly přitom statisticky srovnatelné pro obě embryogenní linie. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 16.

	Klíčení médium					Celkový průměr
Klíčení klon	GD6	GD7	LP10	LP11	LP9	
16.6.2.	5,83 %	0,00 %	12,50 %	0,00 %	3,85 %	4,44 %
16.6.4.	8,33 %	0,00 %	14,29 %	4,76 %	8,33 %	7,14 %
Celkový průměr	7,08 %	0,00 %	13,39 %	2,38 %	6,09 %	5,79 %

Tabulka č. 16 - Výsledky Germinace podle médií bez desikace, linie 16.6.2. a 16.6.4.

Při porovnání výsledků médií na celém souboru vzorků bylo třeba provést logaritmickou transformaci dat, po které bylo možno provést analýzu rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 %. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na GD6 médiu (12,38 % klíčících rostlin). S tímto výsledkem byly ještě statisticky srovnatelné výsledky média LP10 (10,54 %). Ostatní média měla průměr nižší než 5 %. Tyto výsledky jsou však

zatíženy chybou vyplývající z různorodosti použitých embryogenních linií na jednotlivých médiích. Výsledky analýzy rozptylu pro transformovaná data viz. tab. č. G10. Podrobné výsledky jsou v Příloze Germinace kap. 12.4.3.

Ve variantě bez použití desikace nebyl prokázán vliv zvolených embryogenních linií na klíčivost embryí za použití analýzy rozptylu na hladině pravděpodobnosti 95 %, tzn. stejně jako u desikovaných vzorků byla zamítnuta č. 17 (H17). Nebyl potvrzen vliv embryogenní linie na kultivaci ve stádiu germinace (H0 byla potvrzena). Podrobné výsledky jsou v Příloze Germinace (12.4.).

7. Diskuse

7.1. Indukce embryogenního pletiva

Jako primární explantáty jsou velmi vhodná nezralá či zralá zygotická embrya (Gupta a Grob, 1995). Iniciace explantátových kultur ze zralých semen *Picea abies* je méně náročná než iniciace z nezralých semen, např. z důvodů obtížného odebrání primárních explantátů v nepříznivých ročních obdobích, obtížně upřesnitelná optimální doba vyjmutí nezralého zygotického embrya ze semene (Tremblay, 1990; Vágner a kol., 2005a), náročná preparace atd. Naopak iniciace ESM z nezralých semen je úspěšnější (Hakman a von Arnold, 1985). Jako primární explantáty se výjimečně používají i jiné části rostlin např. dělohy semenáčků (Lelu a kol., 1990), jehlice (Tremblay, 1990; Ruaud, 1991; Harvengt, 2001); ty však mají nižší hodnoty výsledků při iniciaci ESM (Vágner a kol., 2005a).

Ve svých experimentech jsem si zvolila jednodušší cestu pro iniciaci ESM *Picea abies* s ohledem na cíle zvolené na začátku experimentů (ověřit zda je proces SE vhodný i pro komerční propagaci).

Sterilizace zralých semen probíhala ve dvou etapách. Nejprve jsem semena ponechala v 80 % ethanolu (1 min), následovala sterilizace v 15 % roztoku chlornanu sodného (SAVO) (20 min) a důkladné omytí ve sterilní destilované vodě (3x). Po první části sterilizace byla semena ponechána ve sterilní vodě (4 h), aby došlo k jejich nabobtnání a snazšímu vyjímání embryí. Bobtnání probíhalo ve flow-boxu umístěném v tmavé kultivační místnosti. Po nabobtnání byla semena vyjmuta, opět sterilizována (10 % chlornan sodný/20 min) a důkladně promyta ve sterilní destilované vodě (3x). Jednofázová nebo kratší doba sterilizace se v předchozích pokusech neosvědčila. Kultury při kratší sterilizaci byly kontaminovány (plísně, bakteriální infekce atd.).

Kratší dobu sterilizace ovšem ve svých experimentech popisují Rauscherová (1990), Tremblay (1990) a Ruaud (1993). Tremblay (1990) úspěšně použil pouze 3, 7 a 15 minutovou sterilizaci v chlornanu sodném (20 %) u semen *Picea glauca*. Ruaud (1993) používá pro sterilizaci semen *Picea abies* 38 % hydrogen peroxid (20 min) a Rauscherová (1990) popisuje úspěšnou sterilizaci semen téhož druhu pomocí chloridu rtuťnatého (0,1 %/25-30 min). Chlorid rtuťnatý je k rostlinnému materiálu velmi šetrný, ale manipulace s ním vyžaduje podmínky práce jako s velmi nebezpečným jedem.

Sterilizaci semen ethanolem (70 %/5 min) spolu s chloridem rtuťnatým (0,1 %/5 min) popisuje např. Vágner a kol. (2005a).

V některých případech se používá po sterilizaci bobtnání semen. To pak usnadňuje vyjímání embrya ze semene (Tremblay, 1990). Bobtnání probíhá nejčastěji ve sterilní destilované vodě nebo v živném roztoku, při pokojové teplotě nebo v lednici. Tremblay (1990) testoval optimální dobu bobtnání semen u druhu *Picea glauca* (1, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24 hod/25 °C). Bobtnání má podle tohoto autora výrazný vliv na kvalitu explantátu; při delší době než 4 hodiny se snižuje vytváření ESM. U semen ponechaných déle než 8 hodin k nabobtnání byla následná tvorba ESM nižší až o 50 %. Nabobtnání semen *Picea abies* po dobu 24 hodin popisuje Gupta a Durzan (1986). Embrya byla vyjmuta po 24 hodinách nabobtnání, ale pouze 5-6 % embryí tvořilo pletivo.

Jako nový a velmi podstatný faktor ve stádiu iniciace se v publikovaných studiích zmiňuje část embrya (primárního explantátu), která se vkládá na kultivační médium (Ramarosandrata a Staden, 2003). Při svých experimentech jsem odřezávala ze semen semenný obal spolu s částí endospermu tak, aby nedošlo ke kontaktu s embryem, viz. obr. č. O2. V některých případech, vzhledem k rozdílné velikosti embryí a manuální náročnosti, došlo k přetnutí embrya v zóně 1 (apikální části meristému), případně zóně 2, viz. kapitola 4.2.2. Zóna 1 je podle autorů Ramarosandrata a Staden (2003) také schopna produkovat ESM. Vyšší část hypokotylu (zóna 2) a přilehlé části autoři považují za nejvíce embryogenní část ze zygotického embrya.

Po 4-6 (výjimečně 2-8) týdnech kultivace začalo na embryu přirůstat pletivo, viz. obr. č. O4. Tvořící se ESM byla odstraněna na proliferující médium až po nárůstu pletiva na minimální velikost (10 mm), viz. metodika kultivace Vágner a kol. (2005a). Při pokusech bylo zřejmé, že pletivo, které vznikalo ze zóny 4 bylo nazelenalé, při další kultivaci kalusovatělo a nemělo embryogenní schopnost. Pletivo vzniklé z 2. zóny bylo pravidelně bílé až průsvitné, konzistentní s jemnou vláknitou strukturou (ESM). Zóny 1 a 3 iniciovaly jak ESM, tak i pletiva, která byla nažloutlá více či méně konzistentní nebo jinak formovaná. Již v roce 1985 autoři Hakman a kol. uvádí, že vhodná část embrya pro tvorbu ESM je právě hypokotylová část. Gupta a Durzan (1986) popisují, že z děloh se tvoří pouze pletivo zelené-kompaktní, z hypokotylu a kořínků pletivo bílé-průsvitné viskózní s proembryogenními shluky (složené z prodloužených buněk suspenzoru a

malých hustých buněk s velkým jádrem). Tento popis tvorby ESM je ovšem s rozporom s výše popsanou studií autorů Ramarosandrata a Staden (2003).

Při práci s pinzetou a jinými chirurgickými nástroji (nůžky, jehla atd.) nelze vyloučit ani mechanické poškození embryí. Von Arnold (1987) uvádí, že poškození embryí podporuje embryogenní schopnost. Při vyjímání semen jsou embrya často poškozena, a právě u poškozených embryí je množství a vývoj pletiva podstatně vyšší než u embryí nepoškozených (27 % : 7 %) (von Arnold, 1987).

Různé laboratoře používají rozdílná kultivační média pro iniciaci ESM u *Picea abies* např. modifikované MS, LP, MSG (Becwar a kol., 1988), DCR (Gupta a Durzan, 1985) (Tautorus a kol. 1991), BM (von Arnold a Eriksson, 1981) (Attree a kol., 1991). Téměř všichni autoři se ale shodují na důležité funkci auxinů a cytokininů pro tuto fázi. Vágner a kol. (2005a) uvádí, že makro a mikroelementy (složky A a B v médiu) nejsou tak důležité, jako aplikace auxinů a cytokininů do média, jmenovitě pak 2,4-D, NAA, BA a kinetin.

Nejvyšší embryogenita bylo dosaženo na modifikovaném GD (1) médiu a to v průměru 14,8 % embryí tvořilo ESM. Statisticky srovnatelných výsledků bylo dosaženo opět na modifikovaných médiích GD (2 a 4), a to průměrné hodnoty 14,3 % resp. 11 %, viz. kap. 6.1. a 12.1.

Z výše zmíněných výsledků vyplývá, že nejvyšší embryogenita bylo dosaženo na médiu (GD1, resp. GD2), které obsahovalo pouze nižší hladiny cytokininů (2 μ M BAP a 2 μ M kinetin, resp. 4 μ M BAP a 4 μ M kinetin) bez přítomnosti auxinů. Třetí úspěšné médium GD bylo obohaceno o nižší hladiny cytokininů a auxin (4 μ M BAP, 4 μ M kinetin a 10 μ M 2,4-D). Z testovaných LP médií tvořilo nejvíce ESM (9,17 %) médium LP5, které také obsahuje pouze cytokininy (5 μ M BAP a 5 μ M kinetin). Médium LP5 bylo přitom v souhrnných výsledcích čtvrté nejúspěšnější.

Jako jedno z nejméně úspěšných médií (druhé nejhorší výsledky) se osvědčilo médium GD3 (4,8 % embryí tvořilo ESM). Právě toto médium s identickou hladinou růstových regulátorů (5 μ M 2,4-D, 2 μ M BA a 2 μ M kinetin) používá Vágner a kol. (2005a) ve své práci pro iniciaci ESM.

Mnoho autorů popisuje pro stádium iniciace modifikované LP médium obohacené o 2,4-D (10 μ M) a BAP (5 μ M) (Hakman a Fowke 1987, Attree a kol. 1995).

Von Arnold (1987) uvádí, že pro iniciaci embryogenního pletiva jsou vhodné koncentrace NAA nebo 2,4-D (5-20 μ M) v kombinaci s BAP (5 μ M), přičemž nejvhodnější byla koncentrace 2,4-D v rozmezí 10-20 μ M. Úspěšnost iniciace ESM se v tomto pokusu pohybovala mezi 7-30 %. Nízkou úspěšnost iniciace ESM (5-6 %) měli ve svých pokusech Gupta a Durzan (1986), kteří používali médium také s kinetinem a vyššími koncentracemi BAP (20 μ M) a 2,4-D (5 μ M).

Z popsáných výsledků jiných autorů lze usuzovat, že nejčastěji užívané koncentrace pro auxiny jsou 5-20 μ M 2,4-D, 5-54 μ M NAA, a pro cytokininy 5-20 μ M BAP a 20-25 μ M kinetinu. Kombinaci všech výše zmíněných auxinů i cytokininů pro iniciaci ESM doporučuje např. Suss a kol. (1990).

Při porovnání výsledků z laboratoře KDŠDL a při porovnání výsledků s ověřenými-publikovanými metodikami jiných laboratoří je patrné, že výsledky u neznámého biologického materiálu (materiál, který nemá předem ověřenou adaptabilitu na laboratorní podmínky) při zachování postupů i koncentrací nejsou zcela srovnatelné. Park a kol. (1993) udávají výsledky produkce embryogenního pletiva ze zralých semen 30 linií v rozsahu 3,3-54,6 %. Ve své práci von Arnold (1987) uvádí produkci embryogenního pletiva ze zralých semen v rozsahu 7-30 % na médiu LP (2,4-D 2 mg.l⁻¹).

Iniciační koeficient je závislý na genotypu primárního explantátu (Jain a kol., 1988). Iniciace kultur je dána i genetickými faktory a produkce embryogenního pletiva je často možná jen u určitého procenta explantátů. Passerieux a kol. (1999) uvádí, úspěšnost při iniciaci ESM 25 %. Výsledkem tohoto jevu je snížení genetické diverzity, nebyl však prokázán selekční efekt SE (Passerieux a kol., 1999).

Tremblay (1990) uvádí, že iniciace procesu SE je ovlivněna geografickým místem původu primárního explantátu a skladováním semen. Autor popisuje u *Picea glauca* korelaci mezi klíčivostí semen a schopností tvořit nediferencované pletivo nebo ESM.

Jako úspěšné lokality ke sběru zralých semen (tvorba ESM 5-12 %) autor uvádí např. Ontario, Quebec, Labrador atd. V laboratoři KDŠDL byly jako nejúspěšnější lokality pro první stádium na základě Tukeyho testu vyhodnoceny Českomoravská vrchovina (12 %

úspěšnost iniciace ESM; 80 % klíčivost semen), resp. Předhoří Šumavy a Novohradských hor (11,67 %; 75 % klíčivost semen).

Na základě statistických výsledků se dá konstatovat, že médium i lokalita mají signifikantní vliv na iniciaci ESM.

Souhrnně lze říct, že indukce ESM nejlépe probíhala na médiu obohaceném pouze o různé druhy cytokininů. Média i koncentrace zvolených růstových regulátorů byly zvoleny na základě předem ověřených výsledků (metodik), i přesto iniciace ESM nepřesáhla 15 %. V této souvislosti se nabízí otázka, zda u metodik není vynechaná některá z důležitých veličin nebo zda se jedná o náhodný jev, spojený s původem materiálu, systémovou chybou v laboratořích apod.

U dalších studií by bylo jistě zajímavé prokázat z jakých důvodů má právě lokalita významný vliv na iniciaci ESM. Jestli se jedná o signifikantní vliv LVS, znečištění prostředí, druhovou skladbu lesa, nadmořskou výšku apod. Nesporně velmi zajímavé by bylo zjištění korelace mezi vegetativními znaky zralých semen (např. hmotnost, obsah vody apod.) a adaptabilitou na laboratorní podmínky (kultivaci *in vitro*).

7.2. Proliferace

Udržování ESM není příliš náročné vzhledem k tomu, že v ESM nedochází k žádným výrazným změnám v morfologii ani anatomii kultur (kumulace zásobních látek, tvorba orgánů atd.). I přesto je průběh proliferace podstatný pro možnou kryoprezervaci a genové manipulace, které se uskutečňují právě v této fázi (Clapham a kol., 2000).

Jak uvádí Egertsdotter a kol. (1993) proliferující ESM se dá rozlišit na dvě morfologické skupiny, viz. kapitola 4.3.1. Toto rozlišení je zásadní pro další vývojové fáze SE. Již ve fázi proliferace jsou utvořena v pletivu polární (typ A1), solární (A2) nebo nevyvinutá somatická embrya (A3). Přenosem kultury na maturační médium se embrya jen zformují a dále zrají. Na suspenzních médiích jsou u jednotlivých morfologických typů kultur zřetelné změny, např. shluky (A2) a agregace embryí (B) (Egertsdotter a von Arnold, 1995).

Pro všechny kultury bylo ve stádiu proliferace použito pevné živné médium, protože jak uvádí Vágner a kol. (2001) na pevných živných médiích je možné získat podstatně lepší výsledky ve srovnání se suspenzními kulturami. Pâques a kol. (1992) spolu s

Gorbatenkem a Hakmanem (2001) uvádí, že kvalita kultur na pevných médiích je vyšší než na tekutých médiích.

Metodika pro použití suspenzní kultury v této vývojové fázi byla patentována (U.S. Pat. No. 5491090). U druhů *Picea glauca x engelmannii*, *Picea mariana* a *Picea abies* suspenzní kultury využili např. Lulsdorf a kol. (1993).

Dlouhodobou kultivaci (18 měsíců) na tekutých živných médiích u *Picea glauca* pak popisuje již v roce 1988 Dunstan a kol. Suspenze byla tvořena ze shluku buněk, a byla úspěšně kultivována na LP médiu s přidavkem 2,4-D (9 μ M) a BAP (4,4 μ M). Po určené době, byly shluky buněk promyty a přeneseny pro další kultivaci na pevné filtrové disky. Suspenzní buněčnou kulturu u *Picea abies* (K médium; Gorbatenko a Hakman, 2001) obohacenou o auxin (10 μ M NAA) a cytokinin (5 μ M BA) úspěšně využíval např. tým Gorbatenko a Hakman (2001) po dobu 2–7 let. Suspenzní kultura obsahující formované shluky buněk byla naočkována do média a použita úspěšně při další fázi SE (Gorbatenko a Hakman, 2001).

Primární explantát si ponechává embryogenní schopnost po dobu několika měsíců (Vágner a kol., 2005a) i přesto jsem utvořené ESM z primárního explantátu oddělovala po nárůstu na proliferační médium, viz. obr. č. O4. K přenosu ESM z iniciačního média na médium proliferační jsem používala sterilní pinzety, z důvodu maximální obezřetnosti při možném narušení ESM. Skalpel k oddělování ESM nedoporučuje ani Vágner a kol. (2005a).

Při ponechání ESM na primárním explantátu po delší dobu pletivo degradovalo, hnědlo a kalusovatělo. Velikost odděleného pletiva jsem zvolila na základě předchozí zkušenosti a prostudované literatury. Menší části pletiva (6-8 mm²), které jsem přenesla na čerstvé médium více podléhaly nekrotizaci a jejich počáteční růst byl pomalejší. Větší pletivo (9 -12 mm²) rostlo zprvu rychleji a bez větších morfologicky patrných změn. Vágner a kol. (2005a) používá pro přenos na jiné médium velikost pletiva okolo 10 mm. K výše popsaným experimentům proliferace bylo většinou použito pletivo s minimální velikostí 10 mm a větší.

Kultury byly po 2 týdnech kontrolovány (možná kontaminace apod.) a sterilně přeneseny na čerstvá kultivační média. V této fázi je většina somatických embryí v časném vývojovém stádiu a má schopnost dalšího dělení. Vzhledem k výše popsaným aspektům,

byly u kultur sledovány některé morfologické charakteristiky jako např. konzistence, barva, tvar, apod. s cílem zachovat maximální embryogenní schopnost, viz. obr. č. O5 a O6. Jako kultury nevyhovující a dále nepoužitelné byly vyřazeny ty, které kalusovatěly a výrazně se svým vzhledem a anatomickou stavbou oddalovaly ESM. I přesto základy suspenzoru a jiné anatomické části by byly odhaleny jen při podrobnější anatomicko-morfologické studii (Egertsdotter a kol. 1993; Filonova a kol., 2000; Bozhkov a kol., 2002b). V této fázi se výrazně projevila rozdílná růstová dynamika kultur a embryogenní schopnost.

I pletiva, která svým vzhledem již neodpovídala ESM, zmenšovala se nebo jinak degradovala byla ponechána proto, aby byl statistický soubor kompletní. K další kultivaci (stádium maturace) však již tyto kultury nebyly použity.

Jedním ze způsobů jak prokázat embryogenní schopnost kultur je barvení explantátů a následné vyhodnocení pod mikroskopem. Jokinen a Durzan (1994) používali acetokarmin pro obarvení hlaviček vznikajících embryí nebo Evansovu modř pro obarvení suspenzoru.

Jako jeden z dalších způsobů poodhalení vnitřní struktury ESM autoři popisují (Vágner a kol., 2005a) barvení pomocí použití stříbra nebo 4-6-diamino-2-fenylindol dichloridu (Giemsa, Feulgen). Toto barvení pak probíhá v několika krocích: 1/ fixace pletiva v 96 % ethanolu spolu s kyselinou octovou v poměru 3:1 (24 hod); 2/ promytí destilovanou vodou a následný přenos do 70 % ethanolu; 3/ hydratace po dvouminutových intervalech.

Rychlé barvení je možné provést pomocí trypan blue (0,04 % roztok ve vodě). Roztok se přidává přímo k malému kousku pletiva (o velikosti přibližně 2 mm) bez předchozí fixace. Po několika sekundách je přidána kapka vody a obarvené části jsou odstraněny pomocí celulózy. Tato metoda může být také použita pro ranná stadia maturace somatických embryí (Vágner a kol., 2005a).

Různí autoři popisují formování embryí ve stádiu proliferace rozdílně, viz. kapitola 4.3.1. Např. Dyachok a kol. (2002), Bozhkov a kol. (2002b), von Arnold a kol. (2005) hovoří ve stádiu proliferace o formování pro-embryonální hmoty (PEM) a tvorbě somatických embryí v různém stupni vývoje.

Smertenko a kol. (2003) ve své práci rozděluje PEM na tři morfologické skupiny: 1/ meristematické buňky proembryonální hmoty; 2/ finálně diferencované suspenzorové

buňky; 3/ trubicové buňky. Filonova a kol. (2000) ve svém článku rozděluje PEM na tři stádia (PEM I, PEM II a PEM III). Kritériem pro jednotlivá stádia je pak počet buněk a buněčná organizace. Velmi obdobně rozděluje systém PEM i Dyachok a kol. (2002).

Postupný nárůst vnitřní struktury PEM spolu s programovou buněčnou smrtí je nezbytný pro další fázi SE – formování embryí a jejich postupné zrání (Filonova a kol., 2000; Dyachok a kol., 2002; Bozhkov a kol., 2002b; Smertenko a kol., 2003; Bozhkov, 2005; Bozhkov a kol., 2005a; von Arnold a kol., 2005).

Bozhkov (2005) ve své práci popisuje dva vývojové procesy, které spouští právě PCD: 1/ PCD eliminuje přechodné embryogenní struktury (suspensor, který není potřeba v dalších fázích SE); 2/ PCD eliminuje nepřipravená (ne zcela zformovaná) embrya; tato funkce platí také mimo *in vitro* systém, např. při reakcích na stres nebo mutageny a je to také běžný rys rostlinných druhů, které produkují polyembryotická semena.

Auxiny a cytokininy jsou důležité pro formování PEM a proliferaci. Vyčerpání auxinů z média blokuje vývoj PEM a způsobuje buněčnou smrt ve velkém rozsahu (Dyachok a kol., 2002; von Arnold a kol., 2005). PCD po vyčerpání růstových regulátorů (PGR – auxiny a cytokininy) ovšem stimuluje PEM k formování embryí. PCD je obvykle doprovázena poklesem pH v médiu (von Arnold a kol., 2005).

Při pokusech ve stádiu proliferace bylo pH upraveno na 5,8 a byla použita média obohacená o auxiny i cytokininy. Nárůst ESM ve 4. a 8. týdnu byl největší na médiu LP4 resp. na médiu LP5. Jako třetí nejúspěšnější médium bylo podle výsledků vyhodnoceno médium LP3 opět pro 4. i 8. týden. Médium LP4 bylo obohaceno o nižší koncentrace auxinů i cytokininů (10 μM 2,4-D, 2 μM BAP a 5 μM kinetin). Médium LP5 bylo obohaceno jen o cytokininy (2 μM BAP a 5 μM kinetin). Třetí nejúspěšnější médium, viz. Přílohy Proliferace 12.2., bylo obohaceno o auxiny i cytokininy (10 μM 2,4-D, 2 μM BAP a 10 μM NAA).

Fází množení se zabýval Jokinen a Durzan (1994). Pro namnožení embryogenního pletiva (ESM) na požadované množství bylo použito poloviční koncentrace LP média doplněné sacharózu (60 μM) a růstové regulátory 2,4-D (10 μM), BA (5 μM). Stejně médium, ale v plné koncentraci používají pro pokusy již v roce 1986 autoři von Arnold a Hakman. Byla zkoumána rozdílná koncentrace sacharózy (1,5, 10, 20, 30, 40, 50 g.l^{-1}) na LP médiu obohaceném o 2,4-D (10 μM) a BAP (5 μM).

Porovnání s výše zmíněnými pracemi je zajímavý poznatek Tremblay (1990), kdy autor popisuje nevhodnou koncentraci růstových regulátorů na LP médiu. Při použití 10 μM 2,4-D spolu s 5 μM BAP začíná bílé embryogenní pletivo po třech měsících kultivace hnědnout a přestává růst.

Velmi úspěšnou proliferaci uvádí Vágner a kol. (1998) na médiu GD obohaceném o 2,4-D (5 μM), BAP (2 μM) a kinetin (2 μM). Na tomto médiu se zvětšovala čerstvá embryogenní hmota po 7 dnech 3,2-4,8x a během 13 měsíců nebylo zaznamenáno snížení rychlosti nárůstu.

Identické médium jako používá Vágner a kol. (1998) bylo použito při pokusech v laboratořích KDŠDL a bylo označeno GD4. Nejmenší nárůst ESM ve 4. týdnu byl zaznamenán na médiu GD3 a GD4, resp. nejmenší nárůst embryogenní hmoty byl zaznamenán v 8. týdnu na médiích GD4 a GD3, viz. Přílohy Proliferace 12.2.

Výsledky ukázaly, že je ve fázi proliferace má signifikantní vliv na vývoj kultury právě kultivační médium a hladiny růstových regulátorů. Vzhledem k výše popsaným výsledkům v laboratoři KDŠLD a výsledkům jiných autorů lze říci, že embryogenní linie reagují zcela rozdílně na předem ověřená média a hladiny růstových regulátorů. Stejně jako v předchozím stádiu SE vysvětlení se nabízí v podobě systémové chyby (špatná kalibrace pH metru apod.) nebo se může jednat o jiný blíže nespecifikovatelný jev. Jako jedno z možných vysvětlení se pak nabízí prokázaný signifikantní vliv jednotlivých embryogenních linií, resp. jejich genetické dispozice na proliferaci (ve 4. i 8. týdnu). Jako další možné vysvětlení se nabízí interval pasážování.

Vágner a kol. (2005a) uvádí, že optimální interval subkultivace je 1-2 týdny. Pro linii AFO 541 pak doporučuje přenos na čerstvé médium každý týden. Von Arnold (1987) uvádí, že pokud nedochází k pasážování dostatečně často, tvoří se aberativní embrya. Interval pasážování pak autorka uvádí v rozmezí 2 týdnů až 1 měsíce. Jako optimální, uvádí Jokinen a Durzan (1994), přenos na čerstvé médium 2x v intervalu 35 dní, nejpozději však 1x za 10 dní. Díky delšímu intervalu pasážování pak podle autorů může dojít k pronikání polyembryogenních shluků do sebe, což vede k vývoji nediferencovaného pletiva. Autoři zaznamenali, že snížená produkce somatických embryí často souvisí se ztrátou embryogenního potenciálu kultury po dlouhodobém udržování

kultury a obvykle je doprovázena i morfologickými abnormalitami (Jokinen a Durzan, 1994).

Ve svých pokusech jsem volila interval pasážování 2 týdny, vzhledem k předchozím zkušenostem s růstovou dynamikou kultur a prostudované literatuře. Aby mohl být zaznamenán přírůst ESM v čase byl explantát pouze přenesen na čerstvé médium, nebyl očištěn o neembryogenní shluky ani jinak ovlivněn. Proto je možné, jak uvádí např. Jokinen a Durzan (1994), že došlo k anatomickým změnám, které mohly ovlivnit vývoj ESM a její další růst. To by vysvětlovalo proč u linie AFO 541 nedošlo k většímu nárůstu ESM (4. a 8. týden), viz. Přílohy Proliferace (12.2.)

Již v této fázi se u jednotlivých linií ukázala rozdílná růstová dynamika i adaptabilita na laboratorní podmínky. Jako velmi zajímavý jev považuji fakt, že na konci fáze iniciace bylo celkem 383 embryogenních linií, ale pokusy bylo možno začít jen se 43 liniemi, viz. kap. 6.2. U většiny kultur došlo pravděpodobně k anatomickým změnám, které způsobily snížení embryogenního potenciálu, stejně jako uvádí Ulrychová (2004). Dalším možným, vysvětlením je špatná adaptabilita daných linií na laboratorní podmínky, nebo nevhodně zvolené kultivační podmínky.

Velmi dobře se pak v kultivaci dařilo liniím 25.6.1, 25.6.2., 16.6.3. (dle výsledků po čtyřech týdnech kultivace) a liniím 16.6.1., 16.6.3., 25.6.2. a linii 25.6.3. (dle výsledků po osmi týdnech kultivace), viz. Přílohy Proliferace (kap. 12.2.).

Z výsledků SASu vyplývá, že embryogenní linie 25.6.1. má velmi dobrou adaptabilitu na laboratorní podmínky a vyhovuje jí i daný subkultivační interval. Tato linie ve 4. i v 8. týdně dosahovala konstantně velmi dobrých výsledků v nárůstu ESM. Linie 7.5.9, která ve 4. týdně dosahovala srovnatelných výsledků s linií 25.6.1. v 8. týdně spadala již do druhé skupiny linií (až druhé nejlepší přírůsty). Linie 25.6.2, 16.6.3. a 25.6.3. dosahovaly stejné růstové dynamiky ve 4. i v 8. týdně, a spadají do skupiny druhé nejlepší přírůsty. Na základě těchto výsledků lze říci, že tyto embryogenní linie jsou vhodné pro dlouhodobou kultivaci nebo jako modelové linie, protože se chovají standardně i v modifikovaných podmínkách.

V dalších pokusech by bylo vhodné změnit design pokusu a podrobit kultury anatomickým studiím. Pomocí barvení nebo mikroskopování by pak byly odhaleny případné morfologické abnormality na daném vzorku. Praktické využití je pak velmi

složité, protože jednotlivé charakteristiky kultur se liší nejen vnitrodruhově ale i u jednotlivých embryogenních linií (Vágner a kol., 2005a). Rozšíření možnosti kultivace na suspenzních kulturách (prámcích) a na médiích s novými kombinacemi růstových regulátorů by jistě také přineslo nové poznatky o proliferaci ESM *Picea abies*.

Jako poslední bych zde ráda zmínila dlouhodobou kultivaci ESM, resp. dlouhodobé udržování ESM. V laboratoři KDŠDL jsou dlouhodobě udržovány (5 i více let) některé embryogenní linie, které doposud neztratily embryogenní schopnost. Dunstan a kol. (1993) zaznamenali častou ztrátu embryogenního potenciálu kultury po dlouhodobém udržování (subkultivaci). Tato ztráta je pak obvykle doprovázena morfologickými abnormalitami (Dunstan a kol., 1993). Podrobná anatomicko-morfologická studie spojená s analýzou zásobních látek, právě těch kultur které doposud neztratily embryogenní schopnost, by jistě přinesla nové poznatky. Právě dlouhodobé udržení embryogenního potenciálu kultur je jednou ze základních podmínek pro modelové linie jako je AFO 541, C107 atd.

7.3. Maturace

V této fázi byla použita pro pokusy pevná živná média, obohacená o agar (6 g.l⁻¹).

Někteří autoři (Attree a kol., 1990; Gupta a kol., 1993) uvádí, že navození zrání embryí na tekutých médiích je obtížné. Obdobně uvádí i Vágner a kol. (2005b), že výtěžek somatických embryí na zpevněných médiích je vyšší v porovnání s kultivací na médiích tekutých. Schopnost produkovat zralá somatická embrya na tekutých médiích se liší v rámci druhů, stejně jako v rámci jedné embryogenní linie. Varianta kultivace na tekutých médiích je stále otázkou zájmu mnoha laboratoří, protože ke komerčním účelům je vhodné založit mikropropagaci na automatizaci samotného procesu (systém bioreaktorů), k čemuž jsou právě obzvláště vhodná tekutá média (Vágner a kol., 2005b).

Jako možná varianta se pak v praxi využívá kombinace média tekutého (suspenzní kultura) spolu s médiem pevným. Attree a kol. (1990), Gupta a kol. (1993) uvádí, že proliferace probíhala na tekutém médiu, zrání embryí pak na médiu pevném. Tímto postupem se výrazně zvýšil výtěžek kotyledonárních embryí (50 000-100 000 embryí na litr ESM suspenze). I přesto je tento postup nevhodný pro automatické využití (Vágner a kol., 2005b).

Jako další praktická možnost kultivace ve stádiu zrání embryí se v poslední době využívá kultivace na prámcích (Paek a kol., 2001), viz. kapitola 4.8.3. Velmi dobré výsledky kultivace *Picea abies* na prámcích uvádí Vágner a kol. (2005b). Při pokusech došlo k synchronizaci zrání somatických embryí a zkrátila se také doba potřebná ke zrání embryí. Samotné pasážování kultur na čerstvá média je pak méně časově náročné a praktičtější, protože dochází k manipulaci pouze prámku a ne celé kultury (Vágner a kol., 2005b).

Embryogenní kultury (bílé až lehce nažloutlé, konzistentní) stejně jako typicky embryonálně suspenzorová hmota jehličnanů - bílá až průsvitná, kdy ranná somatická embrya jsou převážně kompaktní (Svobodová a kol., 1999) byla přenesena za sterilních podmínek na maturační médium. Změna kultivačního média z proliferačního na základní maturační byla pro raná somatická embrya testovaných embryogenních linií signálem pro zahájení dalšího vývoje embryí.

Po přenosu embryogenní kultury na základní maturační médium pokračovalo částečně narůstání biomasy a somatická embrya založená v ESM začala zrát. V následujících týdnech kultivace docházelo k postupnému zvětšování somatických embryí. Část embryí se, dle klasifikace von Arnold a Hakman (1988; viz kap. 4.4.2.), vyvíjela ze stádia 1 (typické uspořádání pro proliferaci a počátek zrání) pouze do stádia 2 (embrya bez děloh). Stádia 3 (embrya s vyvíjejícími se dělohami) dosáhla pouze některá embrya. Podle Jalonen a von Arnold (1991) je u raných embryí jehličnanů před ošetřením ABA vyžadován jistý stupeň morfologické organizace, jinak nejsou schopná na přítomnost ABA reagovat a podstoupit další fáze vývoje. Je tedy možné, že pouze některá raná somatická embrya v proliferační kultuře byla dostatečně vyvinutá, aby se mohla v reakci na ABA dále vyvíjet, zatímco ostatní embrya tuto schopnost neměla. Tyto skutečnosti poukazují na to, že se raná somatická embrya v embryogenní kultuře během proliferace nevyvíjela zcela synchronně. Např. na části explantátu, která se přímo dotýkala média (bez přístupu vzduchu) embrya vznikala pouze ojediněle. Vývoj probíhal v rámci explantátu víceméně rovnoměrně, i přesto po měsíci byla malá část embryí v počáteční fázi vývoje a naopak. Zejména embrya na okrajích explantátu na rozhraní s médiem byla vyvinutější než embrya, která vznikala uprostřed kultury, viz. obr. č. O12b.

K zdárnému průběhu fáze maturace a s navazujícími pokusy (germinace) bylo nezbytné charakterizovat vývoj embryogenních kultur i přesto, že nemohl být popsán vývoj

somatických embryí po stránce anatomické. Byly tedy použity základní klasifikace, aby bylo možné zaznamenat odlišnosti v utváření embryí a případně zachytit rozdílné morfologické uspořádání.

Klasifikace zrání embryí byla použita podle autorů Svobodová a kol. (1999), viz. kapitola 4.4.2. Počátek formování embryí byl zjištěn zhruba ve druhém týdnu zrání. Po dvou týdnech maturace bylo možné pouhým okem pozorovat světle žlutá globulární somatická embrya, která přesahovala povrch kultury, viz. obr. č. O9. Ve třetím až čtvrtém týdnu zrání se začaly objevovat dělohy, viz. obr. č. O10. Již v této fázi vývoje bylo možné odhalit u některých embryogenních linií četné vývojové abnormality - kořenový pól embryí byl často nekompaktní, jeho integrita byla rozrušena; bylo možné pozorovat kalusovatění povrchových částí embryí, např. linie 25.6.8., 7.5.9., 16.6.7. V pátém a šestém týdnu zrání u některých linií tento trend pokračoval – kořenová čepička se často rozpadala; v oblasti kořenového pólu docházelo mnohdy ke kalusovatění. Na konci zrání docházelo někdy i k hnědnutí kultury a prodloužení kultivace nevedlo k dalšímu vývoji embryí naopak docházelo k celkové degradaci kultury.

Jako zralá embrya byla vyhodnocena právě ta, která měla zřetelně vyvinutý apikální meristém, prokambiólní základy, dobře vyvinuté dělohy a kořenový meristém, viz. obr. č. O12a. Právě dobře vyvinutý apikální meristém spolu s vyvinutým kořenovým meristémem popisuje jako nezbytnou část zralých embryí *Picea glauca* Stasolla a kol. (2002).

Egertsdotter a von Arnold (1995) rozdělily embryogenní linie do dvou skupin – A a B (viz kap. 4.3.1.). Část embryogenních linií (např. 16.6.3., 16.6.1, 25.6.2) bych přiřadila z hlediska charakteru proliferující kultury spíše do skupiny A, kam byly zařazeny linie s vyvinutými ranými embryi, kde suspenzorová část embryí byla dobře odlišitelná. Oproti tomu z hlediska schopnosti zrání bych část embryogenních linií (např. 7.5.6., 12.5.1., 7.5.9.) řadila do skupiny B, do které byly zařazeny embryogenní linie, které poskytovaly pouze velmi málo zralých somatických embryí.

Autoři v odborné literatuře doporučují zlepšení výtěžku a kvality somatických embryí pomocí působení osmotického stresu (viz kap. 4.4.3.). Pro zrání somatických embryí byl tedy zvolen PEG-4000, vysokomolekulární nepenetrující osmotikum. Jako proměnlivá byla volena hladina ABA, viz. kap. 4.4.3.

Možností, jak částečně vysvětlit působení PEGu na embryogenní kultury jehličnanů, jsou interakce mezi působením PEGu a ABA, viz. kapitola 4.4.3. PEG působí určité změny pravděpodobně tím, že vyvolává osmotický stres, na který pak reaguje ABA, jakožto hormon účastníci se stresových reakcí (Attree a kol., 1995; Kong a Yeung, 1995; Find, 1997; Högborg a kol., 1998). Autoři Svobodová a kol. (1999) se těmito interakcemi podrobněji zabývali - testovali použití a vliv polyethylenglykolu o koncentracích 37 a 75 g.l⁻¹. Podle jejich výsledků je přídavek PEG do média vhodný pro urychlení vývoje somatických embryí, prodloužení vyvíjejících se embryí a jejich úspěšnému dozrávání, příliš vysoká koncentrace však může vést ke vzniku abnormalit vývoje.

Mnoho autorů pozorovalo po aplikaci PEGu do média sice zvýšení výtěžků somatických embryí, zároveň také ale byly pozorovány morfologické změny (Find, 1997; Svobodová a kol., 1999). Nižší koncentrace PEGu (3,75 %) klíčivost embryí neovlivňovala, tato embrya obsahovala trhliny pouze zřídka (viz. kapitola č. 4.4.3.), ale naopak proces zrání urychlila a zvýšila počet vytvořených embryí. Při pokusech byla zvolena hladina PEGu 2 % a nebyly shledány žádné větší morfologické abnormality.

Obdobnou koncentraci PEGu (2,35 %) použila ve svých pokusech Ulrychová (2004). Autorka uvádí, že došlo k zvýšení výtěžnosti zralých somatických embryí. Kvalita získaných somatických embryí linie AFO 541 však byla, na rozdíl od všech ostatních zkoumaných variant, horší. Tato embrya měla narušenou kořenovou čepičku a ve středové části embryí se nacházely řady mrtvých buněk (Ulrychová, 2004).

Linie AFO 541 v laboratořích KDŠLD dosahovala u všech variant velmi nepříznivých výsledků. Linie AFO 541 produkovala velmi málo embryí a to v průměru 3,73 embryí/cm² na médiu GD5, resp. 2,67 embryí/cm² na médiu LP6. I přesto, že média GD5 a LP6 nepatří mezi nejúspěšnější, průměrné výsledky ostatních linií jsou výrazně lepší (GD5 6,68 % průměrný počet embryí/cm² a LP6 7,48 embryí/cm²), viz. kap. Přílohy Maturace (12.3.). Jako jedno z možných vysvětlení tohoto vývoje embryí u linie AFO 541 může být nízká koncentrace PEGu, která právě na linii AFO 541 nepůsobí příznivě, viz. Ulrychová (2004).

Jako další možnost, která by vysvětlovala nepříznivý růst linie AFO 541 může být délka kultivace, resp. snížená stabilita embryogenní kultury. Dunstan a kol. (1993) zaznamenali, že snížená produkce somatických embryí často souvisí se ztrátou embryogenního

potenciálu kultury po dlouhodobém udržování (subkultivací) kultury a obvykle je doprovázena morfologickými abnormalitami. Zde je nutné poznamenat, že linie AFO 541 byla odvozena před 12 lety ve Francii. Už ve fázi proliferace AFO 541 nepůsobilo jako standardizovaný vzorek. Tento jev se dá vysvětlit kultivační chybou, způsobenou např. kultivací na médiu nevhodného složení, špatně zvolenou dobou subkultivace ve fázi proliferace, nebo celkovou délkou kultivace v *in vitro* podmínkách. Linie AFO 541 si proto v ostatních laboratořích může stále udržovat dobrou embryogenní schopnost.

Ztrátu embryogenní schopnosti popisuje ve své práci např. Ulrychová (2004) a to pro linii C107. Tato linie byla odvozena v Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky (ÚEB AV ČR) pracovní skupinou RNDr. Martina Vágnera CSc. v červenci 1998. Po ztrátě embryogenní schopnosti byla linie C107 vyřazena z dalších experimentů.

Jako úspěšné linie se v této fázi projeví např. linie 16.6.3., 25.6.2., 7.5.7., 25.6.10., 16.6.1. Tyto embryogenní linie si ponechaly embryogenní schopnost a dosahovaly velmi dobrých výsledků při nárůstu ESM.

Některé embryogenní linie jehličnanů jsou stabilní po mnoho let, zatímco jiné ztrácejí embryogenní potenciál již po několika měsících kultivace na proliferačním médiu (např. Mo a von Arnold, 1991; Högborg a kol., 1998). Abnormálně utvářená embrya se však často vyskytují i při použití kultivačního média o nevhodném složení. Požadavky na optimální kultivační podmínky jsou často genotypově specifické, liší se nejen mezi druhy, ale i vnitrodruhově (Jain a kol., 1995).

Nejvyššího průměrného výtěžku zralých somatických embryí na cm^2 bylo dosaženo na médiu LP7 (15,16 embryí/ cm^2). Na médiu LP7 byl také získán nejvyšší počet zralých embryí/ cm^2 a to 25,2 u linie 16.6.3. a 18,4 embryí/ cm^2 u linie 16.6.1.

Jako druhé nejúspěšnější médium bylo statisticky vyhodnoceno médium LP8 (10,12 embryí/ cm^2). Stejně tak embryogenní linie na tomto médiu dosahovaly druhých nejlepších výsledků v počtu embryí na cm^2 . Linie 16.6.3. - 13,8 embryí/ cm^2 , vše viz. Přílohy Maturace (12.3.) Souhrnně lze říci, že zrání probíhalo optimálně při středních hladinách ABA (6 mg.l^{-1} , resp. 10 mg.l^{-1}).

Tyto výsledky je možné srovnávat s výsledky jiných autorů (Bozhkov a kol., 1992; Egersdotter, 1996; Find, 1997; Fourre a kol., 1997; Högborg a kol., 1998; Vágner a kol., 1998), kteří používali koncentraci ABA většinou v rozmezí 3-10 mg.l⁻¹.

O téměř srovnatelnou hladinu ABA (5 mg.l⁻¹) bylo obohaceno médium GD5 a embrya, která se tvořila právě na tomto médiu dosahovala nejhorších průměrných hodnot (6,68 embryí/cm²).

Vágner a kol. (1998) testoval koncentrace 5-10 µM ABA na maturačním GD médiu. Celý rozsah testovaných koncentrací ABA vyvolával další vývoj somatických proembryí smrku na pevném i tekutém médiu, ABA v koncentraci 10 µM podporovala vývoj nižšího množství embryí, ale o lepší kvalitě. V jiné práci Vágner a kol. (2005a) uvádí, že optimální kultivace probíhala na GD médiu při koncentracích 20 µM ABA spolu s 5 % PEGem. Vývoj somatických embryí započal 1-2 týdnů po přenesení kultury na maturační médium. Doba potřebná k dozrání embryí se pak liší podle jednotlivých embryogenních linií a pohybuje se okolo 4-7 týdnů (Vágner a kol., 2005a).

Ovlivnění ABA během zrání, jak uvádí Webster a kol. (1990), bylo závislé na embryogenní linii. Během vývoje se objevovalo široké spektrum vývojových profilů. Jedena linie, jak uvádí autoři, se formovala při koncentraci 20 µM ABA (vysoké procento embryí s vrcholky), při koncentraci 40 µM pak předčasně embrya předčasně klíčila a při koncentraci 60 µM převládala v kultuře zralá embrya. Jiná linie produkovala zralá embrya na všech koncentracích ABA s optimem 40 µM. U většiny linií nízká koncentrace ABA (20 µM) způsobovala předčasné klíčení (30 genotypů). Optimální koncentrace pro většinu embryogenních linií se pak podle autorů pohybovala mezi 40-60 µM, přitom 4 kultury měly nulovou produkci embryí na uvedených koncentracích. 20 % kultur vytvářelo méně než 20 embryí/gram což se produkčně jeví jako neefektivní (Webster a kol., 1990).

Z explantátů zygotických embryí *Picea abies* v pokusech von Arnold a kol. (1995) produkovala pletiva 200-1500 embryí na 1 gram kultury.

Výsledky dozrávání embryí v laboratořích KDŠLD u smrku ukazují příznivou reakci na vliv ABA (6 mg.l⁻¹) a PEG (20 g.l⁻¹). Jako signifikantní, se podle statistických výsledků, ukázal vliv média i embryogenních linií (lokality) na fázi maturace. Opět se také potvrdilo, že určitý typ média, na kterém se zpočátku iniciuje vznik velkého počtu

nezralých embryí, nemusí být zcela vhodný pro jejich další vývoj a současně, že velká produkce embryí nemusí nutně souviset s jejich velkou kvalitou.

Nastartování zrání (zastavení proliferace a zahájení dalšího vývoje) a zdárný průběh zrání jsou dva rozdílné procesy, i když samozřejmě spolu úzce souvisejí (Vágner a kol., 2005a). Zde je důležité zmínit, že produkce zralých somatických embryí závisí také na složení maturačního média, které se může pro jednotlivé linie lišit (viz kap. 4.4.3.). Je tedy možné, že embryogenní kultura kultivovaná na nevhodném maturačním médiu špatně zraje a produkuje malé množství zralých somatických embryí často o zhoršené kvalitě, přestože proliferace probíhá standardním způsobem. Stabilita kultur ve stádiu maturace a výtěžek zralých somatických embryí pak přímo souvisí s fází proliferace.

Mo a kol. (1989) testovali stabilitu embryogenní kultury *Picea abies* tím, že 3x opakovali proces tvorby a zrání somatických embryí. Schopnost embryogenní kultury produkovat embrya schopná přeměny v rostliny se přitom nijak nesnížila; rovněž nedocházelo ke změnám obsahu DNA v jádře.

Stabilitu samotného embrya a embryogenních kultur je v této fázi možné prokázat barvením pomocí parařinové vrstvy (silná 12 μM). Parařinové průřezby jsou barvené ve dvou fázích: 1/ alcianová modrá (0,1 % alcian blue) označí buněčné stěny; 2/ další přidaná červená barvicí látka (1 % nuclear fast red) pak označí chromatinové struktury v jádře. Tyto parařinové preparáty se používají pro analýzu vývoje embrya, stejně jako pro určení struktury a vývoje ESM (Vágner a kol., 2005a).

Výsledky fáze maturace by bylo vhodné doplnit ještě o zrání embryogenních linií na všech médiích, resp. doplnit statistický soubor. Tento fakt, je ale velmi problematický vzhledem k snižování embryogenní schopnosti některých linií, pravděpodobně již ve stádiu proliferace. Jako řešení tohoto problému se pak jeví použití digitální kamery ve stádiu maturace. Mikroskopování kultury a celého embrya je vzhledem k rozměrům embrya obtížné, proto je kultura umístěna do Petriho misek proti kontrastnímu pozadí. Obrazová analýza (Lucia, verze 4.64) např. umožňuje série analýz s rozměrnými objekty zaměřené na průběžné změny povrchu směrem ke středu objektu. Výsledná analýza má vysokou hloubku ostrosti a je kombinována s jednotlivými snímky objektu. K tomuto produktu patří i software umožňující analýzu snímků (ESM, embrya) (Vágner a kol., 2005a). Filonova a kol. (2000) doporučuje sledovat strukturu utváření embryí pomocí

mapy, která odhaluje vývoj buněčných struktur spolu s morfologickými a molekulárními markery.

7.4. Desikace a germinace

Na médium navozujícím klíčení byla nasazována jednak embrya, která nebyla post-maturačně ošetřena (nedesikovaná kontrolní varianta), ale také embrya, která prošla pomalou ztrátou vlhkosti, tzv. desikací (17 °C) po dobu 21 dnů. Existuje mnoho desikačních protokolů a variant vylepšování post-maturační fáze. Účinek tohoto kroku je ovšem závislý na rozdílnosti jednotlivých embryogenních linií. Nejčastěji používaná varianta desikace pak je vystavení embryí vysoké vzdušné vlhkosti (98 %) za působení stejné nebo mírně snížené teploty (+18 °C) po dobu 2-5 týdnů (Vágner a kol., 2005a).

Germinační médium bylo obohaceno o agar (6 g.l⁻¹), tzn. fáze klíčení probíhala na zpevněném živném médiu. Rozdílné ztužovací látky (agar, gelrit, transfer agar a phytoagar) v GD médiu testoval v této fázi Vágner a kol. (2005a).

Použití pevného živného média v této fázi uvádí i Attree a kol. (1994). Autoři popisují metodiku nízkorozpočtového množení *Picea glauca* v systému bioreaktorů na tekutých médiích. Ve fázi germinace však používají pevné živné médium, protože dosud nebyl publikován postup úspěšný pro fázi germinace na tekutých médiích (Attree a kol., 1994).

Kultivaci na tekutých médiích v této fázi zmiňuje o několik let později Högberg a kol. (2001). Autoři použili ve stádiu germinace nejprve pevné živné médium, a posléze tekuté médium. Výsledkem byl dobře vyvinutý kořenový systém rostlin a možnost přesunout po fázi germinace klíční rostliny rovnou do skleníku.

Post-maturační vývoj a morfologická struktura byla předmětem pozorování i v laboratoři KDŠLD. V této fázi je vývoj klíční rostliny dobře pozorovatelný i makroskopicky, tedy bez bližší anatomické studie. Na základě prostudované literatury (Attree a kol., 1994; Bozhkov a von Arnold, 1998; Filonova a kol., 2000; Stasolla a kol., 2002; Stasolla a Yeung, 2003; Vágner a kol., 2005a) a předchozích zkušeností byly zvoleny parametry klíční rostliny tak, aby byla připravena k přenosu do *ex vitro* podmínek.

Pro optimálně se vyvíjející embrya (u desikované varianty i nedesikované) bylo po uplynutí subkultivačního intervalu charakteristické načervenalé zbarvení kořenového pólu a části hypokotylu, viz. obr. č. O13b. Desikovaná somatická embrya klíčila normálně – hypokotyl a

dělohy postupně zelenaly, hypokotyl se rovnoměrně prodlužoval, viz. obr. č. O14. Výrazné prodlužování v poměru k hypokotylu vykazoval kořínek, jeho barva byla spíše žlutočervená, viz. obr. č. O15.

Především u varianty, která neprošla desikací byly vidět morfologické abnormality. Vzhled embryí nevystavených pomalému vysoušení se příliš nezměnil od posledního týdne zrání. Hypokotyl se prodlužoval jen pomalu, patrné bylo celkové zduření a sytě zelená barva, viz. obr. č. O18. Kořínek se nevyvíjel, na kořenovém pólu bylo navíc pozorováno kalusovatění, viz. obr. č. O18, u některých embryí byl pozorován náznak vývoje kořínku, viz. O18. Některá embrya se začala protahovat a jevila známky etiolizace, viz. obr. č. O16.

Při desikaci byla embrya vystavena světelné periodě, viz. kap. 5.7. V tomto bodě Vágner a kol. (2005a) uvádí doposud neobjasněnou roli světla ve fázi desikace. Attree a kol. (1991) používají rovněž mírné světlo ve fázi desikace (fotoperioda 12 h/12 h). Mírně zlepšenou výtěžnost klíčnicích rostlin pak uvádí Vágner a kol. (2005a) při působení matného světla (fotoperioda 12 h/12 h).

Desikace byla u somatických embryí *Picea glauca* x *engelmannii* navozena poprvé v experimentu autorů Robertse a kol. (1990b), s cílem zlepšit klíčení embryí a zvýšit celkovou produktivitu. Vliv desikace na klíčnicí rostliny je, podle statistických výsledků uvedených v kap. 6.4. signifikantní. Vzrostlé klíčnicí rostliny ošetřené desikací dosahovaly v průměru 2-4x vyššího poměru klíčnicích rostlin než rostliny neošetřené, viz. tab. 13. Vliv desikace je patrný při porovnání výsledků embryogenních linií 16.6.2. a 16.6.4., viz. tab. 14 a 15. Obdobné výsledky uvádí i Roberts a kol. (1991), Attree a kol. (1995), Bomal a Tremblay (1999).

Pozitivní působení desikace popisuje ve své práci také Chalupa (1997). Embrya, která prošla desikací vykazovala v průměru 22,05 % úspěšnosti konverze ve zralé rostlinky oproti 5,8 % utvořených klíčnicích rostlin bez vlivu desikace. Nejlepších výsledků (30,06 %) bylo dosaženo po desikaci oproti 10,54 % na stejném vzorku bez desikace.

Attree a kol. (1995) ve své práci poukazují na fakt, že embrya, která jsou produkována pomocí bioreaktorů jsou více tolerantní k desikaci než embrya kultivovaná po celou dobu na pevných médiích. Autoři při pokusu vystavily embrya tzv. rychlé desikaci (5 % vlhkost/7-8 týdnů). Po tomto ošetření konverze v rostliny probíhala v rozmezí 60-70 %.

Vysoušení (desikace) indikuje v embryu ukládání zásobních látek a napomáhá přechodu embrya do fáze klíční rostliny (Attree a Fowke, 1993; Bachman a kol., 1994; Downie a Bewley, 2000; Lipavská a kol., 2000b; Bomal a kol., 2002). Během vysoušení se v embryu děje celá řada procesů jako např. snižuje se endogenní hladina ABA (Find, 1997), je redukována biosyntéza ethylenu (Kong, 1994 v Stasolla a Yeung, 2003) a probíhají i změny v nukleové kyselině (Stasolla a kol., 2003), viz. kapitola 4.5.

Bozhkov a von Arnold (1998) ve svém experimentu pozorovali HRH vysoušení embrya spolu s obsahem vody (WC) v embryu. Výsledek experimentu ukázal, že WC v desikovaném embryu závisí na délce ponechání embrya na médiu maturačním. Při ponechání embryí 5 týdnů na maturačním médiu WC dosáhl nejnižšího obsahu (rozmezí 25-35 %) během prvních 8 dní HRH procedury, a dále se obsah vody v embryu zvyšoval jen částečně. Při ponechání embryí 7 týdnů na maturačním médiu byl zaznamenán při HRH proceduře také pokles WC (15-25 %) během 8-16 dnů. Tento pokles byl ale následován rehydratací embrya (po 24 dnech), kdy obsah vody v embryu dosáhl téměř na původní hodnoty jako na začátku pokusu. Jak uvádí autoři, prvotní ztráta s následnou imbibicí by mohla vysvětlovat procentuální nárůst klíčivosti embryí, v porovnání s embryi kultivovanými 5 týdnů na maturačním médiu (Bozhkov a von Arnold, 1998). Výsledky částečného nebo plného vysoušení embrya závisí na poměrech během fáze maturace (Stasolla a kol., 2003).

Tyto poznatky jsou typické pro proces somatické embryogeneze, protože jak uvádí Stasolla a kol. (2002) optimální průběh kroku předchozího se odráží v krocích následných.

Na statistických výsledcích není patrný jen signifikantní vliv desikace, nýbrž i signifikantní vliv germinačního média na vývoj klíčících rostlin.

Médium navozující zrání neobsahuje růstové regulátory, obsah sacharidů je snížen a většinou je doplněno o aktivní uhlí (Gupta a Grob, 1995). Obsah sacharózy byl v germinačním médiu snížen na 10 g.l⁻¹. Aktivní uhlí bylo použito jako přídatek celkem u dvou médií, a to média LP10 (AC - 250 µM) a ½ GD6 (AC - 333 µM).

Vliv přídatku aktivního uhlí do média se významně projevil u média LP10 zvýšením počtu vyvíjejících se klíčících rostlin, bez rozdílu, byla-li předtím embrya desikována či nikoli.

Při porovnání výsledků médií na celém souboru vzorků bylo nejlepších výsledků dosaženo na médiích obohacených o AC. Pro desikovanou variantu pak na médiu s obsahem 3 g.l⁻¹ AC (LP10) bylo vytvořeno v průměru 30,06 % klíčnicích rostlin, a na médiu s obsahem 4 g.l⁻¹ (1/2 GD6) bylo vytvořeno 22,4 % klíčnicích rostlin, viz. Přílohy Germinace (12.4.). Pro nedesikovaný vzorek pak bylo nejlepších výsledků dosaženo na 1/2 GD6 médiu (12,38 % klíčnicích rostlin), a s tím pak jsou statisticky srovnatelné výsledky média LP10 (10,54 %), v tabulce č. 13 (klíčení bez desikace média celkové).

Mnoho laboratoří užívá AC pro zlepšení kondice kultur v *in vitro* podmínkách. AC se původně přidávalo do média za účelem barvené změny média, tedy aby simulovalo barvu půdy a indukovalo tak lépe zakořeňování kultur. AC také zvyšuje u kultur citlivost a schopnost reagovat na somatickou embryogenezi, organogenezi, produkci adventivních prýtlů, růst prýtlů a zakořeňování kultur (Van Winkle a Pullman, 2005).

Přídavek AC do živného média má ovšem i inhibiční vliv na tvorbu kořenů a také pohlcuje některé látky přidané do média (Pullman a Johnson, 2002). Mezi další vlivy, které může ovlivnit AC patří např.: úprava pH média, adsorpce nežádoucích látek (případně látek inhibičních), adsorpce vitamínů iontů kovů, adsorpce růstových regulátorů včetně ABA a plynného ethylenu (Pullman a kol., 2005).

Pullman a Gupta (1991) kombinovali 1,25-2,5 g.l⁻¹ AC spolu s vysokou koncentrací ABA nebo 2,4-D, BAP a kinetinem. Cílem bylo získat požadovanou hladinu růstových regulátorů. Jak ve své práci uvádí Van Winkle a Pullman (2005) častým problémem při aplikaci AC je právě adsorpce růstových regulátorů a rostlinných hormonů, protože není známo kolik těchto látek zůstává pro kultivovanou rostlinu k dispozici v živném médiu. Autoři ve svém pokusu použili šest různých druhů AC (Sigma C-5260, N2, Sigma C-9157, T2, Norit Sx2, Norit Sx4, Darco G60, Merck), které se lišili např. v objemu pórů (cm³/g, vlhkosti atd.). Pokusy byly prováděny na tekutých médiích, aby mohlo dojít k snazší analýze médií, resp. hladiny růstových regulátorů v médiích.

Autoři uvádí, že během prvního dne AC pohltilo 90 % obsahu BAP a 75 % obsahu 2,4-D. Po celou dobu sledování (36 dní) obsah růstových regulátorů i nadále v médiu klesal. Nejméně pak pohlcoval AC typu Norit Sx2, N2, N1 a Darco G60.

U *Picea glauca x engelmannii* popsali Webster a kol. (1990) možnost získání zralých embryí z embryogenního pletiva kultivovaného na médiu VE (Webster a kol., 1990)

s přídavkem 1 % AC. Další kultivace pokračovala po týdnu na médium s IBA (1 μM) a bez AC, následně 5 týdnů na médiu obohaceném o ABA (0, 20, 40, 60 μM). Embrya byla označena jako zralá ve stádiu neprůhledných embryí s dobře vyvinutými dělohami.

Ruaud (1993) uvádí možnost použít média s AC na kratší dobu (týden) mezi fází množení a zrání, eventuelně mezi fázemi zrání a konverze. Autor použil u *Picea abies* médium GD s přídavkem AC (10 g.l⁻¹) na dobu 1 týden při přenosu z proliferačního média na médium s ABA (20 μM). Po 35 dnech na médiu s přídavkem ABA byla embrya dostatečně vyvinutá. Výsledky této studie prokázaly pozitivní efekt přídavku aktivního uhlí do média s tím, že orgány zygotických embryí byly v každém stádiu větší než u somatických embryí.

Na hladině významnosti 95 % byl prokázán signifikantní vliv použitého média na klíčivost somatických embryí u desikované i nedesikované varianty. Při porovnání dvou embryogenních linií 16.6.2. a 16.6.4. bylo zjištěno, že pro desikovanou i nedesikovanou variantu se nejlépe osvědčilo médium LP10. U desikované varianty pak jako druhé nejúspěšnější bylo vyhodnoceno médium zcela bez přídavku růstových regulátorů (úspěšnost 24,96 %). Jako třetí u desikovaného vzorku (s úspěšností 18,45 %) a jako čtvrté u nedesikovaného vzorku (s úspěšností 2,38 %), tedy méně úspěšné viz. Přílohy Germinace (12.4.), bylo vyhodnoceno médium s obsahem IBA (0,4 μM).

Médium o poloviční koncentraci (N SIII; Jain a kol., 1988) použili Jain a kol. (1988) pro germinaci *Picea abies*. Toto médium nebylo obohaceno o žádné růstové regulátory a celkový počet vzniklých klíčnicích rostlin se pohyboval v rozmezí 11-15 %. GD médium také o poloviční koncentraci a bez růstových regulátorů použil Vágner a kol. (2005a). Autor se o výtěžku klíčnicích rostlin nezmiňuje, za to považuje jako velmi důležitou délku fotoperiody pro tuto fázi. Pro přeměnu embrya v rostlinu pak autoři Stasolla a Yeung (2003) doporučují rovněž médium bez růstových regulátorů spolu s nižší koncentrací sacharózy.

Někteří autoři uvádí, že ke konci fáze zrání embryí *Picea abies* přídavek nízké koncentrace auxinu může vylepšit kvalitu a množství vznikajících embryí (klíčnicích rostlin). Becwar a kol. (1989) popisuje kultivaci na LP médiu obohaceném o ABA (7-60 μM) a PEG (75 g), kdy bylo možno výsledný zisk embryí zlepšit přidáním IBA (1 μM) do média. Produkce embryí v počátečních fázích vývoje byla v jeho experimentech přibližně

700 embryí z 1 gramu embryogenního pletiva, ale pouze 3 % těchto embryí dosáhla fáze 3 - kotyledonárního stádia.

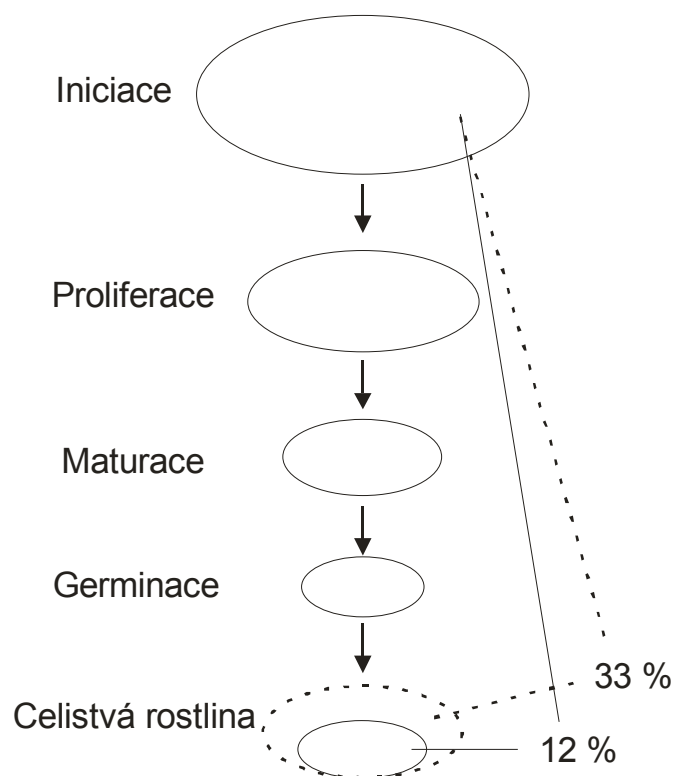
V této fázi somatické embryogeneze se nepodařilo potvrdit hypotézu o signifikantním vlivu embryogenních linií pro dané stádium. Jako úspěšné embryogenní linie pro tuto fázi pak byly vyhodnoceny linie 7.5.7. (s průměrem 45,83 % klíčících rostlin), následovaly linie 25.6.10. (40,83 %), 7.5.3. (36,67 %), 16.6.2. (34,78 %), 16.6.4. (34,62 %). Linie AFO 541 linie zde dosáhla 21,74 % klíčivosti, viz. Přílohy Germinace (12.4.).

I přesto, že se při pokusech nepodařilo prokázat vliv embryogenních linií, resp. jejich genetické dispozice Stasolla a Yeung (2003) uvádí, že schopnost embrya tvořit funkční kořenový systém spolu s tvorbou nadzemní části rostliny je přímo závislá na genotypu primárního explantátu.

Passerieux (1999) uvádí, že 25 % nasazených zygotických embryí je závislých na genetických vlastnostech; Högberg a kol. (1998) uvádí přibližně jednu třetinu genotypů vhodnou ke kultivaci *in vitro*. Jak uvádí Santanen (2000) počet genotypů, které by s úspěchem přešly ze stádia germinace do venkovní výsadby se pohyboval okolo 12 %. Ovšem změnou kultivačního protokolu, resp. jeho optimalizací lze zvýšit výtěžek až na 33 %, viz. obr. č. 2.

Bozhkov a von Arnold (1998) pro pokusy s maturací a germinací použili celkem 7 embryogenních linií. Po pěti týdnech konverze embryí došlo k výsevu rostlin. Vzhledem k rozdílné adaptabilitě na kultivační podmínky, výsev 326 rostlin byl možný pouze u čtyř linií (88.14, 88.17, 88.22 a 88.26). Aklimatizace kultur probíhala ve dvou stádiích: 1 /inkubace v hydroponické kultuře se stálou cirkulací živných roztoků a vysoké vzdušné vlhkosti (4 týdny); 2/ kultivace v substrátu (Grodania A/S). Jako optimální aklimatizaci pro *ex vitro* podmínky pak autoři považují 4 týdenní kultivaci v hydroponické kultuře s následnou 16 týdenní kultivací v substrátu.

Klíční rostliny jsou i nadále předmětem pozorování na KDŠLD, viz. obr. č. O19. Vývoj rostlin vznikajících při pokusech bude i nadále sledován, aby nedošlo k porušení kontinuity pokusu. K přenesení rostlin do nesterilních podmínek je používán mezistupeň a to kultivace rostlin při vysoké vzdušné vlhkosti v perlitu (poměr 100 % perlitu). Následuje výsev rostlin do substrátu s perlitem (1:1) opět za udržení maximální vzdušné vlhkosti. Posledním krokem je pak přesazení sazenic do skleníku.



Obrázek č. 2 – Ztráta emryogenních linií během SE (Santanen, 2000);

Plnně ohraničená plocha znázorňuje zbylé embryogenní linie po jednotlivých krocích SE; Čárkovaná linie pak znázorňuje očekávaný zůstatek embryogenních linií po vylepšení kultivačního protokolu, nárůst zhruba trojnásobný.

8. Závěry

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi médii, tzn. Hypotéza č. 1 byla potvrzena:

Médium má si signifikantní vliv na iniciaci ESM vzniklé ze zralých semen *Picea abies*.

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi lokalitami, tzn. Hypotéza č. 2 byla potvrzena:

Lokalita má signifikantní vliv na indukci ESM vzniklé ze zralých semen *Picea abies*.

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi médii, tzn. Hypotéza č. 6 byla potvrzena:

Na růst ESM kultur *Picea abies* má signifikantní vliv kultivační médium pro čtyři týdny i delší kultivaci (8 týdnů).

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi embryogenními liniemi, tzn. Hypotéza č. 7 – potvrzena:

Embryogenní linie (resp. genetická dispozice embryogenní linie) má signifikantní vliv na proliferaci embryogenních kultur *Picea abies* pro 4, resp. 8 týdnů kultivace.

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi médii, tzn. Hypotéza č. 11 – potvrzena:

Na výtěžek zralých somatických embryí *Picea abies* má signifikantní vliv kultivační médium.

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi embryogenními liniemi, tzn. Hypotéza č. 12 – potvrzena:

Embryogenní linie (resp. genetická dispozice embryogenní linie) má signifikantní vliv na výtěžek zralých somatických embryí *Picea abies*.

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi desikovanou a nedesikovanou variantou, tzn. Hypotéza č. 15 – potvrzena:

Pomalé vysoušení (desikace) embryí má signifikantní vliv na počet a kvalitu klíčících rostlin *Picea abies* vzniklých při procesu somatické embryogeneze.

- Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti 0,05. Byly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi médii, tzn. Hypotéza č. 16 – potvrzena:

Na kvalitu a počet klíčnic rostlin *Picea abies* má signifikantní vliv kultivační médium ve stádiu germinace.

- Nulová hypotéza byla potvrzena na hladině významnosti 0,05. Nebyly potvrzeny signifikantní rozdíly mezi embryogenními liniemi, tzn. Hypotéza č. 17 – zamítnuta:

Embryogenní linie (resp. genetická dispozice embryogenní linie) nemá signifikantní vliv na počet a kvalitu klíčnic rostlin *Picea abies* vzniklých při SE.

- Na základě potvrzených hypotéz lze říci, že médium má signifikantní vliv na všechny fáze SE. Na základě statistických výsledků byla stanovena nejúspěšnější média pro jednotlivá stadia:

Iniciace – GD1, GD2, GD4

Proliferace – LP4, LP5, LP3

Maturace – LP7, LP8, GD5

Germinace – LP10, LP9, LP11

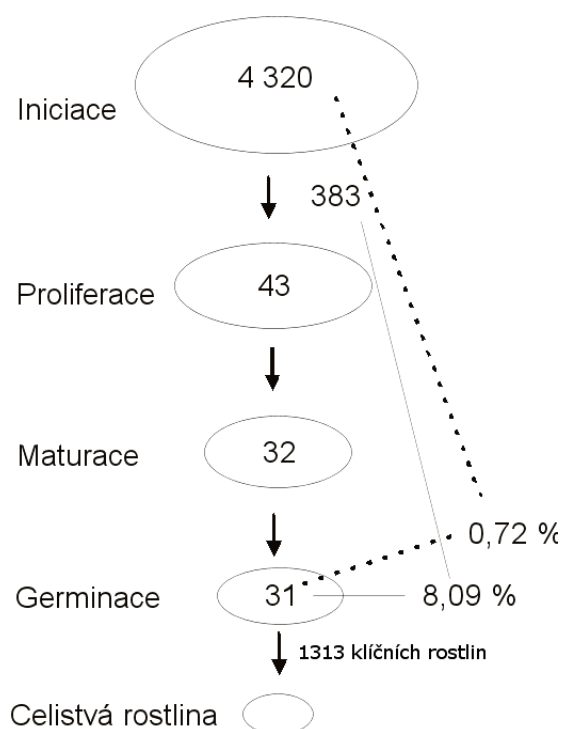
- U většiny fází bylo také prokázáno, že vliv genetické dispozice primárního explantátu má signifikantní vliv pro kultivaci *in vitro*, resp. na jednotlivé fáze SE. Možnost zisku embryogenního pletiva je závislá nejen na fyziologických vlastnostech a podmínkách kultivace, ale i především na genetických vlastnostech primárního explantátu (Stasolla a Yeung, 2003). Vzhledem k tomu, že na počátku experimentu bylo celkem 4320 primárních explantátů a na konci fáze germinace pouze 31 embryogenních linií (včetně linie AFO 541) lze říci, že pouze část primárních explantátů reaguje na kultivační podmínky, viz. obr. č. 3.
- Jako nejúspěšnější lokality, resp. embryogenní linie pro jednotlivá stadia byly vyhodnoceny:

Iniciace – 16.6., 12.5.

Proliferace – 25.6.1., 25.6.2., 16.6.1.-3., 7.5.9., 7.5.11, 7.5.7.

Maturace – 16.6.3., 25.6.2., 7.5.7., 25.6.10., 16.6.1.

Germinace – 16.6.2., 16.6.4., 7.5.7., 25.6.10., 7.5.3., 7.5.6., 12.5.1., 7.5.10.



Obrázek č. 2 – Schématický obrázek úspěšnosti jednotlivých fází SE;

Čárkovaná linie znázorňuje úspěšnost jednotlivých embryogenních linií od fáze iniciace po stádium germinace. Plná linie pak znázorňuje úspěšnost vzniklých embryogenních linií až do stádia germinace. 31 embryogenních linií bylo schopno vyprodukovat 1313 klíčících rostlin.

Pro komerční využití pak jsou vhodné jen jednotlivé předem ověřené embryogenní linie, protože celý proces SE je poměrně nákladný. Předem ověřené linie pak mohou sloužit jako modelový systém ke studiu vývojových charakteristik somatické embryogeneze nebo fyziologických zákonitostí.

- Na základě statistických výsledků lze konstatovat, že k mikropropagaci *Picea abies* jsou vhodné pouze některé embryogenní linie, resp. pouze některé genotypy. Ve výše zmíněných pokusech se osvědčily embryogenní linie z lokalit Brdská vrchovina, Českomoravská vrchovina a Orlické hory. V každé fázi SE pak jednotlivé embryogenní linie reagovaly rozdílně na kultivační podmínky. Podstatné ale je, že embryogenní linie musí projít všemi fázemi. Jako úspěšné pak lze vyhodnotit linie 16.6.2., 16.6.4., 7.5.7., 25.6.10., 7.5.3., 7.5.6., 12.5.1., 7.5.10. které, i ve fázi germinace, měly dobré výsledky. Tyto linie mají optimální adaptabilitu na kultivační podmínky, reagují na změny kultivačních podmínek a neztrácí ani po dlouhodobé kultivaci embryogenní schopnost.

9. Summary

Somatic embryogenesis of coniferous species was first reported more than 25 years ago. Since then, there has been an enormous research aimed at developing and optimizing protocols for efficient regeneration of plantlets. Biotechnology of somatic embryogenesis holds considerable promise for clonal propagation and breeding programs in forestry. Although routinely used both as means the propagation, as well as valuable model for investigating the structural, physiological, and molecular events occurring during embryo development, *in vitro* embryogenesis is still problematic for some coniferous species.

Manipulation of culture conditions gives information concerning the regulation of somatic embryogenesis process. Therefore hormonal and nutritional requirements of embryogenesis are now better know than were a few years ago. In addition of plant production via somatic embryogenesis has also been employed in basic research e.g., biochemical events, physiology, cryoprezervation cell and molecular biology.

Norway spruce became one of the most species under investigation among conifers. *Picea abies* have produced embryogenic tissue from immature and mature zygotic embryos and from young cotyledons at relatively high frequencies. During the initiation phase the explants (embryogenic suspensor mass) vary respect to the frequency of embryogenic tissue formation as well as the suitable source of primary explants. Maintenance phase of embryogenic cell lines requires a rigid schedule. It is necessary to keep the subculture at a 1 to 3 week regime; otherwise, there is a loss of embryogenic characteristics of the explants. Intervals ensure rapid growth and viability. Maturation phase of early somatic embryos has so far posed difficulty. Critical tissue culture factors are plant growth regulators, osmoticum of a medium, and a type of osmotic agent. The explants also vary with respect to the time required to reach maturity. Germination phase is dependent on the quality of the somatic embryos (their morphology, physiology, and anatomical structure). A high degree of abnormality has been observed in somatic embryos, including a lack of root or shoots meristems and fused cotyledons. Under these conditions, somatic embryos will not produce viable plants. In addition, even visibly normal somatic embryos do not always germinate, further reducing the final number of plants. There is needed to change the medium conditions. There are however, certain problems associated with this final stage. Germination frequencies vary among different cell lines. Hardening phase depends on his quality of root system developed by the plantlet as well as humidity control during

the first few days of growth in soil. It is critical to maintain high humidity conditions for the first week and then gradually decrease the humidity level to that normally found in a greenhouse environment. In comparison with the flowering plants, our understanding on the mechanisms regulating the embryogenic process in coniferous species is still very limited.

Somatic embryogenesis holds a considerable promise for gene transfer. Genetic transformation studies on gymnosperms have been carried out extensively during the 1990s. Most of the work has been done by using particle bombardment. Difficulties in tissue culture are one reason for unsuccessful regeneration of transformed cells or tissues.

Stable transformation and regeneration of plantlets have been published only for European larch (*Larix decidua*) by *Agrobacterium* - mediated transformation, white spruce (*Picea glauca*) by *Agrobacterium* - mediated transformation and black spruce (*Picea mariana*) by particle bombardment.

Genetic transformation of Norway spruce has been studied but the regeneration of transformed plantlets has not been achieved. Scientists favor a transformation method independent of *in vitro* regeneration techniques. More work is needed to achieve a basic understanding of the biochemical, molecular and structural events associated with embryogenesis to improve plant production via SE on a genetic transformation or commercial scale.

The present study has been carried out for that establishes an efficient method to produce somatic embryos tissue cultures of *Picea abies* in order to study the embryogenesis of this conifer. The aim of this study was to identify treatments with a negative influence on the subsequent stages. Data from experiment showed that almost whole process is dependent not only a species but also on the particular embryogenic cell line within the species. Results indicate as well, that the many of genotypes could glorify yield by an improved protocol of somatic embryogenic stages. Based on the results, the studying of somatic embryogenic process is still not finish for commercial scale.

10. Použité zkratky

ABA	kyselina abscisová
AC	aktivní uhlí (activated carbon)
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
AFO 541	označení linie embryogenní kultury smrku ztepilého, odvozená v institutu AFOCEL
AGP	arabinogalaktanové proteiny
BA	N ⁶ -benzyladenin
BAP	N ⁶ -benzylaminopurin
BEZ	označení nedesikované varianty pokusu
C107	označení linie embryogenní kultury smrku ztepilého, odvozená v AVČR
DCR	kultivační médium (Gupta a Durzan, 1985)
DES	označení desikované varianty pokusu
ESM	embryonálně suspenzorová hmota (již obsahuje zformovaná proembrya jehličnanů)
GD	kultivační médium (Gresshoff a Doy, 1972)
HRH treatment	high relative humidity, metoda částečného vysoušení embrya
IBA	kyselina indolylmásečná
IP6	myo-inositolhexakisfosfát
K	modifikované kultivační médium; Gorbatenko a Hakman (2001)
LCO	lipochitooligosacharidy
LEA proteiny	geny typické pro pozdní embryogenezi (late embryogenesis abundance)
LP	kultivační médium (von Arnold a Erikson, 1981)
LVS	lesní vegetační stupeň
MES	kyselina 2-N-morfolinoethansulfonová
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	kultivační médium (Murashige a Skoog, 1962)
MSG	kultivační médium (Becwar a kol., 1988)
NAA	kyselina α -naftyloctová
Nod faktory	LCO signály
N SIII	modifikované kultivační médium LP (Jain a kol., 1988)

PBC	polychlorované bifenyly
PCD	programová buněčná smrt
pCO₂	parciální tlak oxidu uhličitého
pO₂	parciální tlak kyslíku
PEG	polyethylenglykol
PEM	proembryonální hmota (proembryonal mass)
PGR	růstové regulátory
PLO	přírodní lesní oblast
Rab geny	geny (responsive to ABA)
RFO	oligosacharidy rafinózové řady
SAVO	chlornan sodný; 47,2 g.l ⁻¹ považováno za 100 % roztok
SCV	buněčná hustota suspenzních kultur (sedimented cell volume)
SE	somatická embryogeneze
SPS	sacharózafosfátsyntáza
SuSy	sacharózasyntáza
TAG	triacylglyceroly
VE	modifikované živné médium (Webster a kol., 1990)
WC	obsah vody v embryu (water content)
2,4-D	2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina
59	kultivační médium (von Arnold a Hakman, 1986)

11. Literatura

Anonymous. MZČR: Report on the State of the Forests and Forestry in the Czech Republic. Ministry of Agriculture of the Czech Republic, 140; 2000

Ammirato P. V.: Embryogenesis. In Handbook of plant cell culture, 1, Techniques for propagation and breeding, **Evans D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. and Yamada, Y.** (eds.) Macmillan, New York, 82-123; 1983

Attree S. M., Budimir S., Fowke L. C.: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). Can. J. Bot. **68**; 1990

Attree S. M., Fowke L. C.: Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **35**: 1-35; 1993

Attree S. M., Moore D., Sawhney V. K., Fowke L. C.: Enhanced maturation and desiccation tolerance of White spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: Effect of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. Annals of Botany **68**: 519-525; 1991

Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C.: Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. Planta **187**: 395-404; 1992

Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C.: Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moensch.] Voss) synthetic seeds in a bioreactor. Plant Cell Reports **13**: 601-606; 1994

Attree S. M., Pomeroy M. K., Fowke L. C.: Development of white spruce (*Picea glauca* [Moensch.] Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmotikum, and their tolerance to drying and frozen storage. Journal of Experimental Botany **46**: 433-439; 1995

Bachmann M., Matile P., Keller F.: Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Cold acclimation, translocation, and sink to source transition: discovery of a chain elongation enzyme. Plant Physiol. **105**: 1335-1345; 1994

Barrett J. D., Park Y. S., Bonga J. M.: The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* **16**: 411-415; 1997

Becwar M. R., Noland T. L., Wyckoff J. L.: Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In vitro Cellular and developmental biology* **25 (6)**: 575-580; 1989

Becwar M. R., Wann S. R., Johnson M. A., Verhagen S. A., Feirer R. P., Nagmani R.: Development and characterization of *in vitro* embryogenic systems in conifers. **Ahuja** (eds.), Kluwer Academic Publishers. In *Somatic Cell Genetics of Woody Plants*: 1-18; 1988

Bellarosa R., Mo L. H., von Arnold S.: The influence of auxin and cytokinin on proliferation and morphology of somatic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Ann. Bot.* **70**: 199-206; 1992

Bercetche J., Galerne M., Dereuddre J.: Efficient regeneration of plantlets from embryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. After freezing in liquid nitrogen. *Comp. Rend. Acad. Sci. Ser. III* **310**: 357-366; 1990

Bernal-Lugo L., Leopold A. C.: Seed stability during storage: raffinose content and seed glassy state. *Seed Sci. Res.* **5**: 75-80; 1995

Black M., Corbineau F., Gee H., Come D.: Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiol.* **120**: 463-471; 1999

Bomal P., Le V. Q., Tremblay F. M.: Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugar, and dehydrins. *Physiologia Plantarum.* **115**: 523-530; 2002

Bomal C., Tremblay F. M.: Effect of desiccation to low moisture content on germination, synchronization of root emergence, and plantlet regeneration of black spruce somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **56**: 193-200; 1999

Boulay M. P., Gupta P. K., Krogstrup P., Durzan D. J.: Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* Karst.). Plant Cell Reports 7: 134-137, 1988

Bozhkov P. V.: Genotypic and media factors affecting stabilization of polyembryogenic cultures in Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). Plant Cell Reports **14 (6)**: 389-392; 1995

Bozhkov P. V.: Regulation of programmed cell death in plant embryogenesis. BMC Plant Biol. **5 (1)**: S6. Published online doi: 10.1186/1471-2229-5-S1-S6; 2005

Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L.: Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **69**: 233-249; 2002a

Bozhkov P. V., Filonova L. H., Suarez M. F.: Programmed cell death in plant embryogenesis. Curr. Top. Dev. Biol. **67**: 135-179; 2005a

Bozhkov P. V., Filonova L. H., von Arnold S.: A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. Biotechnology and Bioengineering **77 (6)**: 658-667; 2002b

Bozhkov P. V., Lebedenko L. A., Shiryaeva G. A.: A pronounced synergistic effect of abscisic acid and 6-benzyladenine on Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst) somatic embryo maturation. Plant Cell Rep. **11**: 386-389; 1992

Bozhkov P. V., Suarez M. F., Filonova L. H., Daniel G., Zamyatnin A. A., Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B., Smertenko A.: Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102 (40)**: 14463-14468; 2005b

Bozhkov P. V., von Arnold S.: Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. Physiologia Plantarum **104**: 211-224; 1998

Brenac P., Horbowicz M., Downer S. M., Dickerman A. M., Smith M. E., Obendorf R. L.: Raffinose accumulation related to desiccation tolerance during maize (*Zea mays* L.) seed development and maturation. *J. Plant Physiol.* **150**: 481-488; 1997

Caffrey M., Fonseca V., Leopold A. C.: Lipid-sugar interactions. *Plant Physiol.* **86**: 754-758; 1988

Carrier D. J., Cunningham J. E., Taylor D. C., Dunstan D. I.: Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca* x *engelmannii* complex) somatic embryos. *Plant Cell Rep.* **16**: 550-554; 1997b

Clapham D., Elfstrand M., Sabala I., von Arnold S., Demel P., Koop H. U.: Gene Transfer by Particle Bombardment to Embryogenic Cultures of *Picea abies* and the Production of Transgenic Plantlets. *Scandinavian Journal of Forest Research* **15** (2): 151-160; 2000

ČSN 48 1211 – Lesní semenářství. Sběr, jakost a zkoušky jakosti semenného materiálu lesních dřevin

de Jong A. J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammeren A., de Vries S. C.: A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* **4**: 425-433; 1992

de Jong A. J., Heidstra R., Spaink H. P., Hartog M. V., Meijer E. A., Hendriks T., Lo Shiavo F., Terzi M., Bisseling T., van Kammen A., de Vries S. C.: *Rhizobium* lipopoligosacharides rescue a *Daucus carota* somatic embryo variant. *Plant Cell* **5**: 615-620; 1993

Downie B., Bewley J. D.: Soluble sugar content of white spruce (*Picea glauca*) seeds during and after germination. *Physiol. Plant.* **110**: 1-12; 2000

Dunstan D. I., Bekkaoui F., Pilon M., Fowke L. C., Abrams S. R.: Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant Sci.* **58**: 77-84; 1988

Dure L. III, Crouch M., Harada J., Ho T. H. D., Mundy J., Quatrano R. S. Thomas T., Sung Z. R.: Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **12**: 475–486; 1989

Dyachok J. V., Tobin A. E., Price N. P. J., von Arnold S.: Endogenous Nod-factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. *Plant Cell Rep.* **19**: 290-297; 2000

Dyachok J. V., Wiweger M., Kenne L., von Arnold S.: Endogenous Nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway Spruce. *Plant Physiology* **128**: 523-533; 2002

Egertsdotter U.: Regulation of somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*). *Agronomie* **16**: 603-608; 1996

Egertsdotter U., Mo L. H., von Arnold S.: Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* **88**: 315-321; 1993

Egertsdotter U., von Arnold S.: Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* **93**: 334-345; 1995

Egertsdotter U., von Arnold S.: Development of somatic embryos in Norway spruce. *Journal of Experimental Botany* **49 (319)**: 155-162; 1998

Ellis D. D., Barczynska H., McCown B. H., Nelson N.: A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **27**: 281 -287; 1991

El Meskaoui A., Tremblay F. M.: Effects of sealed and vented gaseous microenvironments on the maturation of somatic embryos of black spruce with a special emphasis on ethylene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **56**: 201-209; 1999

El Meskaoui A., Tremblay F. M.: Involvement of ethylene in the maturation of black spruce embryogenic cell lines with different maturation capacities. *Journal of Experimental Botany* **52 (357)**: 761-769; 2001

El-Nil A. M. M.: Embryogenesis of gymnosperm forest trees. U.S. Pat. No. 4,217,730; 1980

Feirer R. P., Conkey J. H., Verhagen S. A.: Triglycerides in embryogenic calli: a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Reports* **8**: 207-209; 1989

Filonova L. H., Bozhokov P. V., von Arnold S.: Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by the time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* **51 (343)**: 249-264; 2000

Find J. I.: Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, dessication and germination. *Plant Science* **128**: 75-83; 1997

Find J. I., Nørsgaard J. V., Krogstrup P.: Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *Journal of Plant Physiology* **152**: 510-517; 1998

Finer J. J., Kriebel H. B., Becwar M. R.: Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep.* **8**: 203-206; 1989

Finkelstein R. R., Lynch T. J.: Absciscic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiol.* **122**: 1179-1186; 2000

Flinn B. S., Roberts D. R., Newton C. H., Cyr D. R., Webster F. B., Taylor I. E. P.: Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum* **89**: 719-730; 1993

Flinn B. S., Roberts D. R., Taylor I. E. P.: Evaluation of somatic embryos of interior spruce. Characterization and developmental regulation of storage proteins. *Physiologia Plantarum* **82**: 624-632; 1991

Flygh G., Gronroos R., Hogberg K. A., von Arnold S.: Development and growth of plantlets of *Pinus contorta* regenerated from adventitious buds. *Scand. J. For. Res.* **13**: 331-339; 1998

Fourre J. L., Berger P., Niquet L., André P.: Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* **94** (2): 159-169; 1997

Fowke L., Attree S.: Conifer somatic embryogenesis: studies of embryo development and the cell biology of conifer cells and protoplasts. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* **2** (3): 124-130; 1996

Gleed J. A., Darling D., Muschamp B. A., Nairn B. J.: Commercial production of tissue-cultured *Pinus radiata*. *TAPPI J.* **78**: 147-150; 1995

Golovina E. A., Hoekstra F. A., van Aelst A. C.: Programmed cell death or desiccation tolerance: Two possible routes for wheat endosperm cells. *Seed Science Research* **10**: 365-379; 2000

Gorbatenko I., Hakman I.: Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regeneration into plantlets. *Int. J. Plant Sci.* **162**: 1211-1218; 2001

Gösslová M., Svobodová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhil D.: Comparing carbohydrate status during Norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **37**: 24-28; 2001

Guevin T. D., Kirby E. G.: Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **49** (3): 219-222; 1997

Guevin T. D., Micah V., Kirby E. G.: Somatic embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies balsamea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **37**: 205-208; 1994

Gupta P. K., Durzan D. J.: Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* **4**: 177-179; 1985

Gupta P. K., Durzan D. J.: Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio-Technology* **4**: 643-645; 1986

Gupta P. K., Durzan D. J., Finkle B. J.: Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus tadea* (loblloly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Can. J. Forest Res.* **17**: 1130-1134; 1987

Gupta P. K., Grob J. A.: Somatic embryogenesis in conifers. – In: **Jain S., Gupta P., Newton R. (eds.):** Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1**: 81-98; 1995

Gupta P. K., Pullman G. S., Timmis R., Kreitinger M., Carlson W. C., Grob J., Welty E.: Forestry in the 21st Century: The biotechnology of somatic embryogenesis. *Bio-Technology* **11**: 454-459; 1993

Gupta P. K., Timmis R., Mascharenhas A. F.: Field performance of micropropagated forestry species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27**: 159-164; 1991

Gutmann M., von Aderkas P., Label P., Lelu M.: Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany* **47 (305)**: 1905-1917; 1996

Goyal K., Walton L. J., Tunnacliffe A.: Lea proteins prevent prorein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* **388**: 151-157; 2005

Grigová M.: Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): studium dynamiky vybraných zásobních látek. Diplomová práce, PřFUK; 2003

Hakman I.: Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and seed development and somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* **87**: 148-159; 1993

Hakman I., Fowke L. C.: Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (White spruce) and *Picea mariana* (Black spruce). *Canadian Journal of Botany* **65**: 656-659; 1987

Hakman I., Fowke L. C., von Arnold S., Eriksson T.: The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* **38**: 53-59; 1985

Hakman I., Stabel P., Engström P., Eriksson T.: Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). *Physiologia Plantarum* **80**: 441-445; 1990

Hakman I., von Arnold S.: Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *Journal of Plant Physiology* **121**: 149-158; 1985

Hakman I., von Arnold S.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (White spruce). *Physiologia Plantarum* **72**: 579-587; 1988

Hari V.: Effect of cell density changes and conditioned media on carrot somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.* **96**: 227-231; 1980

Hjortswang H. I., Sundås-Larsson A., Bharathan G., Bozhkov P. V., von Arnold S., Vahala T.: *KNOTTED1*-like homeobox genes of a gymnosperm, Norway spruce, expressed during somatic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 837–843; 2002

Hoekstra F. A., Golovina E. A., Tetteroo F. A. A., Wolkers W. F.: Induction of Desiccation Tolerance in Plant Somatic Embryos: How Exclusive is the Protective Role of Sugars – *Cryobiology*, **43**: 140-150; 2001

Högberg K. A., Bozhkov P. V., Grönroos R., von Arnold S.: Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo of *Picea abies*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **16**: 295-304; 2001

Högberg K. A., Ekberg I., Norell L., von Arnold S.: Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding program: a case study with *Picea abies*. *Canadian Journal of Forest Research* **28**: 1536-1545; 1998

Hughes D. W., Galau G. A.: Developmental and environmental induction of *Lea* and *LaeA* mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *The Plant Cell*, **3**: 605-618; 1991

Chalupa V.: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.). Karst. Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae **14**: 57-63, 1985a

Chalupa V.: *In vitro* propagation of *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Quercus*, *Fagus* and other species using adenine - type cytokinins and thidiazuron. Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae **14**: 65-88; 1985b

Chalupa V.: Plant regeneration by somatic embryogenesis in norway spruce (*Picea abies* /L./Karst.) and sessile oak (*Quercus petraea* /Matt./ Liebl.) **16**: 135-143; 1989

Chalupa V.: Současný stav a perspektivy množení lesních stromů metodami *in vitro*. Sb. Perspektivy použití vegetativně množeného materiálu v podmínkách lesního hospodářství – Brno 11.12.1996. 13-18; 1996

Chalupa V.: Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Norway Spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). Acta Universitatis Carolinae Biologica **41**: 13-22; 1997

Chalupa V.: Růst lesních stromů vypěstovaných *in vitro* z orgánových kultur a ze somatických embryí. Lesnická práce **11 (79)**: 498-501; 2000

Cheliak W. M., Klimaszweska K.: Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinate d families of black spruce. Theor. Appl. Genet. **82**: 185–190; 1991

Iraqi D., Le V. Q., Lamhamedi M. S., Tremblay F. N.: Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. Journal of Plant Physiology **162**: 115-124; 2005

Iraqi D., Tremblay R.: The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo. Physiologia Plantarum **111**: 381 – 388; 2001a

Iraqi D., Tremblay F. M.: Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. Journal of Experimental Botany **52**: 2301-2311; 2001b

Irvine R.F.: Inositide evolution - towards turtle domination. *J. Physiol.* **566**: 295- 300; 2005

Jain S. M., Gupta P. K., Newton R. J.: Somatic embryogenesis in woody plants. Gymnosperms. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers **3**; 1995

Jain S. M., Newton R. J., Soltes E. J.: Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.). *Theor. Appl. Genet.* **76**: 501-506; 1988

Jalonon P., von Arnold S.: Characterization of embryonic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. *Plant Cell Reports* **10**: 384-387; 1991

Johnson R. W., Asokanthan P. S., Griffith M.: Water and sucrose regulate canola embryo development. *Physiol. Plant.* **101**: 361-366; 1997

Jokinen K. J., Durzan D. J., Properties of rescued embryonal suspensor masses of norway spruce determined by the environment *in vitro*. *Silva Fennica* **28 (2)**: 95-106; 1994

Joy R. W., Yeung E. C., Kong L., Thorpe T. A.: Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* **27**: 32-41; 1991

Kermode A. R.: Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**: 155-194; 1990

Khelifi S., Tremblay F. M.: Maturation of black spruce somatic embryos. Part I. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **41**: 23-32; 1995

Kong L.: Factors affecting white spruce somatic embryogenesis and embryo conversion. Ph.D. Dissertation, University of Calgary, Calgary; 1994. Citováno podle **Stasolla C., Yeung E. C.:** Recent advances in onifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**: 15-35; 2003

Kong L., Attree S. M., Fowke L. C.: Changes of endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. *Physiol. Plant.* **101**: 23-30; 1997

Kong L., Attree S. M., Fowke L. C.: Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis (guanyldrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*). *Plant Science* **133**: 211-220; 1998

Kong L., Attree S. M., Evans D. E., Binarova P., Yeung E. C., Fowke L. C.: Somatic embryogenesis in white spruce: studies of embryo development and cell biology. V: **Jain S., Gupta P., Newton R.** (eds.): *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. **4**: 1-28; 1999

Kong L., Yeung E. C.: Effects of silver nitrate and polyethylene glycol on white spruce (*Picea glauca*) somatic embryo development: enhancing cotyledonary embryo formation and endogenous ABA content. *Physiol. Plant.* **93**: 298-304; 1995

Konrádová H., Grigová M., Lipavská H.: Cold-induce accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*). In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **39**: 425-427; 2003

Konrádová H., Lipavská H., Albrechtová J., Vreugdenhyl D.: Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogenesis in Norway spruce: content of soluble saccharides and localization of key enzymes activities. *Journal of Plant Physiology* **159**: 387-396; 2002

Koster K. L., Leopold A. C.: Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiology* **88**: 829-832; 1988

Krogstrup P.: Embryo-like structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Can. J. For. Res.* **16**: 664-668; 1986

Krogstrup P., Eriksen E. N., Møller J. D., Roulund H.: Somatic embryogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Plant Cell Reports* **7**: 594-597; 1988

Kubeš M.: Vliv aplikace exogenních sacharidů na proces somatické embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) (Diplomová práce). PřF UK, Praha. 2004

Kumštýřová L., Vágner M., Lipavská H., Gösslová M.: Somatic embryogenesis of Norway spruce: anatomical characterization and content of non-structural saccharides. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 43 (Suppl.); 2000

Kvaalen H.: Ethylene synthesis and growth in embryogenic tissue of Norway spruce: Effect of oxygen, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, benzyladenine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Physiol. Plant.* **92**: 109-117; 1994

Kvaalen H., Christiansen E., Johnsen Ø., Solheim H.: Is there a negative genetic correlation between initiation of embryogenic tissue and fungus susceptibility in Norway spruce? *Canadian Journal of Forest Research* **31**: 824-831; 2001

Kvaalen H., von Arnold S.: Effects of various partial pressures of oxygen and carbon dioxide on different stages of somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **27**: 49-57; 1991

Lelu M. A., Bastien C., Drugeault A., Gouez M., Klimaszewska K.: Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum* **105**: 719-728; 1999

Lelu M. A., Boulav M. P., Bornman C. H.: Somatic embryogenesis in cotyledons of *Picea abies* is enhanced by an adventitious bud – inducing treatment. *New Forest* **4** (2): 125-135; 1990

Lelu M. A., Klimaszewska K. K., Jones C., Ward C., von Anderkas P., Charest P. J.: A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch. Information Report PI-X-111, Petawawa national forestry institute forestry Canada; 1993

Lipavská H., Konrádová H.: Invited review: Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **40**: 23-30; 2004

Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J.: Annual dynamics of the content of non-structural saccharides in the context of structural development of vegetative buds of Norway spruce. *Journal of Plant Physiology* **157**: 365-373; 2000a

Lipavská H., Svobodová H., Albrechtová J., Kumstýřová L., Vágner M., Vondráková Z.: Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **36**: 260-267; 2000b

Lipavská H., Vreugdenhil D.: Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **45**: 103-107, 1996

Lu C. Y., Thorpe T. A.: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca*. *J. Plant Physiol.* **128**: 297-302; 1987

Lulsdorf M. M., Tautorus T. E., Kikcio S. I., Bethune T. D., Dunstan D. I.: Germination of encapsulated embryos of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Cell Reports* **12**: 385-389; 1993

Lulsdorf M. M., Tautorus T. E., Kikcio S. I., Dunstan D. I.: Growth parameters of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca-engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Science* **82**: 227-234; 1992

Malá J., Šíma P., Možnosti využití biotechnologických metod v lesním hospodářství. *Lesnická práce* **79**: 495-497; 2000

Majewska-Sawka A., Nothagel E. A.: The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.* **123**: 3-9; 2000

Maruyama E., Ishii K., Hosoi Y.: Efficient Plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. *Journal of Forest Research* **10**: 73-77; 2005

McKersie B. D.: Desiccation stress – Dostupné na WWW:
<www.Cropsoil.psu.edu/Courses/Agro518/Desiccat.htm>, 1996

Michler Ch. H.: Biotechnology of woody environmental crops. *Hortscience* **26 (8)**: 1042-1044; 1991

Misra S.: Conifer zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis, and seed germination. *Biochemical and molecular advances. Seed Sci. Res.* **4**: 357-384; 1994

Misra S., Attree S. M., Leal I., Fowke L. C.: Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on the synthesis of storage proteins during the development of white spruce. *Ann. Bot.* **71**: 11-22; 1993

Mo L. H.: Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). Dissertation. Dept Genetics, Uppsala Genetic Center, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden; 1993

Mo L. H., von Arnold S.: Origin and development of embryonic cultures from seedlings of Norway spruce (*Picea abies*). Journal of Plant Physiology **138**: 223-230; 1991

Mo L. H., von Arnold, Lagercrantz U.: Morphogenic and genetic stability in long term embryogenesis cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). Plant Cell reports **8** (7): 375-378; 1989

Mullin T. J., Park Y. S.: Estimating genetic gains from alternative breeding strategies for clonal forestry. Canadian Journal of Forest Research **22**: 14-23; 1992

Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum **15**: 473-497; 1962

Muzquiz M., Burbano C., Mercedes M. P., Folkman W., Gulewicz K.: Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides preparative method for their isolation and purification. Industrial Crops and Products **19**: 183-188; 1998

Nagmani R., Bonga J. M.: Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. – Can. J. For. Res. **15**: 1088- 1091; 1985

Nørgaard J. V.: Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. Plant Sci. **124**: 211-221; 1997

Nørgaard J. V., Baldursson S., Krogstrup P.: Genotypic differences in the ability of embryogenic *Abies nordmanniana* cultures to survive cryopreservation. Silvae Genetica **42**: 93-97; 1993a

Nørgaard J. V., Durzan V., Johsen O., Krogstrup P., Baldursson S., von Arnold S.: Variation in cryotolerance in *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological and physical factors. Can. J. Forest Res. **23**: 2560-2567; 1993b

Nørgaard J. V., Krogstrup P.: Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* Lk. Plant Cell Rep. **9**: 509-513; 1991

Nørgaard J. V., Krogstrup P.: Somatic embryogenesis in *Abies* spp. – In: **Jain S, Gupta P., Newton R.** (eds.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **3**: 341-355; 1995

Obendorf R. L.: Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. Seed Sci. Res. **7**: 63-74; 1997

Paek K. Y., Hahn E. J., Son S. H.: Application of bioreactors for large-scale micropropagation system of plants. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant **37**: 149-157; 2001

Pâques M., Berceteche J., Dumas E.: Liquid media to improve and reduce the cost of *in vitro* conifer propagation. Acta Hort. **319**: 95-100; 1992

Pâques M., Berceteche J., Palada M.: Prospects and limits of somatic embryogenesis of *Picea abies*. – In: **Jain S., Gupta P., Newton R.** (eds.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1**: 399-414; 1995

Park Y. S., Boga J. M.: Conifer micropropagation: its function in tree improvements programs. In Micropropagation of woody plants, **Ahuja M. R.** (eds.): Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 457-470; 1992

Park Y. S., Pond S. E., Boga J. M.: Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*). Genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. Theor. Appl. Genet. **86**: 427-436; 1993

Passerieux E., Baud S., Dulieu H., Pagues M.: RAPD variation in Norway spruce seedlot: Consequences of somatic embryogenesis. J. f. Heredity **90** (6): 662-667; 1999

Pien S., Wyrzykowska J., Fleming A.J.: Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. Plant J. **25**: 663-674; 2001

Pilate G., Guiney E., Holt K., Petit-Conil M., Lapierre C., Leplé J. C., Pollet B., Mila I., Webster E. A., Marstorp H. G., Hopkins D. W., Jouanin L., Boerjan W., Schuch W., Cornu D., Halpin C.: Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. Nat. Biotech. **20**: 607-612; 2002

Pond S. E., von Aderkas P., Bonga J. M.: Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant **38**: 334-341; 2002

Pullman G. S., Gupta P. K.: Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using absorbent materials in the development stage media. U. S. Patent No. 5,034,326; 1991

Pullman G. S., Gupta P. K., Timmis R., Carpenter C., Kreitinger M., Welty E.: Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. Plant Cell Reports **24**: 271-279; 2005

Pullman G. S., Johnson S.: Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus tadea* L.): improving culture initiation rates. Ann. For. Sci. **59**: 663-668; 2002

Raboy V.: Myo-Inositol-1,2,3,4,5-hexakisphosphate. Phytochemistry **64**: 1033-1043; 2003

Ramarosandratana A. V., Staden J. V.: Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). Plant Cell Tissue and Organ Culture **74**: 249-255; 2003

Rauscherová L.: Množení smrku (*Picea abies*/L./Karst.) *in vitro*. Biotechnologie v lesním hospodářství **152**: 35-41; 1990

Reid D. A., Lott J. N. A., Attree S. M., Fowke L. C.: Mineral nutrition in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seeds and somatic embryos. I. phosphorus, phytic acid, potassium, magnesium, calcium, iron and zinc. Plant Science **141**: 11-18; 1999a

Reid D. A., Lott J. N. A., Attree S. M., Fowke L. C.: Mineral nutrition in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seeds and somatic embryos; II. EDX analysis of globoids and Fe-rich particles. Plant Science **141**: 19-27; 1999b

Reinert J.: Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carroten. Naturwissen **45**: 344-345; 1958

Roberts D. R.: Absciscic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum* **83**: 247-254; 1991

Roberts D. R., Flinn B. S., Webb D. T., Webster F. B., Sutton C. S.: Characterization of immature embryos of interior spruce by SDS-PAGE and microscopy in relation to their competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* **8**: 285-288; 1989

Roberts D. R., Flinn B. S., Webb D. T., Webster F. B., Sutton B. C. S.: Absciscic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiologia plantarum* **78**: 355-360; 1990a

Roberts D. R., Lazaroff W. R., Webster F. B.: Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of sitka spruce somatic embryos. *J. Plant Physiol.* **138**: 1-6; 1991

Roberts D. R., Sutton C. S., Flinn B. S.: Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.* **68**: 1086-1090; 1990b

Rolland F., Moore B., Sheen J.: Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* **14**: 185-205; 2002

Ruud J. N.: Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7-56 day old *Picea abies*. *Plant Science* **92**: 213-220; 1993

Ruud J. N., Bercetche J., Pâques M.: First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Rep.* **11**: 563-566; 1992

Sabala I.: Regulation of somatic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): a molecular approach to the characterization of specific developmental stages. *Acta Univ. Agriculturae Sueciae Silviculturae*: 69-145; 1998

Salajová T., Salaj J., Kormuťák A.: Initiation of embryogenic tissue and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra*. *Arn. Plant Science* **145**: 33-40; 2004

Santanen A.: Polamine metabolism during development of somatic and zygotic embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Academic dissertation, University of Helsinki; 2000

Schuller A., Kirchner-Neß R., Reuther G.: Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**: 23-31; 2000

Schuller A., Reuther G.: Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. *Plant Cell Report* **12**: 199-202; 1993

Skriver K., Mundy J.: Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **2**: 503-512; 1990

Smertenko A. P., Bozhkov P. V., Filonova L. H., von Arnold S., Hussey P. J.: Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos. *Plant J.* **33** (5): 813-24; 2003

Spaink H. P., Sheeley D. M., van Brussel A. A. N., Glushka J., York W. S., Tak T., Geiger O., Kennedy E. P., Reinhold V. N., Lugtenberg B. J. J.: A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**: 125-130; 1991

Stasolla C., Kong L., Yeung E. C., Thorpe T. A.: Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. In *Vitro Plant, Cellular and Developmental Biology - Plant* **38**: 93-105; 2002

Stasolla C., Yeung E. C.: Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**: 15-35; 2003

Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W., Sederoff R. R.: The effects of Polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* **131**: 49-60; 2003

Steward F. C., Mapes M. O., Mears K.: Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* **45**: 705-708; 1958

Stone S. L., Gifford D. J.: Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth. II. Storage triacylglycerols and carbohydrates. *Int. J. Plant Sci.* **160**: 663-671; 1999

Strunecká A.: Co víme a nevíme o kyselině fytové – nejrozšířenějším inositolfosfátu na Zemi. Čs. fyziol. **55**: 45-46; 2006

Sun W. Q., Irving T. C., Leopold A. C.: The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. *Physiologia Plantarum* **90**: 621-628; 1994

Suss R., Ewald D., Matchke J.: Production of somatic embryos from Norway spruce (*Picea abies*/L./ Karst.) seed. *Beitrage fur die Forstwirtschaft* **24 (3)**: 126-130; 1990

Svobodová H., Albrechtová J., Kumštýřová L., Lipavská H., Vágner M., Vondráková Z.: Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 209-221; 1999

Swedlund B., Locy R. D.: Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiol.* **103**: 1339-1346; 1993

Taber P., Zhang C., Wei-Shou Hu: Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany* **76 (5)**: 863-871; 1998

Tautorus T. E., Attree S. M., Fowke L. C., Dunstan D. I.: Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and embryo regeneration from protoplasts in black spruce (*Picea mariana* Mill.). *Plant Science* **67**: 115-124; 1990

Tautorus T. E., Fowke L. C., Dunstan D. I.: Somatic embryogenesis in conifers. – *Canadian Journal of Botany* **69**: 1873-1899; 1991

Thompson M. R., Thorpe T. A.: Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates. V: **Bonga J. M., Durzan D. J.** (eds.): *Cell and Tissue Culture in Forestry*, 1, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 89-112; 1987

Tremblay F. M.: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from stored seeds of *Picea glauca*. *Can. J. Bot.* **68**: 236-242; 1990

Tremblay L., Tremblay F. M.: Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S. P.) and red spruce (*Picea rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **27**: 95-103; 1991

Tremblay L., Tremblay F. M. : Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **42**: 39-46; 1995

Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Prome J. C., Denaire J.: Sulfated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium melioli* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673; 1991

Ulrychová A.: Somatická embryogeneze smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.): optimalizace podmínek zrání (Diplomová práce). PřF UK, Praha; 2004

United States Patent 5491090: Embryogenic coniferous liquid suspension cultures. Issued on February 13; 1996

Úradníček L., Maděra P., Kolibáčová S., Koblížek J., Šefl J.: Dřeviny České republiky. 254; 2001

Van Winkle S. C., Pullman G. S.: Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. *Plant Cell Rep.* **24**: 201-208; 2005

Vágner M., Fischerová L., Špačková J., Vondráková Z.: Somatic embryogenesis in Norway spruce. **S. M. Jain, P. K. Gupta** (eds.) *Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*: 14-155; 2005a

Vágner M., Vondráková Z., Fischerová L., Opatrná J.: Norway spruce somatic embryogenesis: membrane rafts as a compromise between liquid and solidified media. *Liquid culture system for in vitro Plant Propagation*: 295-302; 2005b

Vágner M., Vondráková Z., Strnadová Z., Eder. J., Macháčková I.: Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies*. *Adv. Hort. Sci.* **12**: 11-18; 1998

Vágner M., Vondráková Z., Špačková J., Kumstýřová L., Opatrná J.: Somatická embryogeneze u smrku ztepilého: kultivace na pevných a tekutých médiích. *Konference*

ČZU: Reprodukce genových zdrojů lesních stromů metodami *in vitro*. 11.12.2001, Praha. 25-27; 2001

von Arnold S.: Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. J. Plant. Physiol. **128**: 233-244; 1987

von Arnold, Bozhkov P., Clapham D., Dyachok J., Filonova L., Högborg K. A., Ingouff M., Wiweger M.: Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **81** (3): 323-329; 2005

von Arnold S., Egertsdotter U., Ekberg I., Gupta P., Mo H., Nørgaard J.: Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). V: **Jain S., Gupta P., Newton R.** (eds.): Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Kluwer Academic Publishers **3**: 17-36; 1995

von Arnold S., Ericsson T.: *In vitro* studie sof adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot. **59**: 870-874; 1981

von Arnold S., Hakman I.: Effect of sucrose on initiation of embryogenic callus cultures from mature zygotic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. (Norway spruce). J. Plant Physiol. **122**: 261-265; 1986

von Arnold S., Hakman I.: Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). Journal of Plant Physiology **132**: 164-169; 1988

von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L.: Developmental pathway of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **69**: 233-249; 2002

Vooková B., Gajdošová A., Matúšová R.: Somatic embryogenesis in *Abies alba* x *Abies alba* and *Abies alba* x *Abies nordmanniana* hybrids. Biologia Plantarum **40**: 523-530; 1998

Watad A. A., Kochba M., Nissim A., Gaba V.: Improvement of *Aconitum napelus* micropropagation by liquid culture on floating membrane rafts. Plant Cell Rep. **14**: 345-348; 1995

Webster F. B., Roberts D. R., McInnis S. M., Sutton B. C. S.: Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. Can. J. For. Res. **20**: 1759-1765; 1990

Williams R. J., Leopold A. C.: The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology*, **89**: 977-981; 1989

Wiweger M.: Signal molecules in embryogenesis of Norway spruce. Doctoral diss. Dept. of Plant Biology and Forest Genetics, SLU. *Acta Universitatis agriculturae Suecica. Silvestria*: **293**; 2003

12. Přílohy

Obsah:

Tabulka č. I1 - Souhrnné statistiky embryogenity vzorků podle médií.....	142
Graf č. I1 – Půměrná embryogenita, rozdělení podle médií a lokalit.....	142
Graf č. I2 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií.....	143
Tabulka č. I2 – Analýza rozptylu embryogenity vzorků podle médií	143
Graf č. I3 – Střední hodnota a konfidenční intervaly embryogenity vzorků podle médií	143
Tabulka č. I3 - Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií	144
Tabulka č. I4 - Levenův Test homogenosti rozptylů embryogenity vzorků podle médií.....	144
Tabulka č. I5 - Souhrnné statistiky embryogenity vzorků podle lokalit.....	145
Graf č. I4 – Půměrná embryogenita vzorků podle lokalit a médií.....	145
Graf č. I5 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle lokalit.....	146
Tabulka č. I6 – Analýza rozptylu embryogenity vzorků podle lokalit	146
Graf č. I6 – Střední hodnota a konfidenční intervaly embryogenity vzorků podle lokalit.....	146
Tabulka č. I7 - Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle lokalit	147
Tabulka č. I8 - Levenův Test homogenosti rozptylů embryogenity vzorků podle lokalit.....	147
Tabulka č. P1 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle médií (4. týden).....	148
Graf č. P1 – Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %.....	148
Tabulka č. P2 - Poměr nárůstu ESM 4. týden vzhledem k 0. týdnu	149
Graf č. P2 – Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM podle médií.....	150
Tabulka č. P3 - Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %.....	150
Tabulka č. P4 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle linií.....	151
Tabulka č. P5 - Levenův Test homogenosti rozptylů nárůstu ESM podle médií	151
Tabulka č. P6 – Kruskal-Wallisův test významnosti médií; Test statistic = 868,225; P-Value = 0,0151	
Tabulka č. P7 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu medianů pro jednotlivá média; Test statistic = 658,73; P-Value = 0,0; Total n = 1715; Grand median = 1,76923.....	152
Graf č. P3 - Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM podle linií.....	152
Tabulka č. P8 - Přehled homogenních skupin embryogenních linií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %.....	153
Tabulka č. P9 - Levenův Test homogenosti rozptylů nárůstu ESM embryogenních linií.....	153
Tabulka č. P10 – Kruskal-Wallisův test významnosti jednotlivých linií; Test statistic = 734,372; P-Value = 0,0.....	154
Tabulka č. P12 – Kontingenční tabulka výsledků pro 4. týden, průměrné hodnoty nárůstu ESM	156

Tabulka č. P13 – Proliferace 4. týden, poměr nárůstu ESM podle lokalit	156
Tabulka č. P15 - Poměr nárůstu ESM 8. týden vzhledem k 0. týdnu	157
Tabulka č. P14 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle médií (8. týden).....	158
Graf č. P4 – Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %.....	158
Graf č. P5 – Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM ve fázi proliferace podle médií	158
Tabulka č. P16 - Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %.....	159
Tabulka č. P17 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle linií.....	159
Tabulka č. P18 - Levenův Test homogenosti rozptylů nárůstu ESM podle médií	160
Tabulka č. P19 – Kruskal-Wallisův test významnosti médií; Test statistic = 959,27 P-Value = 0,0.....	160
Tabulka č. P20 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílů medianů pro jednotlivá média; Test statistic = 615,772; P-Value = 0,0; Total n.....	160
Graf č. P6 – Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM podle linií	160
Tabulka č. P21 - Přehled homogenních skupin embryogenních linií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %.....	161
Tabulka č. P22 - Levenův Test homogenosti rozptylů nárůstu ESM embryogenních linií.....	161
Tabulka č. P23 – Kruskal-Wallisův test významnosti jednotlivých linií; Test statistic = 769,021; P-Value = 0,0.....	162
Tabulka č. P24 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílů medianů pro jednotlivé linie; Test statistic = 628,164; P-Value = 0,0	163
Tabulka č. P25 - Kontingenční tabulka výsledků pro 8. týden, průměrné hodnoty nárůstu ESM.....	164
Tabulka č. P26 – Proliferace 8. týden, poměr nárůstu ESM podle lokalit	165
Tabulka č. M1 – Souhrnné statistiky výsledků maturace podle médií	166
Graf č. M1 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle média	166
Graf č. M2 – Střední hodnota a konfidenční intervaly počtu embryí/cm ² pro jednotlivá média..	167
Tabulka č. M2 – Kruskal-Wallisův test významnosti médií; Test statistic = 58,8913; P-Value = 1,01408E ⁻¹²	167
Tabulka č. M3 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílů medianů pro jednotlivá média; Total n = 89, Grand median = 6,0; Test statistic = 56,4355; P-Value = 3,39151E ⁻¹²	167
Tabulka č. M4 - Souhrnné statistiky maturace podle jednotlivých linií.....	168
Tabulka č. M5 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle linií.....	169
Graf č.M3 – Střední hodnota a konfidenční intervaly počtu embryí/cm ² pro jednotlivé linie.....	169
Tabulka č. M6 – Kruskal-Wallisův test významnost embryogenních linií; Test statistic = 633,645, P-Value = 0,0.....	170
Tabulka č. M7 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílů medianů pro jednotlivé linie; Total n = 891; Grand median = 6,0; Test statistic = 557,119; P-Value = 0,0.....	171
Graf č. G1 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle druhu ošetření (DES a BEZ).....	172

Tabulka č. G1 – Souhrnné statistiky germinace podle druhu ošetření	172
Graf č. G2 – Střední hodnota a konfidenční intervaly tvorby klíčních rostlin podle ošetření	172
Tabulka č. G2 – Tabulka analýzy rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle druhu ošetření	173
Tabulka č. G3 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukey HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95,0 % podle druhu ošetření	173
Tabulka č. G4 – Levenův Test homogenosti rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle druhu ošetření	173
Graf č. G3 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií	174
Tabulka č. G5 – Souhrnné statistiky výsledků germinace podle médií	174
Graf č. G4 – Střední hodnota a konfidenční intervaly tvorby klíčních rostlin podle médií	174
Tabulka č. G6 – Tabulka analýzy rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle médií	175
Tabulka č. G7 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií	175
Tabulka č. G8 – Levenův Test homogenosti rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle médií	175
Graf č. G5 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle linií	176
Tabulka č. G10 – Souhrnné statistiky tvorby klíčních rostlin pro jednotlivé linie	177
Graf č. G6 – Střední hodnota a konfidenční intervaly tvorby klíčních rostlin podle linií	177
Tabulka č. G11 – Tabulka analýzy rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle linií	178
Tabulka č. G11 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle linií	178
Tabulka č. G12 – Levenův Test homogenosti rozptylů tvorby klíčních rostlin podle linií	178
Tabulka č. G13 – Kruskal-Wallisův test významnosti jednotlivých linií; Test statistic = 17,1171 P-Value = 0,971143	179
Tabulka č. G14 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu mediánů pro jednotlivé linie; Test statistic = 12,6111 P-Value = 0,997765	180
Obrázek č. O1 - Izolace embrya ze semene (Flow-box)	181
Obrázek č. O2 – Iniclace; preparace embrya - primární explantát	181
Obrázek č. O3 - Stojan s kulturami v kultivační místnosti	182
Obrázek č. O4 – Iniclace ESM; primární explantát po 3 týdnech kultivace na GD1 médiu (Detail - pletivo vznikající ze zóny 2 je ESM)	182
Obrázek č. O5 – Proliferace; Embryogenní linie 12.5.1.	183
Obrázek č. O6 – Proliferace; Embryogenní linie 12.5.1.	183
Obrázek č. O7 - Proliferace ESM; linie 7.5.1. na LP1 médiu – týden 0 (velikost 10 mm ²)	184
Obrázek č. O8 - Proliferace ESM; linie 7.5.1. na LP1 médiu - kultivace po 8 týdnech (velikost 168 mm ²)	184
Obrázek č. O9 – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 2 týdnech na médiu LP7	185
Obrázek č. O10 – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 3 týdnech na médiu LP7	185
Obrázek č. O11 – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 4 týdnech na médiu LP7	185
Obrázek č. O12a - Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 6 týdnech na médiu LP7	186

Obrázek č. O12b – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 6 týdnech na médiu LP7	186
Obrázek č. O13a -Desikace; linie 16.6.3. embrya jsou připravena k desikaci umístěná na Petriho miskách; Embrya mají zřetelně vyvinutý kořenový meristém a dělohy.....	187
Obrázek č. O13b – Desikace; linie 16.6.3. formující se klíčící rostliny.....	187
Obrázek č. O14 – Desikace; linie 16.6.3. formující se klíčící rostliny.....	188
Obrázek č. O14 – Desikace; linie 16.6.3. formující se klíčící rostliny.....	188
Obrázek č. O15 – Germinace; linie 16.6.3. kultivace na médiu LP10	189
Obrázek č. O16 – Germinace; linie 12.5.10. formující se klíčící rostliny na médiu ½ GD6	189
Obrázek č. O17 – Germinace; linie 12.5.10. formující se klíčící rostliny na médiu ½ GD6	189
Obrázek č. O18 – Germinace; linie 12.5.10 na médiu LP10.....	190
Obrázek č. O18 - Germinace; linie 12.5.10 na médiu ½ GD6	190
Obrázek č. O18 – Germinace; linie 16.6.1. abnormálně se vyvíjející embrya	191
Obrázek č. O19 - Germinace; linie 12.5.10 na médiu LP10.....	191
Obrázek č. O19 – Konverze; dobře formovaná klíčící rostlina připravená na kultivaci <i>ex vitro</i>	191

12.1. Iniacie

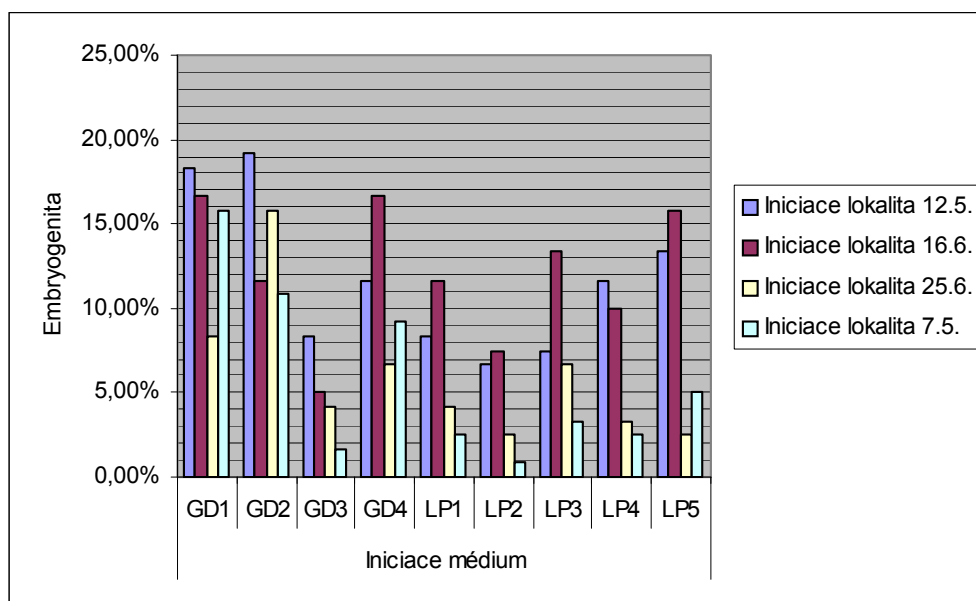
12.1.1. Média

Počet pozorování: 108

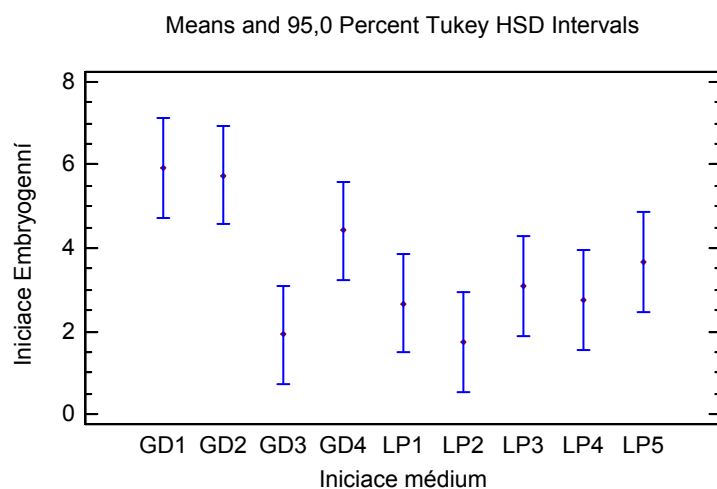
Počet úrovní: 9

Médium	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
GD1	12	5,91667	2,06522	34,9052 %	3,0	9,0	6,0
GD2	12	5,75	1,54479	26,8658 %	4,0	8,0	4,0
GD3	12	1,91667	1,37895	71,9454 %	0,0	5,0	5,0
GD4	12	4,41667	1,83196	41,4782 %	2,0	8,0	6,0
LP1	12	2,66667	1,72328	64,623 %	1,0	6,0	5,0
LP2	12	1,75	1,3568	77,5315 %	0,0	4,0	4,0
LP3	12	3,08333	1,88092	61,003 %	0,0	6,0	6,0
LP4	12	2,75	1,86474	67,8089 %	0,0	5,0	5,0
LP5	12	3,66667	2,53461	69,1257 %	0,0	8,0	8,0
Total	108	3,5463	2,28111	64,3236 %	0,0	9,0	9,0

Tabulka č. I1 - Souhrnné statistiky embryogenity vzorků podle médií



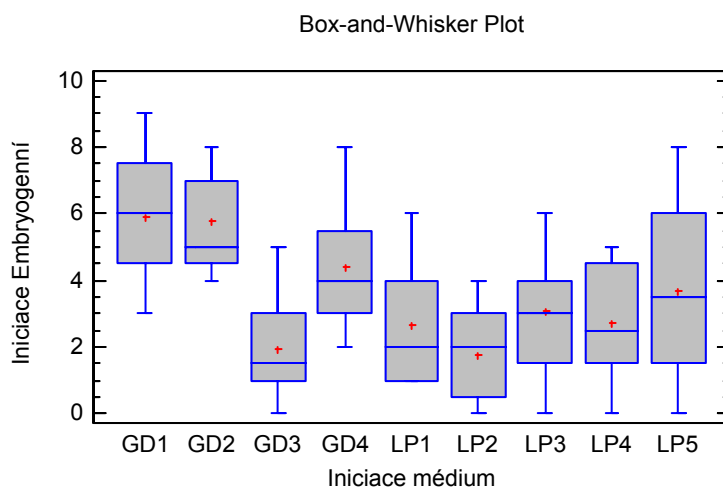
Graf č. I1 – Půměrná embryogenita, rozdělení podle médií a lokalit



Graf č. I2 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	225,019	8	28,1273	8,39	0,0000
Within groups	331,75	99	3,35101		
Total (Corr.)	556,769	107			

Tabulka č. I2 – Analýza rozptylu embryogenity vzorků podle médií



Graf č. I3 – Střední hodnota a konfidenční intervaly embryogenity vzorků podle médií

Médium	Count	Mean	Homogeneous Groups
LP2	12	1,75	X
GD3	12	1,91667	X
LP1	12	2,66667	XX
LP4	12	2,75	XX
LP3	12	3,08333	XXX
LP5	12	3,66667	XX
GD4	12	4,41667	XX
GD2	12	5,75	XX
GD1	12	5,91667	X

Tabulka č. I3 - Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií

	Test	P-Value
Levene's	1,10587	0,365882

Tabulka č. I4 - Levenův Test homogenosti rozptylů embryogenity vzorků podle médií

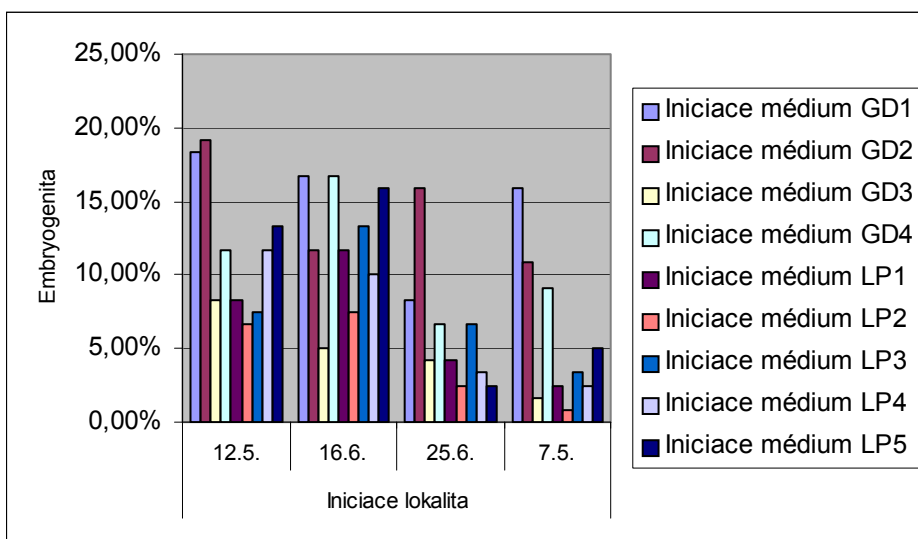
12.1.2. Lokalita

Počet pozorování: 108

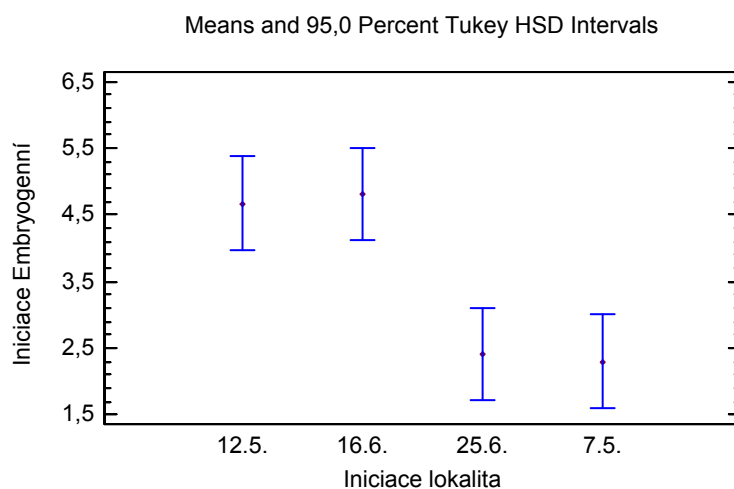
Počet úrovní: 4

Lokalita	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
12.5.	27	4,66667	2,0	42,8571 %	2,0	9,0	7,0
16.6.	27	4,81481	1,90217	39,5065 %	1,0	9,0	8,0
25.6.	27	2,40741	1,82418	75,7737 %	0,0	7,0	7,0
7.5.	27	2,2963	2,12702	92,6283 %	0,0	8,0	8,0
Total	108	3,5463	2,28111	64,3236 %	0,0	9,0	9,0

Tabulka č. I5 - Souhrnné statistiky embryogenity vzorků podle lokalit



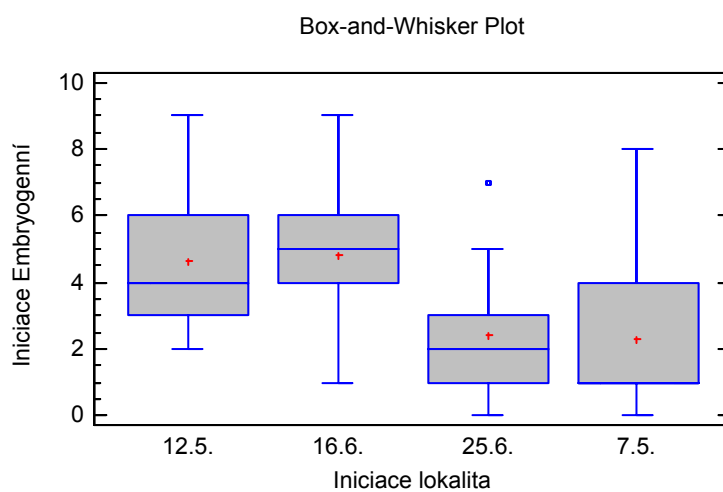
Graf č. I4 – Půměrná embryogenita vzorků podle lokalit a médií



Graf č. I5 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle lokalit

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	154,546	3	51,5154	13,32	0,0000
Within groups	402,222	104	3,86752		
Total (Corr.)	556,769	107			

Tabulka č. I6 – Analýza rozptylu embryogenity vzorků podle lokalit



Graf č. I6 – Střední hodnota a konfidenční intervaly embryogenity vzorků podle lokalit

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
7.5.	27	2,2963	X
25.6.	27	2,40741	X
12.5.	27	4,66667	X
16.6.	27	4,81481	X

Tabulka č. I7 - Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle lokalit

	Test	P-Value
Levene's	0,383835	0,76486

Tabulka č. I8 - Levenův Test homogenosti rozptylů embryogenity vzorků podle lokalit

12.2. Proliferace

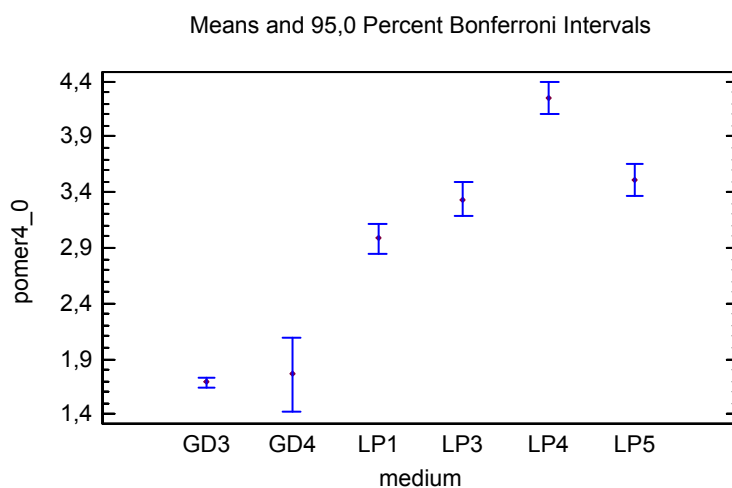
12.2.1. 4. týden

Počet pozorování: 1715

Počet úrovní: 6

Médium	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
GD3	1191	1,69091	1,54545	0,279678	0,528846	31,2759 %	0,818182	4,91667	4,09848
GD4	24	1,76114	1,76667	0,0386675	0,196641	11,1655 %	1,31579	2,1875	0,871711
LP1	140	2,98287	2,69048	1,2271	1,10775	37,1369 %	1,41176	7,14286	5,73109
LP3	120	3,33648	3,19091	0,66025	0,812558	24,3537 %	2,0	5,8	3,8
LP4	120	4,24829	4,0	2,27466	1,5082	35,5014 %	2,2	10,4286	8,22857
LP5	120	3,51327	3,125	1,69381	1,30146	37,0442 %	1,77778	8,0	6,22222
Total	1715	2,21895	1,76923	1,35297	1,16317	52,4199 %	0,818182	10,4286	9,61039

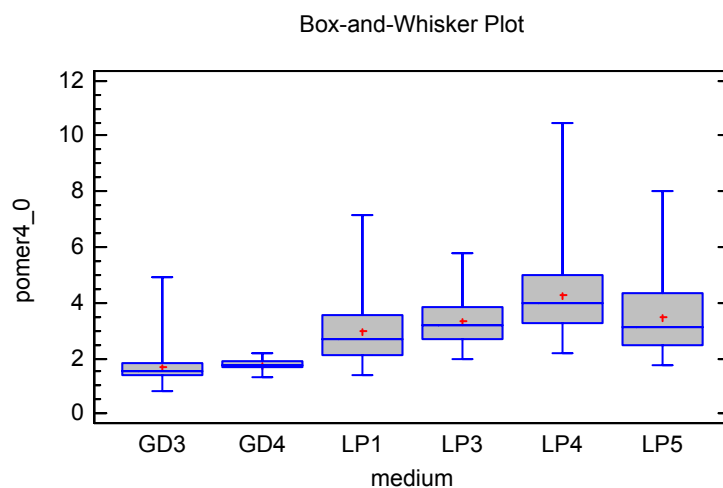
Tabulka č. P1 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle médií (4. týden)



Graf č. P1 – Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %

Poměr 4.-0. týden	Médium						Celkový průměr
Embryogenní linie	GD3	GD4	LP1	LP3	LP4	LP5	
12.5.1.	1,69		2,45	2,90	3,09	2,54	2,29
12.5.10.	1,56						1,56
12.5.2.	1,47		2,46	2,70	3,20	2,32	2,15
12.5.3.	1,37		2,76	3,07	3,00	2,77	2,42
12.5.4.	1,69						1,69
12.5.5.	1,32						1,32
12.5.6.	1,26						1,26
12.5.7.	1,57						1,57
12.5.8.	1,32						1,32
12.5.9.	1,53						1,53
16.6.1.	1,73		3,91	4,17	4,27	4,62	3,17
16.6.10.	1,24						1,24
16.6.2.	1,60		3,69	3,80	4,43	3,78	2,93
16.6.3.	1,32		4,49	4,55	4,83	4,19	3,14
16.6.4.	1,41						1,41
16.6.5.	1,27						1,27
16.6.6.	1,23						1,23
16.6.7.	1,70						1,70
16.6.8.	1,69						1,69
16.6.9.	1,39						1,39
25.6.1.	1,27		3,44	3,08	7,82	5,90	3,88
25.6.10.	1,59						1,59
25.6.2.	1,71		4,89	3,48	5,16	3,62	3,18
25.6.3.	1,51		2,82	3,43	4,71	3,98	2,78
25.6.4.	1,28						1,28
25.6.5.	1,27						1,27
25.6.6.	1,56						1,56
25.6.7.	1,61						1,61
25.6.8.	1,60						1,60
25.6.9.	1,43						1,43
7.5.1.	2,28		2,48	2,45	4,10	3,18	2,72
7.5.10.	2,27						2,27
7.5.11.	2,78						2,78
7.5.12.	1,68						1,68
7.5.2.	1,78		2,53	2,94	3,43	2,84	2,44
7.5.3.	1,80		2,26	3,49	2,94	2,43	2,36
7.5.4.	2,08						2,08
7.5.5.	1,50						1,50
7.5.6.	2,00						2,00
7.5.7.	2,42						2,42
7.5.8.	1,60						1,60
7.5.9.	3,09						3,09
AFO 541	1,94	1,76	1,80				1,84
Celkový průměr	1,69	1,76	2,98	3,34	4,25	3,51	2,22

Tabulka č. P2 - Poměr nárůstu ESM 4. týden vzhledem k 0. týdnu



Graf č. P2 – Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM podle médií

Médium	Count	Mean	Homogeneous Groups
GD3	1191	1,69091	X
GD4	24	1,76114	X
LP1	140	2,98287	X
LP3	120	3,33648	X
LP5	120	3,51327	X
LP4	120	4,24829	X

Tabulka č. P3 - Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %

Linie	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum
12.5.1.	70	2,29215	2,28571	0,527035	0,725972	31,6721 %	0,0867702	1,0	4,0
12.5.10.	30	1,56255	1,54196	0,0653672	0,25567	16,3623 %	0,0466788	1,0	2,0
12.5.2.	70	2,15381	2,09722	0,602526	0,776225	36,0396 %	0,0927767	1,0	4,22222
12.5.3.	58	2,42385	2,3875	0,740827	0,860713	35,5102 %	0,113017	1,0	4,0
12.5.4.	30	1,69429	1,5	0,319888	0,565586	33,3819 %	0,103261	1,0	3,4
12.5.5.	18	1,3233	1,27885	0,0565	0,237697	17,9624 %	0,0560258	1,0	1,83333
12.5.6.	20	1,25548	1,27273	0,0373781	0,193334	15,3992 %	0,0432309	1,0	1,63636
12.5.7.	30	1,56957	1,5359	0,0707842	0,266053	16,9507 %	0,0485744	1,11111	2,46154
12.5.8.	15	1,32338	1,4	0,0606688	0,24631	18,6122 %	0,063597	1,0	1,63636
12.5.9.	30	1,53339	1,51923	0,0730042	0,270193	17,6206 %	0,0493302	1,16667	2,27273
16.6.1.	70	3,16609	3,34722	2,04843	1,43123	45,205 %	0,171065	1,42857	7,0
16.6.10.	30	1,24422	1,28636	0,0317876	0,178291	14,3295 %	0,0325513	1,0	1,625
16.6.2.	70	2,9283	3,0	1,69191	1,30074	44,4195 %	0,155468	1,33333	5,25
16.6.3.	70	3,14393	3,59028	3,01806	1,73726	55,2574 %	0,207642	1,0	5,85714
16.6.4.	30	1,40873	1,41176	0,0434428	0,208429	14,7955 %	0,0380538	1,0	1,75
16.6.5.	19	1,26932	1,33333	0,0342225	0,184993	14,5742 %	0,0424404	1,0	1,5
16.6.6.	26	1,22623	1,26136	0,0355457	0,188536	15,3753 %	0,0369749	1,0	1,55556
16.6.7.	30	1,70339	1,72381	0,0411348	0,202817	11,9067 %	0,0370292	1,375	2,0
16.6.8.	30	1,69467	1,64496	0,0395707	0,198924	11,7382 %	0,0363184	1,35294	2,2
16.6.9.	30	1,38769	1,34314	0,0224682	0,149894	10,8017 %	0,0273667	1,07143	1,66667
25.6.1.	58	3,8836	3,10556	6,71526	2,59138	66,7263 %	0,340265	1,0	10,4286
25.6.10.	30	1,58653	1,5	0,04898	0,221314	13,9496 %	0,0404063	1,27778	2,21429
25.6.2.	70	3,18098	3,16234	2,37361	1,54065	48,4332 %	0,184143	1,21429	7,14286
25.6.3.	70	2,78288	2,64583	1,7999	1,3416	48,2092 %	0,160352	1,2	5,625
25.6.4.	18	1,2798	1,35417	0,0365061	0,191066	14,9294 %	0,0450346	1,0	1,55556
25.6.5.	21	1,26901	1,33333	0,0526516	0,229459	18,0817 %	0,0500722	0,818182	1,66667
25.6.6.	30	1,56091	1,53333	0,0312927	0,176897	11,333 %	0,0322969	1,33333	2,0
25.6.7.	30	1,61384	1,59167	0,0321709	0,179363	11,114 %	0,032747	1,33333	2,15385
25.6.8.	30	1,59601	1,5359	0,0317168	0,178092	11,1585 %	0,032515	1,29412	2,0625
25.6.9.	30	1,43174	1,39231	0,0329496	0,18152	12,6783 %	0,0331409	1,16667	2,0
7.5.1.	70	2,72125	2,54701	0,596704	0,772466	28,3864 %	0,0923273	1,4375	5,25
7.5.10.	30	2,27011	2,29911	0,345585	0,587865	25,8959 %	0,107329	1,35714	3,33333
7.5.11.	30	2,78447	2,82857	0,227291	0,476751	17,1218 %	0,0870424	1,70588	3,64286
7.5.12.	30	1,68337	1,71042	0,192467	0,438711	26,0615 %	0,0800973	1,0	3,0
7.5.2.	70	2,44286	2,39231	0,601342	0,775462	31,744 %	0,0926855	1,25	4,625
7.5.3.	70	2,3567	2,29286	0,546303	0,739123	31,3627 %	0,0883421	1,0	4,33333
7.5.4.	30	2,07773	2,03333	0,156473	0,395566	19,0384 %	0,0722202	1,46667	2,83333
7.5.5.	30	1,50253	1,4641	0,150884	0,388438	25,8523 %	0,0709187	0,933333	2,33333
7.5.6.	30	2,00212	1,93333	0,265075	0,514855	25,7155 %	0,0939991	1,21429	3,25
7.5.7.	30	2,41972	2,42857	0,184882	0,429979	17,7698 %	0,078503	1,35294	3,18182
7.5.8.	30	1,60384	1,52941	0,168441	0,410416	25,5895 %	0,0749314	1,0	3,18182
7.5.9.	30	3,09478	3,03571	0,762082	0,872973	28,2079 %	0,159382	1,6	4,91667
AFO 541	72	1,8416	1,84605	0,0591654	0,243239	13,208 %	0,028666	1,31579	2,73333
Total	1715	2,21895	1,76923	1,35297	1,16317	52,4199 %	0,0280874	0,818182	10,4286

Tabulka č. P4 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle linií

	Test	P-Value
Levene's	68,8524	0,0

Tabulka č. P5 - Levenův Test homogenosti rozptylů nárůstu ESM podle médií

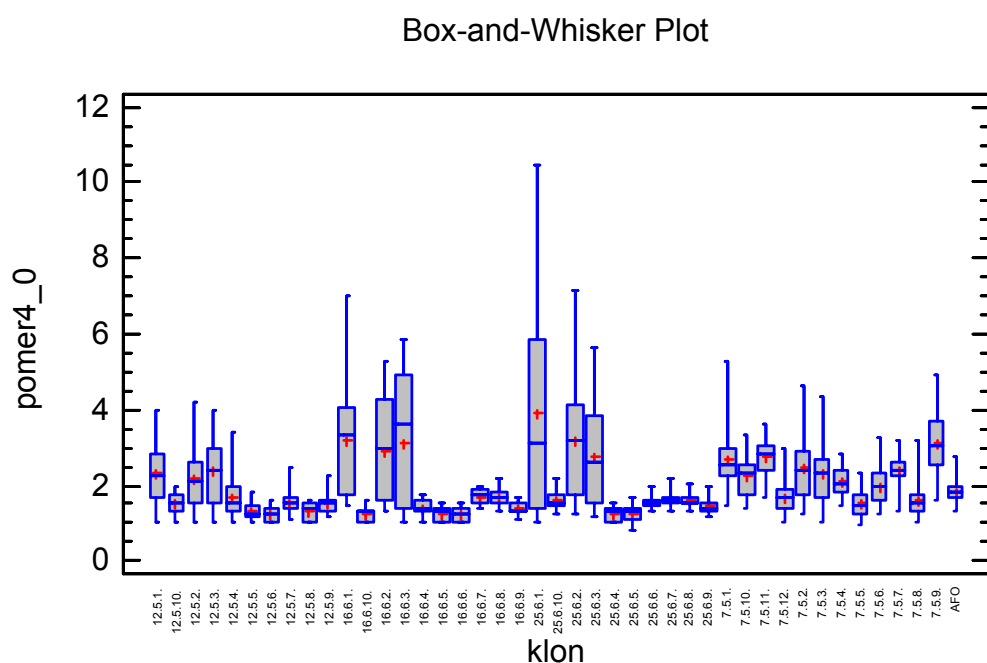
Médium	Sample Size	Average Rank
GD3	1191	631,078
GD4	24	808,25
LP1	140	1275,85
LP3	120	1417,67
LP4	120	1526,58
LP5	120	1404,42

Tabulka č. P6 – Kruskal-Wallisův test významnosti médií; Test statistic = 868,225;

P-Value = 0,0

Médium	Sample Size	n<=	n>	Median	95,0 % lower CL	95,0 % upper CL
GD3	1191	837	354	1,54545	1,53333	1,58824
GD4	24	12	12	1,76667	1,64564	1,8883
LP1	140	10	130	2,69048	2,42605	3,0
LP3	120	0	120	3,19091	3,0	3,42857
LP4	120	0	120	4,0	3,75701	4,25558
LP5	120	0	120	3,125	2,89727	3,5

Tabulka č. P7 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu medianů pro jednotlivá média; Test statistic = 658,73; P-Value = 0,0; Total n = 1715; Grand median = 1,76923



Graf č. P3 - Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM podle linií

Linie	Count	Mean	Homogeneous Groups
16.6.6.	26	1,22623	X
16.6.10.	30	1,24422	X
12.5.6.	20	1,25548	XX
25.6.5.	21	1,26901	XX
16.6.5.	19	1,26932	XX
25.6.4.	18	1,2798	XX
12.5.5.	18	1,3233	XXX
12.5.8.	15	1,32338	XXXX
16.6.9.	30	1,38769	XX
16.6.4.	30	1,40873	XX
25.6.9.	30	1,43174	XX
7.5.5.	30	1,50253	XXX
12.5.9.	30	1,53339	XXXX
25.6.6.	30	1,56091	XXXX
12.5.10.	30	1,56255	XXXX
12.5.7.	30	1,56957	XXXX
25.6.10.	30	1,58653	XXXXX
25.6.8.	30	1,59601	XXXXX
7.5.8.	30	1,60384	XXXXX
25.6.7.	30	1,61384	XXXXX
7.5.12.	30	1,68337	XXXXXX
12.5.4.	30	1,69429	XXXXXX
16.6.8.	30	1,69467	XXXXXX
16.6.7.	30	1,70339	XXXXXX
AFO 541	72	1,8416	XXXXXX
7.5.6.	30	2,00212	XXXXXXXX
7.5.4.	30	2,07773	XXXXXXXX
12.5.2.	70	2,15381	XXXXXXXX
7.5.10.	30	2,27011	XXXXXXXX
12.5.1.	70	2,29215	XXXXXXXX
7.5.3.	70	2,3567	XXXXX
7.5.7.	30	2,41972	XXXXXXXX
12.5.3.	58	2,42385	XXXX
7.5.2.	70	2,44286	XXX
7.5.1.	70	2,72125	XXX
25.6.3.	70	2,78288	XXX
7.5.11.	30	2,78447	XXX
16.6.2.	70	2,9283	XX
7.5.9.	30	3,09478	XXX
16.6.3.	70	3,14393	X
16.6.1.	70	3,16609	X
25.6.2.	70	3,18098	X
25.6.1.	58	3,8836	X

Tabulka č. P8 - Přehled homogenních skupin embryogenních linií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %

	Test	P-Value
Levene's	35,3904	0,0

Tabulka č. P9 - Levenův Test homogeneity rozptylů nárůstu ESM embryogenních linií

Linie	Sample Size	Average Rank
12.5.1.	70	1009,39
12.5.10.	30	569,683
12.5.2.	70	922,243
12.5.3.	58	1022,61
12.5.4.	30	603,35
12.5.5.	18	299,972
12.5.6.	20	227,15
12.5.7.	30	574,25
12.5.8.	15	330,5
12.5.9.	30	520,717
16.6.1.	70	1232,31
16.6.10.	30	203,933
16.6.2.	70	1142,69
16.6.3.	70	1038,21
16.6.4.	30	399,617
16.6.5.	19	240,842
16.6.6.	26	200,904
16.6.7.	30	739,283
16.6.8.	30	734,25
16.6.9.	30	349,267
25.6.1.	58	1134,14
25.6.10.	30	592,15
25.6.2.	70	1203,16
25.6.3.	70	1061,36
25.6.4.	18	251,75
25.6.5.	21	251,19
25.6.6.	30	574,517
25.6.7.	30	644,9
25.6.8.	30	621,95
25.6.9.	30	403,217
7.5.1.	70	1236,13
7.5.10.	30	1046,55
7.5.11.	30	1297,62
7.5.12.	30	681,867
7.5.2.	70	1084,18
7.5.3.	70	1061,7
7.5.4.	30	995,5
7.5.5.	30	495,2
7.5.6.	30	891,067
7.5.7.	30	1157,82
7.5.8.	30	569,767
7.5.9.	30	1333,58
AFO 541	72	867,708

Tabulka č. P10 – Kruskal-Wallisův test významnosti jednotlivých linií;

Test statistic = 734,372; P-Value = 0,0

Linie	Sample Size	n<=	n>	Median	95,0 % lower CL	95,0 % upper CL
12.5.1.	70	22	48	2,28571	2,02791	2,61005
12.5.10.	30	22	8	1,54196	1,39401	1,72451
12.5.2.	70	26	44	2,09722	1,77162	2,32403
12.5.3.	58	18	40	2,3875	2,22222	2,71353
12.5.4.	30	20	10	1,5	1,31353	1,93635
12.5.5.	18	17	1	1,27885	1,12736	1,55951
12.5.6.	20	20	0	1,27273	1,01294	1,41473
12.5.7.	30	25	5	1,5359	1,40369	1,68508
12.5.8.	15	15	0	1,4	1,0	1,58218
12.5.9.	30	25	5	1,51923	1,33871	1,6349
16.6.1.	70	19	51	3,34722	1,90388	3,71429
16.6.10.	30	30	0	1,28636	1,16862	1,33333
16.6.2.	70	25	45	3,0	1,80507	3,58795
16.6.3.	70	30	40	3,59028	1,53672	4,06008
16.6.4.	30	30	0	1,41176	1,33333	1,4962
16.6.5.	19	19	0	1,33333	1,0	1,42516
16.6.6.	26	26	0	1,26136	1,0	1,36364
16.6.7.	30	17	13	1,72381	1,52992	1,87269
16.6.8.	30	19	11	1,64496	1,55761	1,81745
16.6.9.	30	30	0	1,34314	1,2868	1,4957
25.6.1.	58	18	40	3,10556	2,31716	4,4912
25.6.10.	30	25	5	1,5	1,46154	1,70814
25.6.2.	70	20	50	3,16234	1,96315	3,57558
25.6.3.	70	27	43	2,64583	1,73798	3,20314
25.6.4.	18	18	0	1,35417	1,0	1,4
25.6.5.	21	21	0	1,33333	1,0411	1,3887
25.6.6.	30	26	4	1,53333	1,46667	1,5594
25.6.7.	30	27	3	1,59167	1,5038	1,66667
25.6.8.	30	26	4	1,5359	1,5	1,64652
25.6.9.	30	29	1	1,39231	1,33587	1,53283
7.5.1.	70	5	65	2,54701	2,37378	2,8291
7.5.10.	30	9	21	2,29911	1,77235	2,53333
7.5.11.	30	1	29	2,82857	2,56365	2,99193
7.5.12.	30	18	12	1,71042	1,42582	1,82211
7.5.2.	70	19	51	2,39231	2,1031	2,66667
7.5.3.	70	18	52	2,29286	2,02537	2,54935
7.5.4.	30	7	23	2,03333	1,8	2,27465
7.5.5.	30	24	6	1,4641	1,28571	1,69774
7.5.6.	30	10	20	1,93333	1,64862	2,3024
7.5.7.	30	3	27	2,42857	2,26913	2,62376
7.5.8.	30	24	6	1,52941	1,33995	1,7443
7.5.9.	30	3	27	3,03571	2,60199	3,49078
AFO 541	72	26	46	1,84605	1,79133	1,89907

Tabulka č. P11 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu mediánů pro jednotlivé linie; Test statistic = 614,74; P-Value = 0,0

Poměr 4.-0. týden	Médium						Celkový průměr
Embryogenní linie	GD3	GD4	LP1	LP3	LP4	LP5	
25.6.1.	1,27		3,44	3,08	7,82	5,90	3,88
25.6.2.	1,71		4,89	3,48	5,16	3,62	3,18
16.6.1.	1,73		3,91	4,17	4,27	4,62	3,17
16.6.3.	1,32		4,49	4,55	4,83	4,19	3,14
7.5.9.	3,09						3,09
16.6.2.	1,60		3,69	3,80	4,43	3,78	2,93
7.5.11.	2,78						2,78
25.6.3.	1,51		2,82	3,43	4,71	3,98	2,78
7.5.1.	2,28		2,48	2,45	4,10	3,18	2,72
7.5.2.	1,78		2,53	2,94	3,43	2,84	2,44
12.5.3.	1,37		2,76	3,07	3,00	2,77	2,42
7.5.7.	2,42						2,42
7.5.3.	1,80		2,26	3,49	2,94	2,43	2,36
12.5.1.	1,69		2,45	2,90	3,09	2,54	2,29
7.5.10.	2,27						2,27
12.5.2.	1,47		2,46	2,70	3,20	2,32	2,15
7.5.4.	2,08						2,08
7.5.6.	2,00						2,00
AFO 541	1,94	1,76	1,80				1,84
16.6.7.	1,70						1,70
16.6.8.	1,69						1,69
12.5.4.	1,69						1,69
7.5.12.	1,68						1,68
25.6.7.	1,61						1,61
7.5.8.	1,60						1,60
25.6.8.	1,60						1,60
25.6.10.	1,59						1,59
12.5.7.	1,57						1,57
12.5.10.	1,56						1,56
25.6.6.	1,56						1,56
12.5.9.	1,53						1,53
7.5.5.	1,50						1,50
25.6.9.	1,43						1,43
16.6.4.	1,41						1,41
16.6.9.	1,39						1,39
12.5.8.	1,32						1,32
12.5.5.	1,32						1,32
25.6.4.	1,28						1,28
16.6.5.	1,27						1,27
25.6.5.	1,27						1,27
12.5.6.	1,26						1,26
16.6.10.	1,24						1,24
16.6.6.	1,23						1,23
Celkový průměr	1,69	1,76	2,98	3,34	4,25	3,51	2,22

Tabulka č. P12 – Kontingenční tabulka výsledků pro 4. týden, průměrné hodnoty nárůstu ESM

Průměr z poměru 4.-0. týden	Celkový průměr
Lokalita	
AFO 541	1,84
7.5.	2,31
12.5.	1,91
25.6.	2,40
16.6.	2,29
Celkový průměr	2,22

Tabulka č. P13 – Proliferace 4. týden, poměr nárůstu ESM podle lokalit

12.2.2. 8. týden

Počet pozorování: 1715

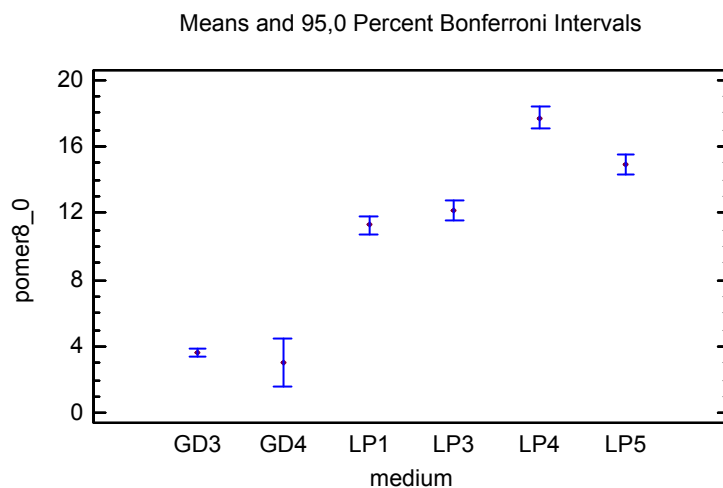
Počet úrovní: 6

Průměr z poměru 8.-0. týden	Médium						Celkový průměr
Linie	GD3	GD4	LP1	LP3	LP4	LP5	
12.5.1.	3,63		10,43	10,88	11,51	11,57	7,90
12.5.10.	4,18						4,18
12.5.2.	2,79		9,64	10,62	11,79	9,96	7,20
12.5.3.	1,67		11,37	12,76	13,59	11,00	8,92
12.5.4.	3,43						3,43
12.5.5.	1,63						1,63
12.5.6.	1,71						1,71
12.5.7.	4,39						4,39
12.5.8.	1,66						1,66
12.5.9.	3,76						3,76
16.6.1.	4,82		16,43	17,64	18,79	24,76	13,16
16.6.10.	1,62						1,62
16.6.2.	4,32		19,10	18,15	20,31	18,54	12,72
16.6.3.	2,41		19,97	19,44	22,91	17,23	12,39
16.6.4.	3,31						3,31
16.6.5.	1,63						1,63
16.6.6.	1,65						1,65
16.6.7.	5,11						5,11
16.6.8.	5,26						5,26
16.6.9.	2,51						2,51
25.6.1.	1,62		8,59	8,06	20,30	20,53	10,41
25.6.10.	4,57						4,57
25.6.2.	5,00		20,05	13,08	22,60	14,84	12,22
25.6.3.	2,95		9,69	10,97	22,12	16,98	9,80
25.6.4.	1,60						1,60
25.6.5.	1,65						1,65
25.6.6.	3,88						3,88
25.6.7.	4,68						4,68
25.6.8.	4,23						4,23
25.6.9.	3,26						3,26
7.5.1.	4,92		7,97	6,54	18,26	14,67	8,89
7.5.10.	4,45						4,45
7.5.11.	6,05						6,05
7.5.12.	3,04						3,04
7.5.2.	3,16		11,98	8,47	15,63	9,84	7,91
7.5.3.	3,43		6,74	9,27	14,86	8,94	7,16
7.5.4.	4,62						4,62
7.5.5.	2,65						2,65
7.5.6.	4,01						4,01
7.5.7.	5,37						5,37
7.5.8.	3,01						3,01
7.5.9.	7,03						7,03
AFO 541	3,28	3,03	2,88				3,09
Celkový průměr	3,64	3,03	11,27	12,16	17,72	14,90	6,62

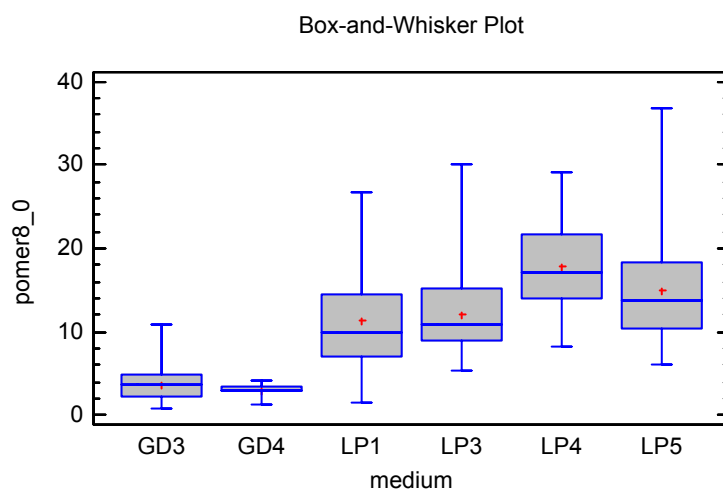
Tabulka č. P15 - Poměr nárůstu ESM 8. týden vzhledem k 0. týdnu

Médium	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
GD3	1191	3,6377	3,625	2,88771	1,69933	46,7143 %	0,727273	11,0	10,2727
GD4	24	3,03198	3,0754	0,505168	0,710752	23,4419 %	1,31579	4,25	2,93421
LP1	140	11,2667	9,8125	37,6627	6,137	54,4703 %	1,41176	26,7143	25,3025
LP3	120	12,1569	10,9615	21,855	4,67493	38,455 %	5,4	30,1429	24,7429
LP4	120	17,7227	17,225	25,9766	5,09672	28,7581 %	8,3	29,1429	20,8429
LP5	120	14,9047	13,7857	35,6148	5,96781	40,0398 %	6,2	36,8333	30,6333
Total	1715	6,622	4,41667	34,5657	5,87926	88,7838 %	0,727273	36,8333	36,1061

Tabulka č. P14 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle médií (8. týden)



Graf č. P4 – Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %



Graf č. P5 – Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM ve fázi proliferace podle médií

Médium	Count	Mean	Homogeneous Groups
GD4	24	3,03198	X
GD3	1191	3,6377	X
LP1	140	11,2667	X
LP3	120	12,1569	X
LP5	120	14,9047	X
LP4	120	17,7227	X

Tabulka č. P16 - Přehled homogenních skupin médií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %

Linie	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
12.5.1.	70	7,89852	9,0	16,7991	4,09867	51,8916 %	1,0	14,75	13,75
12.5.10.	30	4,17505	3,85294	2,64127	1,6252	38,9264 %	1,0	7,15385	6,15385
12.5.2.	70	7,1987	8,07143	18,3422	4,28278	59,4938 %	1,0	15,5	14,5
12.5.3.	58	8,91984	9,26111	31,0646	5,57357	62,485 %	1,0	18,0	17,0
12.5.4.	30	3,42783	3,56078	2,0774	1,44132	42,0475 %	1,0	6,06667	5,06667
12.5.5.	18	1,62831	1,33333	0,346019	0,588234	36,1254 %	1,0	2,81818	1,81818
12.5.6.	20	1,71415	1,51389	0,488346	0,698817	40,7675 %	1,0	3,4	2,4
12.5.7.	30	4,3938	4,38914	1,81908	1,34873	30,6962 %	1,55556	6,54545	4,9899
12.5.8.	15	1,6646	1,5	0,494207	0,702999	42,2324 %	1,0	3,5	2,5
12.5.9.	30	3,76091	4,0	2,04325	1,42942	38,0074 %	1,16667	6,81818	5,65152
16.6.1.	70	13,1552	14,6136	72,7251	8,5279	64,8252 %	3,05882	36,8333	33,7745
16.6.10.	30	1,61884	1,63068	0,285115	0,533962	32,9841 %	1,0	2,54545	1,54545
16.6.2.	70	12,7224	14,3958	62,8115	7,92537	62,2946 %	2,17647	26,4286	24,2521
16.6.3.	70	12,3945	15,4792	85,2573	9,23349	74,4966 %	1,0	28,375	27,375
16.6.4.	30	3,31204	3,46405	1,97542	1,4055	42,4359 %	1,0	6,16667	5,16667
16.6.5.	19	1,63256	1,5	0,347185	0,589224	36,0921 %	1,0	2,90909	1,90909
16.6.6.	26	1,65363	1,68333	0,370917	0,60903	36,8299 %	1,0	2,8	1,8
16.6.7.	30	5,10958	5,0	0,995581	0,997788	19,5278 %	3,55556	8,08333	4,52778
16.6.8.	30	5,25731	5,26442	1,09868	1,04818	19,9375 %	3,22222	7,38462	4,16239
16.6.9.	30	2,50655	2,63961	0,553801	0,744178	29,6894 %	1,07143	3,91667	2,84524
25.6.1.	58	10,4131	8,0625	68,7366	8,29076	79,6185 %	1,0	27,8571	26,8571
25.6.10.	30	4,56912	4,75128	1,39332	1,18039	25,8341 %	1,36364	6,71429	5,35065
25.6.2.	70	12,2231	11,525	56,1062	7,49041	61,2805 %	2,05556	29,1429	27,0873
25.6.3.	70	9,80058	9,3375	55,8834	7,47552	76,2763 %	1,2	27,1667	25,9667
25.6.4.	18	1,60115	1,69318	0,242888	0,492837	30,7801 %	1,0	2,6	1,6
25.6.5.	21	1,65209	1,5	0,347281	0,589305	35,6702 %	0,727273	2,88889	2,16162
25.6.6.	30	3,87804	3,96875	0,437146	0,66117	17,0491 %	2,47059	5,25	2,77941
25.6.7.	30	4,68426	4,53571	0,97743	0,98865	21,1058 %	3,26667	7,08333	3,81667
25.6.8.	30	4,22877	4,05882	1,0707	1,03475	24,4692 %	2,4	6,61538	4,21538
25.6.9.	30	3,2629	3,16071	1,48855	1,22006	37,3919 %	1,16667	5,81818	4,65152
7.5.1.	70	8,88533	6,66818	27,7619	5,26895	59,2994 %	2,625	21,5	18,875
7.5.10.	30	4,45202	4,28526	0,936922	0,967947	21,7418 %	2,42857	6,83333	4,40476
7.5.11.	30	6,05276	6,1625	1,30433	1,14207	18,8686 %	2,88235	7,76923	4,88688
7.5.12.	30	3,03668	3,15556	1,41788	1,19075	39,2122 %	1,0	5,41667	4,41667
7.5.2.	70	7,91297	7,45	24,8184	4,98181	62,9575 %	2,11765	21,3333	19,2157
7.5.3.	70	7,15675	6,575	18,777	4,33325	60,5477 %	1,0	20,6667	19,6667
7.5.4.	30	4,62319	4,75962	0,661035	0,813041	17,5861 %	3,0	6,16667	3,16667
7.5.5.	30	2,65057	2,76667	1,26075	1,12283	42,3619 %	0,933333	4,38462	3,45128
7.5.6.	30	4,0059	3,9	1,31222	1,14552	28,5958 %	2,0	6,18182	4,18182
7.5.7.	30	5,37497	5,33636	0,927088	0,962854	17,9137 %	3,41176	7,45455	4,04278
7.5.8.	30	3,01095	2,83333	1,12526	1,06078	35,2308 %	1,0	6,90909	5,90909
7.5.9.	30	7,02983	6,81044	4,1486	2,03681	28,9739 %	3,76471	11,0	7,23529
AFO 541	72	3,08747	3,09762	0,542399	0,736477	23,8538 %	1,31579	5,2	3,88421
Total	1715	6,622	4,41667	34,5657	5,87926	88,7838 %	0,727273	36,8333	36,1061

Tabulka č. P17 - Souhrnné statistiky nárůstu ESM podle linií

	Test	P-Value
Levene's	144,607	0,0

Tabulka č. P18 - Levenův Test homogenosti rozptylů nárůstu ESM podle médií

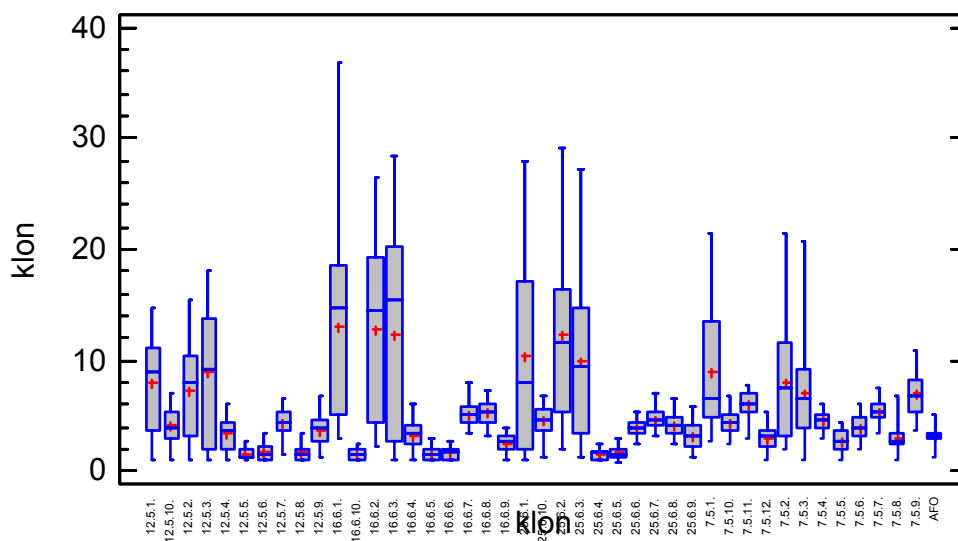
Médium	Sample Size	Average Rank
GD3	1191	626,248
GD4	24	487,625
LP1	140	1279,38
LP3	120	1411,69
LP4	120	1561,5
LP5	120	1483,41

Tabulka č. P19 – Kruskal-Wallisův test významnosti médií; Test statistic = 959,27 P-Value = 0,0

Médium	Sample Size	n<=	n>	Median	95,0 % lower CL	95,0 % upper CL
GD3	1191	814	377	3,625	3,5	3,76471
GD4	24	24	0	3,0754	2,92544	3,40763
LP1	140	20	120	9,8125	9,11398	11,375
LP3	120	0	120	10,9615	10,2287	11,8649
LP4	120	0	120	17,225	16,0	18,7709
LP5	120	0	120	13,7857	12,8947	15,3333

Tabulka č. P20 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu medianů pro jednotlivá média; Test statistic = 615,772; P-Value = 0,0; Total n

Box-and-Whisker Plot



Graf č. P6 – Střední hodnota a konfidenční intervaly nárůstu ESM podle linií

Linie	Count	Mean	Homogeneous Groups
25.6.4.	18	1,60115	XX
16.6.10.	30	1,61884	X
12.5.5.	18	1,62831	XX
16.6.5.	19	1,63256	XX
25.6.5.	21	1,65209	XX
16.6.6.	26	1,65363	X
12.5.8.	15	1,6646	XX
12.5.6.	20	1,71415	XX
16.6.9.	30	2,50655	XX
7.5.5.	30	2,65057	XX
7.5.8.	30	3,01095	XX
7.5.12.	30	3,03668	XXX
AFO 541	72	3,08747	XX
25.6.9.	30	3,2629	XXXX
16.6.4.	30	3,31204	XXXX
12.5.4.	30	3,42783	XXXX
12.5.9.	30	3,76091	XXXXXX
25.6.6.	30	3,87804	XXXXXXX
7.5.6.	30	4,0059	XXXXXXX
12.5.10.	30	4,17505	XXXXXXX
25.6.8.	30	4,22877	XXXXXXX
12.5.7.	30	4,3938	XXXXXXX
7.5.10.	30	4,45202	XXXXXXX
25.6.10.	30	4,56912	XXXXXXX
7.5.4.	30	4,62319	XXXXXXX
25.6.7.	30	4,68426	XXXXXXX
16.6.7.	30	5,10958	XXXXXXXX
16.6.8.	30	5,25731	XXXXXXXX
7.5.7.	30	5,37497	XXXXXXXX
7.5.11.	30	6,05276	XXXXXXXX
7.5.9.	30	7,02983	XXXXXXXX
7.5.3.	70	7,15675	XXXXXXXX
12.5.2.	70	7,1987	XXXXXXXX
12.5.1.	70	7,89852	XXXXXX
7.5.2.	70	7,91297	XXXXXX
7.5.1.	70	8,88533	XXX
12.5.3.	58	8,91984	XXXXX
25.6.3.	70	9,80058	XXXX
25.6.1.	58	10,4131	XXXX
25.6.2.	70	12,2231	XXX
16.6.3.	70	12,3945	XX
16.6.2.	70	12,7224	XX
16.6.1.	70	13,1552	X

Tabulka č. P21 - Přehled homogenních skupin embryogenních linií stejné statistické významnosti podle Bonferroniho testu na hladině pravděpodobnosti 95 %

	Test	P-Value
Levene's	38,7501	0,0

Tabulka č. P22 - Levenův Test homogenosti rozptylů nárůstu ESM embryogenních linií

Linie	Sample Size	Average Rank
12.5.1.	70	1071,03
12.5.10.	30	738,917
12.5.2.	70	975,55
12.5.3.	58	1040,2
12.5.4.	30	590,85
12.5.5.	18	175,694
12.5.6.	20	192,6
12.5.7.	30	813,55
12.5.8.	15	183,7
12.5.9.	30	666,367
16.6.1.	70	1299,52
16.6.10.	30	170,733
16.6.2.	70	1254,55
16.6.3.	70	1070,19
16.6.4.	30	565,983
16.6.5.	19	175,132
16.6.6.	26	176,115
16.6.7.	30	968,917
16.6.8.	30	992,45
16.6.9.	30	363,533
25.6.1.	58	1054,59
25.6.10.	30	854,017
25.6.2.	70	1294,31
25.6.3.	70	1054,96
25.6.4.	18	165,444
25.6.5.	21	178,214
25.6.6.	30	704,917
25.6.7.	30	881,15
25.6.8.	30	775,7
25.6.9.	30	553,567
7.5.1.	70	1184,49
7.5.10.	30	830,35
7.5.11.	30	1108,33
7.5.12.	30	501,683
7.5.2.	70	1021,63
7.5.3.	70	1018,1
7.5.4.	30	877,55
7.5.5.	30	407,433
7.5.6.	30	722,8
7.5.7.	30	1018,67
7.5.8.	30	476,083
7.5.9.	30	1164,77
AFO 541	72	500,326

Tabulka č. P23 – Kruskal-Wallisův test významnosti jednotlivých linií;

Test statistic = 769,021; P-Value = 0,0

Linie	Sample Size	n<=	n>	Median	95,0 % lower CL	95,0 % upper CL
12.5.1.	70	21	49	9,0	5,33998	10,4251
12.5.10.	30	16	14	3,85294	3,17958	5,17821
12.5.2.	70	25	45	8,07143	4,6124	9,53721
12.5.3.	58	18	40	9,26111	7,48551	12,1406
12.5.4.	30	23	7	3,56078	2,23077	4,26667
12.5.5.	18	18	0	1,33333	1,18541	2,23585
12.5.6.	20	20	0	1,51389	1,02688	2,364
12.5.7.	30	15	15	4,38914	3,96346	5,22518
12.5.8.	15	15	0	1,5	1,0	2,22414
12.5.9.	30	20	10	4,0	2,91258	4,52903
16.6.1.	70	9	61	14,6136	5,67176	16,1657
16.6.10.	30	30	0	1,63068	1,16862	1,88889
16.6.2.	70	20	50	14,3958	5,61251	17,0307
16.6.3.	70	29	41	15,4792	3,47227	18,9001
16.6.4.	30	23	7	3,46405	2,64593	4,04683
16.6.5.	19	19	0	1,5	1,0	1,96569
16.6.6.	26	26	0	1,68333	1,0	2,04983
16.6.7.	30	7	23	5,0	4,50497	5,68481
16.6.8.	30	8	22	5,26442	4,48019	5,77541
16.6.9.	30	30	0	2,63961	2,00717	2,86667
25.6.1.	58	18	40	8,0625	6,45794	10,9912
25.6.10.	30	12	18	4,75128	3,87581	5,22967
25.6.2.	70	9	61	11,525	6,23005	14,8478
25.6.3.	70	28	42	9,3375	4,01993	10,8887
25.6.4.	18	18	0	1,69318	1,0	2,02241
25.6.5.	21	21	0	1,5	1,11303	2,0
25.6.6.	30	24	6	3,96875	3,5371	4,28325
25.6.7.	30	13	17	4,53571	4,21429	5,27953
25.6.8.	30	20	10	4,05882	3,58312	4,66129
25.6.9.	30	25	5	3,16071	2,38144	3,98155
7.5.1.	70	12	58	6,66818	6,11499	7,65504
7.5.10.	30	16	14	4,28526	3,80738	4,90073
7.5.11.	30	1	29	6,1625	5,58549	6,87363
7.5.12.	30	25	5	3,15556	2,47527	3,77303
7.5.2.	70	29	41	7,45	4,14133	9,23097
7.5.3.	70	25	45	6,575	4,68273	8,375
7.5.4.	30	13	17	4,75962	3,9746	5,05806
7.5.5.	30	30	0	2,76667	2,02279	3,48155
7.5.6.	30	19	11	3,9	3,35798	4,7811
7.5.7.	30	6	24	5,33636	4,8568	5,92127
7.5.8.	30	29	1	2,83333	2,40795	3,33775
7.5.9.	30	2	28	6,81044	5,76777	8,20097
AFO 541	72	71	1	3,09762	3,0	3,38257

Tabulka č. P24 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu medianů pro jednotlivé
linie; Test statistic = 628,164; P-Value = 0,0

Průměr z poměru 8.-0. týden	Médium						Celkový průměr
Linie	GD3	GD4	LP1	LP3	LP4	LP5	
16.6.1.	4,82		16,43	17,64	18,79	24,76	13,16
16.6.2.	4,32		19,10	18,15	20,31	18,54	12,72
16.6.3.	2,41		19,97	19,44	22,91	17,23	12,39
25.6.2.	5,00		20,05	13,08	22,60	14,84	12,22
25.6.1.	1,62		8,59	8,06	20,30	20,53	10,41
25.6.3.	2,95		9,69	10,97	22,12	16,98	9,80
12.5.3.	1,67		11,37	12,76	13,59	11,00	8,92
7.5.1.	4,92		7,97	6,54	18,26	14,67	8,89
7.5.2.	3,16		11,98	8,47	15,63	9,84	7,91
12.5.1.	3,63		10,43	10,88	11,51	11,57	7,90
12.5.2.	2,79		9,64	10,62	11,79	9,96	7,20
7.5.3.	3,43		6,74	9,27	14,86	8,94	7,16
7.5.9.	7,03						7,03
7.5.11.	6,05						6,05
7.5.7.	5,37						5,37
16.6.8.	5,26						5,26
16.6.7.	5,11						5,11
25.6.7.	4,68						4,68
7.5.4.	4,62						4,62
25.6.10.	4,57						4,57
7.5.10.	4,45						4,45
12.5.7.	4,39						4,39
25.6.8.	4,23						4,23
12.5.10.	4,18						4,18
7.5.6.	4,01						4,01
25.6.6.	3,88						3,88
12.5.9.	3,76						3,76
12.5.4.	3,43						3,43
16.6.4.	3,31						3,31
25.6.9.	3,26						3,26
AFO 541	3,28	3,03	2,88				3,09
7.5.12.	3,04						3,04
7.5.8.	3,01						3,01
7.5.5.	2,65						2,65
16.6.9.	2,51						2,51
12.5.6.	1,71						1,71
12.5.8.	1,66						1,66
16.6.6.	1,65						1,65
25.6.5.	1,65						1,65
16.6.5.	1,63						1,63
12.5.5.	1,63						1,63
16.6.10.	1,62						1,62
25.6.4.	1,60						1,60
Celkový průměr	3,64	3,03	11,27	12,16	17,72	14,90	6,62

Tabulka č. P25 - Kontingenční tabulka výsledků pro 8. týden, průměrné hodnoty nárůstu ESM

Průměr z poměru 8.-0. týden	Celkový průměr
Lokalita	
AFO 541	3,09
7.5.	6,01
12.5.	5,73
25.6.	7,32
16.6.	8,14
Celkový průměr	6,62

Tabulka č. P26 – Proliferace 8. týden, poměr nárůstu ESM podle lokalit

12.3. Maturace

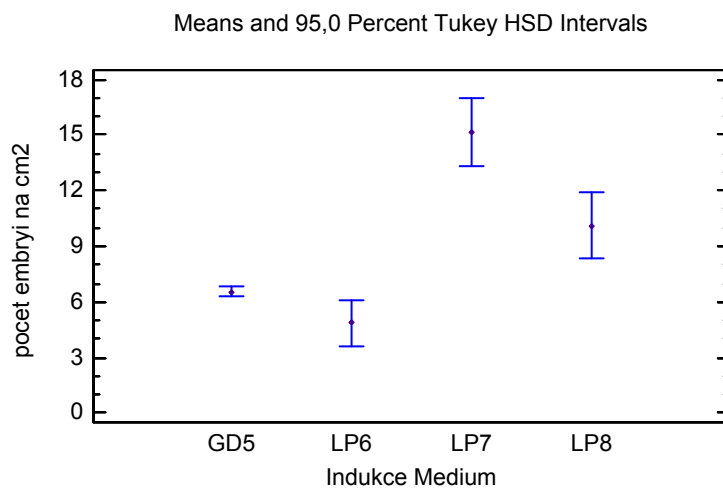
12.3.1. Média

Počet pozorování: 891

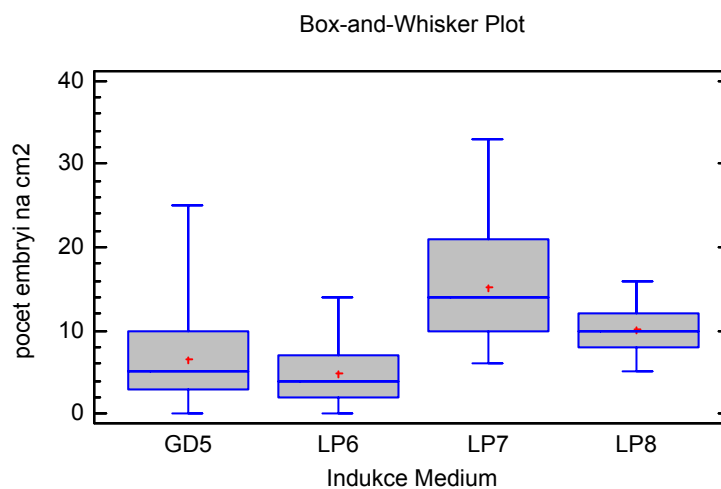
Počet úrovní: 4

Médium	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
GD5	786	6,56997	5,0	24,8925	4,98924	75,9401 %	0,0	25,0	25,0
LP6	55	4,85455	4,0	11,6081	3,40706	70,183 %	0,0	14,0	14,0
LP7	25	15,16	14,0	46,14	6,79264	44,8064 %	6,0	33,0	27,0
LP8	25	10,12	10,0	9,11	3,01828	29,8249 %	5,0	16,0	11,0
Total	891	6,80471	6,0	26,7034	5,16753	75,9405 %	0,0	33,0	33,0

Tabulka č. M1 – Souhrnné statistiky výsledků maturace podle médií



Graf č. M1 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle média



Graf č. M2 – Střední hodnota a konfidenční intervaly počtu embryí/cm² pro jednotlivá média

Medium	Sample Size	Average Rank
GD5	786	435,761
LP6	55	360,118
LP7	25	752,74
LP8	25	650,1

Tabulka č. M2 – Kruskal-Wallisův test významnosti médií; Test statistic = 58,8913; P-Value = 1,01408E⁻¹²

Medium	Sample Size	n<=	n>	Median	95,0 % lower CL	95,0 % upper CL
GD5	786	453	333	5,0	5,0	6,0
LP6	55	39	16	4,0	3,0	6,0
LP7	25	1	24	14,0	10,1042	20,6875
LP8	25	2	23	10,0	8,0	12,0

Tabulka č. M3 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu medianů pro jednotlivá média; Total n = 89, Grand median = 6,0; Test statistic = 56,4355; P-Value = 3,39151E⁻¹²

12.3.2. Embryogenní linie

Počet pozorování: 891

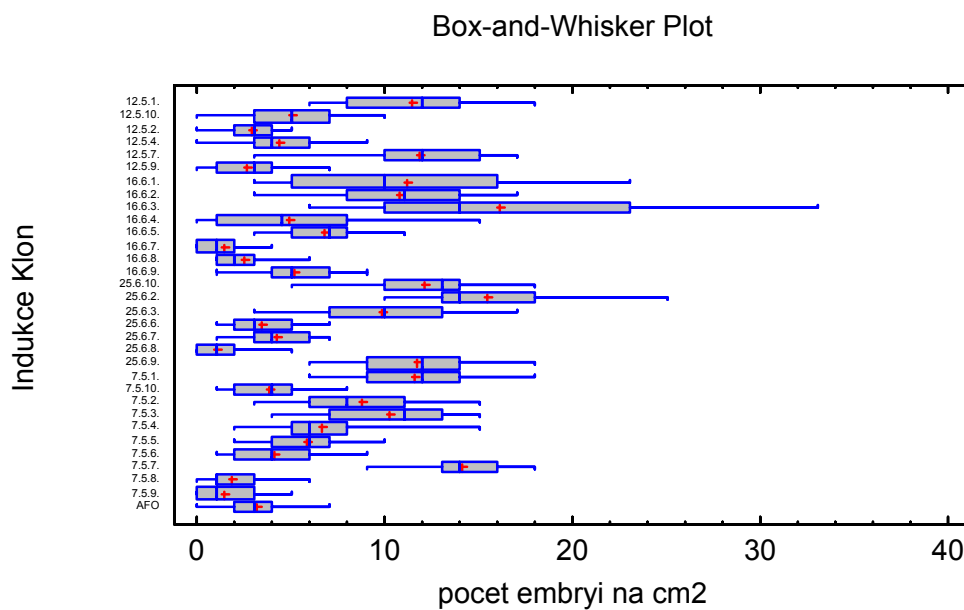
Počet úrovní: 32

Linie	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
12.5.1.	27	11,4815	12,0	11,6439	3,41231	29,7201 %	6,0	18,0	12,0
12.5.10.	27	5,07407	5,0	5,37892	2,31925	45,7078 %	0,0	10,0	10,0
12.5.2.	27	2,92593	3,0	2,91738	1,70803	58,3758 %	0,0	5,0	5,0
12.5.4.	27	4,37037	4,0	4,93447	2,22137	50,8279 %	0,0	9,0	9,0
12.5.7.	27	11,9259	12,0	12,2251	3,49644	29,3179 %	3,0	17,0	14,0
12.5.9.	27	2,62963	3,0	4,0114	2,00285	76,1646 %	0,0	7,0	7,0
16.6.1.	15	11,1333	10,0	39,981	6,32305	56,7939 %	3,0	23,0	20,0
16.6.2.	42	10,7857	11,0	12,4652	3,5306	32,7341 %	3,0	17,0	14,0
16.6.3.	15	16,1333	14,0	56,2667	7,50111	46,4945 %	6,0	33,0	27,0
16.6.4.	42	4,90476	4,5	16,8688	4,10716	83,7382 %	0,0	15,0	15,0
16.6.5.	15	6,73333	7,0	5,06667	2,25093	33,4296 %	3,0	11,0	8,0
16.6.7.	27	1,44444	1,0	1,5641	1,25064	86,5828 %	0,0	4,0	4,0
16.6.8.	27	2,55556	2,0	1,79487	1,33973	52,4241 %	1,0	6,0	5,0
16.6.9.	27	5,22222	5,0	4,10256	2,02548	38,7858 %	1,0	9,0	8,0
25.6.10.	27	12,1481	13,0	10,2849	3,20701	26,3992 %	5,0	18,0	13,0
25.6.2.	27	15,4815	14,0	16,8746	4,10788	26,5341 %	10,0	25,0	15,0
25.6.3.	27	9,88889	10,0	12,7949	3,57699	36,1718 %	3,0	17,0	14,0
25.6.6.	27	3,40741	3,0	3,17379	1,78151	52,2835 %	1,0	7,0	6,0
25.6.7.	27	4,2963	4,0	2,83191	1,68283	39,1693 %	1,0	7,0	6,0
25.6.8.	27	1,07407	1,0	1,76353	1,32798	123,64 %	0,0	5,0	5,0
25.6.9.	27	11,7037	12,0	13,0627	3,61423	30,8811 %	6,0	18,0	12,0
7.5.1.	27	11,6296	12,0	10,2422	3,20034	27,5188 %	6,0	18,0	12,0
7.5.10.	27	3,81481	4,0	4,23362	2,05758	53,9365 %	1,0	8,0	7,0
7.5.2.	27	8,74074	8,0	9,66097	3,10821	35,56 %	3,0	15,0	12,0
7.5.3.	27	10,2222	11,0	10,7179	3,27383	32,0266 %	4,0	15,0	11,0
7.5.4.	27	6,7037	6,0	8,1396	2,853	42,5585 %	2,0	15,0	13,0
7.5.5.	27	5,85185	6,0	4,36182	2,0885	35,6895 %	2,0	10,0	8,0
7.5.6.	27	4,07407	4,0	5,14815	2,26895	55,6925 %	1,0	9,0	8,0
7.5.7.	27	14,1852	14,0	5,77208	2,40252	16,9368 %	9,0	18,0	9,0
7.5.8.	27	1,85185	1,0	3,2849	1,81243	97,8712 %	0,0	6,0	6,0
7.5.9.	27	1,44444	1,0	2,41026	1,5525	107,481 %	0,0	5,0	5,0
AFO 541	60	3,2	3,0	3,55254	1,88482	58,9006 %	0,0	7,0	7,0
Total	891	6,80471	6,0	26,7034	5,16753	75,9405 %	0,0	33,0	33,0

Tabulka č. M4 - Souhrnné statistiky maturace podle jednotlivých linií

Linie	Count	Mean	Homogeneous Groups
25.6.8.	27	1,07407	X
7.5.9.	27	1,44444	XX
16.6.7.	27	1,44444	XX
7.5.8.	27	1,85185	XX
16.6.8.	27	2,55556	XXX
12.5.9.	27	2,62963	XXX
12.5.2.	27	2,92593	XXXX
AFO 541	60	3,2	XXX
25.6.6.	27	3,40741	XXXXXX
7.5.10.	27	3,81481	XXXXXX
7.5.6.	27	4,07407	XXXXXX
25.6.7.	27	4,2963	XXXXXX
12.5.4.	27	4,37037	XXXXXX
16.6.4.	42	4,90476	XXXX
12.5.10.	27	5,07407	XXXX
16.6.9.	27	5,22222	XXXX
7.5.5.	27	5,85185	XXXX
7.5.4.	27	6,7037	XX
16.6.5.	15	6,73333	XXXX
7.5.2.	27	8,74074	XXX
25.6.3.	27	9,88889	XXX
7.5.3.	27	10,2222	XXX
16.6.2.	42	10,7857	XX
16.6.1.	15	11,1333	XXX
12.5.1.	27	11,4815	XXX
7.5.1.	27	11,6296	XXX
25.6.9.	27	11,7037	XXX
12.5.7.	27	11,9259	XX
25.6.10.	27	12,1481	XX
7.5.7.	27	14,1852	XX
25.6.2.	27	15,4815	X
16.6.3.	15	16,1333	X

Tabulka č. M5 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle linií



Graf č.M3 – Střední hodnota a konfidenční intervaly počtu embryí/cm² pro jednotlivé linie

Linie	Sample Size	Average Rank
12.5.1.	27	695,056
12.5.10.	27	392,444
12.5.2.	27	243,037
12.5.4.	27	343,63
12.5.7.	27	708,407
12.5.9.	27	219,093
16.6.1.	15	630,467
16.6.2.	42	666,929
16.6.3.	15	764,367
16.6.4.	42	355,548
16.6.5.	15	496,2
16.6.7.	27	130,537
16.6.8.	27	210,685
16.6.9.	27	404,63
25.6.10.	27	720,241
25.6.2.	27	798,0
25.6.3.	27	630,37
25.6.6.	27	274,278
25.6.7.	27	342,481
25.6.8.	27	105,852
25.6.9.	27	699,944
7.5.1.	27	703,0
7.5.10.	27	303,981
7.5.2.	27	586,926
7.5.3.	27	647,5
7.5.4.	27	485,185
7.5.5.	27	443,426
7.5.6.	27	320,648
7.5.7.	27	788,944
7.5.8.	27	162,759
7.5.9.	27	133,593
AFO 541	60	262,017

Tabulka č. M6 – Kruskal-Wallisův test významnost embryogenních linií; Test statistic = 633,645, P-Value = 0,0

Linie	Sample Size	n<=	n>	Median	95,0 % lower CL	95,0 % upper CL
12.5.1.	27	1	26	12,0	8,93232	13,0677
12.5.10.	27	18	9	5,0	3,93232	7,0
12.5.2.	27	27	0	3,0	2,0	4,0
12.5.4.	27	22	5	4,0	3,0	6,0
12.5.7.	27	1	26	12,0	10,0	14,0677
12.5.9.	27	26	1	3,0	1,0	4,0
16.6.1.	15	4	11	10,0	4,17817	17,6437
16.6.2.	42	4	38	11,0	9,0	12,8564
16.6.3.	15	1	14	14,0	9,17817	23,8218
16.6.4.	42	27	15	4,5	2,0	7,0
16.6.5.	15	6	9	7,0	5,0	8,82183
16.6.7.	27	27	0	1,0	0,0	2,0
16.6.8.	27	27	0	2,0	1,93232	3,0
16.6.9.	27	20	7	5,0	4,0	6,06768
25.6.10.	27	1	26	13,0	10,0	14,0
25.6.2.	27	0	27	14,0	13,0	17,0677
25.6.3.	27	5	22	10,0	7,0	12,0677
25.6.6.	27	25	2	3,0	2,0	4,06768
25.6.7.	27	24	3	4,0	3,0	5,06768
25.6.8.	27	27	0	1,0	0,0	2,0
25.6.9.	27	2	25	12,0	9,0	14,0
7.5.1.	27	1	26	12,0	9,93232	14,0
7.5.10.	27	23	4	4,0	2,93232	5,0
7.5.2.	27	7	20	8,0	6,93232	11,0
7.5.3.	27	4	23	11,0	7,0	13,0
7.5.4.	27	15	12	6,0	5,93232	7,06768
7.5.5.	27	16	11	6,0	4,0	7,0
7.5.6.	27	22	5	4,0	2,93232	6,0
7.5.7.	27	0	27	14,0	13,0	16,0
7.5.8.	27	27	0	1,0	1,0	2,06768
7.5.9.	27	27	0	1,0	0,0	2,06768
AFO 541	60	58	2	3,0	3,0	4,0

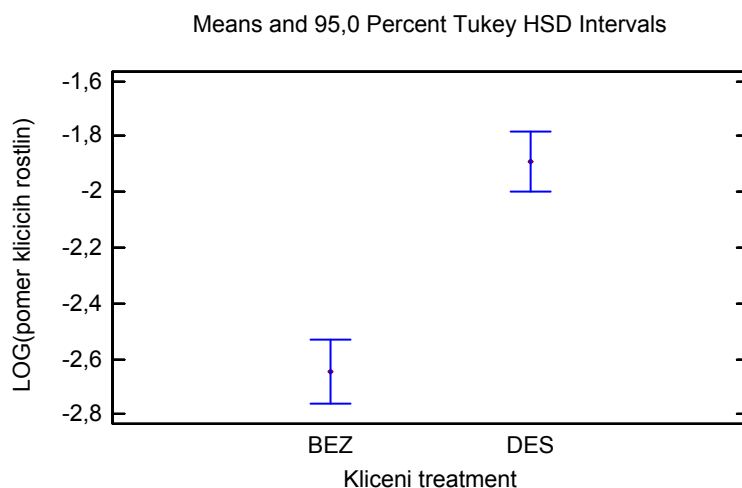
Tabulka č. M7 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu medianů pro jednotlivé linie; Total n = 891; Grand median = 6,0; Test statistic = 557,119; P-Value = 0,0

12.4. Germinace

12.4.1. Druh ošetření

Počet pozorování: 126

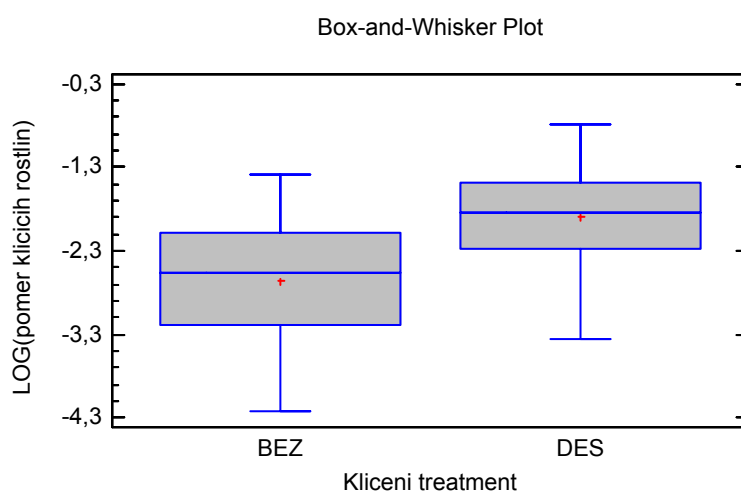
Počet úrovní: 2



Graf č. G1 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle druhu ošetření (DES a BEZ)

Klíčení treatment	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum
BEZ	58	-2,64869	-2,56476	0,469097	0,684907	-25,8584 %	-4,21951	-1,38629
DES	68	-1,89002	-1,84067	0,321287	0,566821	-29,9903 %	-3,3673	-0,780159
Total	126	-2,23925	-2,15874	0,53025	0,728182	-32,5191 %	-4,21951	-0,780159

Tabulka č. G1 – Souhrnné statistiky germinace podle druhu ošetření



Graf č. G2 – Střední hodnota a konfidenční intervaly tvorby klíčících rostlin podle ošetření

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	18,0165	1	18,0165	46,29	0,0000
Within groups	48,2647	124	0,389232		
Total (Corr.)	66,2812	125			

Tabulka č. G2 – Tabulka analýzy rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle druhu ošetření

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
BEZ	58	-2,64869	X
DES	68	-1,89002	X

Tabulka č. G3 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukey HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95,0 % podle druhu ošetření

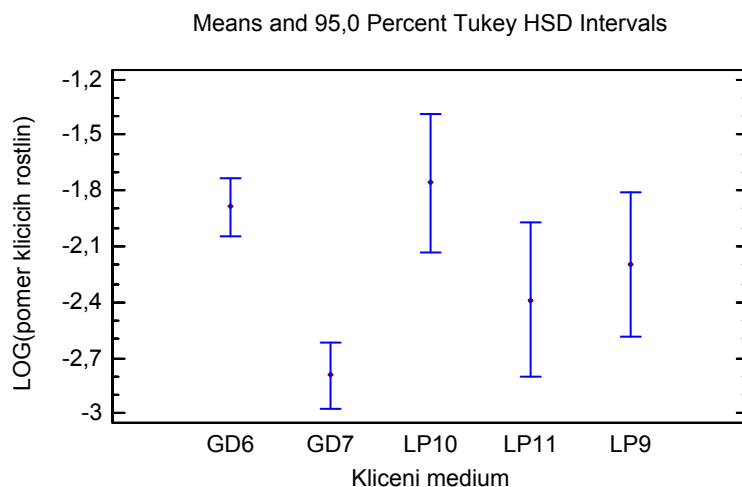
	Test	P-Value
Levene's	2,96407	0,0876271

Tabulka č. G4 – Levenův Test homogenosti rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle druhu ošetření

12.4.2. Média

Počet pozorování: 126

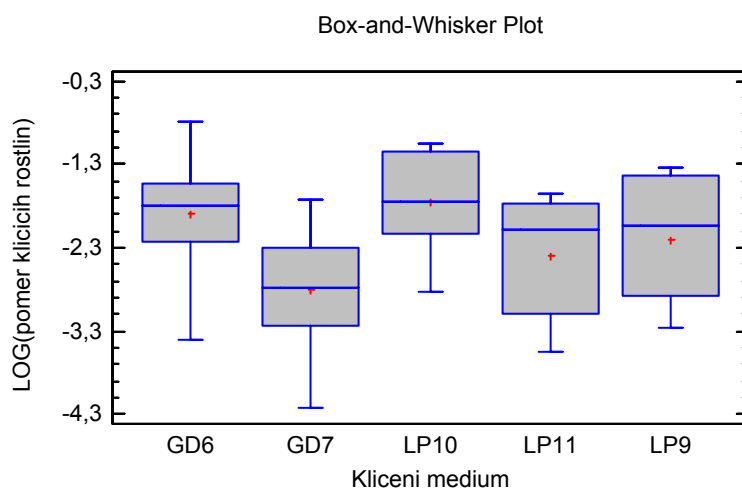
Počet úrovní: 5



Graf č. G3 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií

Médium	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum
GD6	56	-1,88417	-1,79176	0,297023	0,544998	-28,925 %	-3,4012	-0,780159
GD7	43	-2,7943	-2,77259	0,362794	0,602324	-21,5554 %	-4,21951	-1,71979
LP10	10	-1,75897	-1,74825	0,403269	0,635034	-36,1027 %	-2,83321	-1,05605
LP11	8	-2,38952	-2,08074	0,547737	0,740093	-30,9725 %	-3,55535	-1,65823
LP9	9	-2,1967	-2,02815	0,554038	0,744337	-33,8844 %	-3,2581	-1,34993
Total	126	-2,23925	-2,15874	0,53025	0,728182	-32,5191 %	-4,21951	-0,780159

Tabulka č. G5 – Souhrnné statistiky výsledků germinace podle médií



Graf č. G4 – Střední hodnota a konfidenční intervaly tvorby klíčních rostlin podle médií

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	22,8117	4	5,70293	15,87	0,0000
Within groups	43,4695	121	0,359252		
Total (Corr.)	66,2812	125			

Tabulka č. G6 – Tabulka analýzy rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle médií

Médium	Count	Mean	Homogeneous Groups
GD7	43	-2,7943	X
LP11	8	-2,38952	XX
LP9	9	-2,1967	XX
GD6	56	-1,88417	X
LP10	10	-1,75897	X

Tabulka č. G7 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle médií

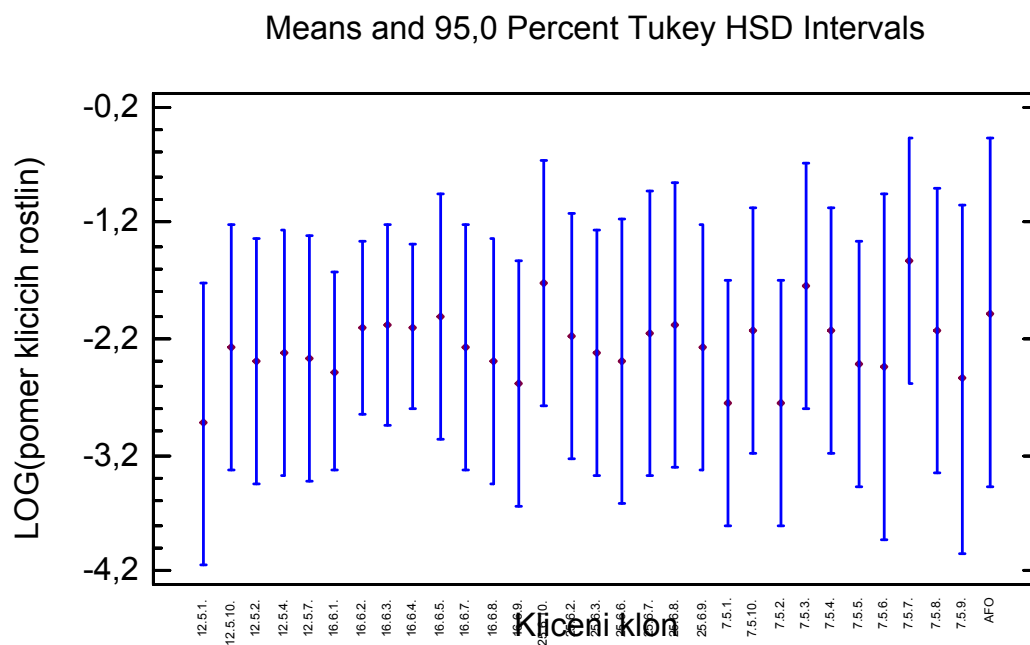
	Test	P-Value
Levene's	0,984245	0,418864

Tabulka č. G8 – Levenův Test homogenosti rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle médií

12.4.3. Embryogenní linie

Počet pozorování: 126

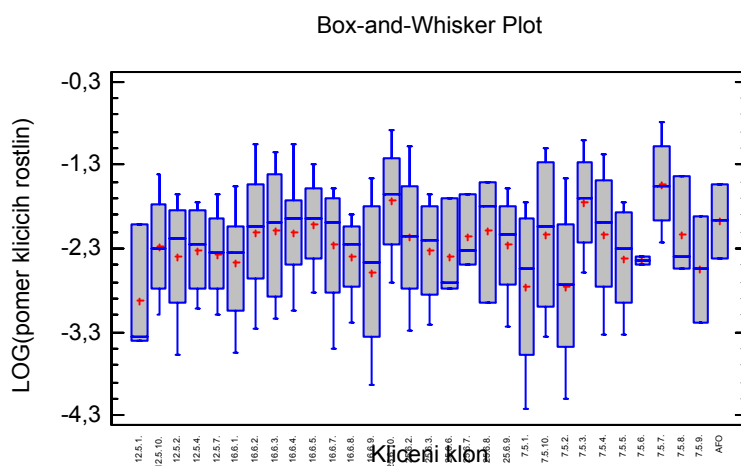
Počet úrovní: 31



Graf č. G5 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle linií

Linie	Count	Average	Median	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum
12.5.1.	3	-2,9278	-3,3673	0,625321	0,790773	-27,0091 %	-3,4012	-2,0149
12.5.10.	4	-2,27507	-2,29452	0,489957	0,699969	-30,7669 %	-3,09104	-1,4202
12.5.2.	4	-2,39442	-2,17109	0,704563	0,839382	-35,0557 %	-3,58352	-1,652
12.5.4.	4	-2,31416	-2,24663	0,335042	0,578828	-25,0124 %	-3,02042	-1,74297
12.5.7.	4	-2,36411	-2,35669	0,356174	0,596803	-25,2444 %	-3,09104	-1,652
16.6.1.	6	-2,47666	-2,34068	0,528137	0,72673	-29,3431 %	-3,55535	-1,5506
16.6.2.	8	-2,10461	-2,04717	0,542505	0,73655	-34,997 %	-3,2581	-1,05605
16.6.3.	6	-2,08742	-1,98326	0,626293	0,791387	-37,9121 %	-3,13549	-1,1421
16.6.4.	9	-2,09792	-1,94591	0,471992	0,687017	-32,7475 %	-3,04452	-1,06087
16.6.5.	4	-2,00092	-1,94478	0,407313	0,638211	-31,8958 %	-2,83321	-1,28093
16.6.7.	4	-2,2621	-1,98041	0,734632	0,857107	-37,8898 %	-3,49651	-1,59109
16.6.8.	4	-2,39615	-2,257	0,303615	0,551013	-22,9957 %	-3,17805	-1,89256
16.6.9.	4	-2,57703	-2,46051	1,10524	1,0513	-40,7951 %	-3,93183	-1,45529
25.6.10.	4	-1,7274	-1,65294	0,565021	0,751679	-43,515 %	-2,70805	-0,895671
25.6.2.	4	-2,16556	-2,15245	0,826487	0,909113	-41,9805 %	-3,28341	-1,07392
25.6.3.	4	-2,32225	-2,20907	0,469544	0,685233	-29,5073 %	-3,21888	-1,652
25.6.6.	3	-2,39236	-2,70805	0,364263	0,603542	-25,2279 %	-2,77259	-1,69645
25.6.7.	3	-2,15473	-2,32728	0,195765	0,442453	-20,5341 %	-2,48491	-1,652
25.6.8.	3	-2,08009	-1,79176	0,581012	0,762241	-36,6446 %	-2,94444	-1,50408
25.6.9.	4	-2,26342	-2,12647	0,494513	0,703216	-31,0687 %	-3,23212	-1,56862
7.5.1.	4	-2,75491	-2,52858	1,18685	1,08943	-39,5449 %	-4,21951	-1,74297
7.5.10.	4	-2,13129	-2,02963	1,11921	1,05793	-49,6378 %	-3,3673	-1,09861
7.5.2.	4	-2,75226	-2,72145	1,1881	1,09	-39,6037 %	-4,11087	-1,45529
7.5.3.	4	-1,74986	-1,70606	0,439798	0,663173	-37,8987 %	-2,584	-1,0033
7.5.4.	4	-2,12444	-1,99449	0,824373	0,90795	-42,7383 %	-3,3322	-1,17657
7.5.5.	4	-2,41852	-2,29945	0,493826	0,702727	-29,0561 %	-3,3322	-1,74297
7.5.6.	2	-2,43725	-2,43725	0,00454202	0,0673945	-2,76518 %	-2,48491	-2,3896
7.5.7.	4	-1,52868	-1,55304	0,368932	0,607398	-39,7335 %	-2,22848	-0,780159
7.5.8.	3	-2,12617	-2,3979	0,363649	0,603033	-28,3624 %	-2,54553	-1,43508
7.5.9.	2	-2,5438	-2,5438	0,80456	0,896973	-35,2612 %	-3,17805	-1,90954
AFO 541	2	-1,97321	-1,97321	0,399897	0,632374	-32,0479 %	-2,42037	-1,52606
Total	126	-2,23925	-2,15874	0,53025	0,728182	-32,5191 %	-4,21951	-0,780159

Tabulka č. G10 – Souhrnné statistiky tvorby klíčních rostlin pro jednotlivé linie



Graf č. G6 – Střední hodnota a konfidenční intervaly tvorby klíčních rostlin podle linií

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10,227	30	0,340901	0,58	0,9556
Within groups	56,0542	95	0,590044		
Total (Corr.)	66,2812	125			

Tabulka č. G11 – Tabulka analýzy rozptylů výtěžku klíčních rostlin podle linií

Linie	Count	Mean	Homogeneous Groups
12.5.1.	3	-2,9278	X
7.5.1.	4	-2,75491	X
7.5.2.	4	-2,75226	X
16.6.9.	4	-2,57703	X
7.5.9.	2	-2,5438	X
16.6.1.	6	-2,47666	X
7.5.6.	2	-2,43725	X
7.5.5.	4	-2,41852	X
16.6.8.	4	-2,39615	X
12.5.2.	4	-2,39442	X
25.6.6.	3	-2,39236	X
12.5.7.	4	-2,36411	X
25.6.3.	4	-2,32225	X
12.5.4.	4	-2,31416	X
12.5.10.	4	-2,27507	X
25.6.9.	4	-2,26342	X
16.6.7.	4	-2,2621	X
25.6.2.	4	-2,16556	X
25.6.7.	3	-2,15473	X
7.5.10.	4	-2,13129	X
7.5.8.	3	-2,12617	X
7.5.4.	4	-2,12444	X
16.6.2.	8	-2,10461	X
16.6.4.	9	-2,09792	X
16.6.3.	6	-2,08742	X
25.6.8.	3	-2,08009	X
16.6.5.	4	-2,00092	X
AFO 541	2	-1,97321	X
7.5.3.	4	-1,74986	X
25.6.10.	4	-1,7274	X
7.5.7.	4	-1,52868	X

Tabulka č. G11 – Přehled homogenních skupin stejné statistické významnosti podle Tukeyho HSD testu na hladině pravděpodobnosti 95 % podle linií

	Test	P-Value
Levene's	0,391918	0,997679

Tabulka č. G12 – Levenův Test homogeneity rozptylů tvorby klíčních rostlin podle linií

Linie	Sample Size	Average Rank
12.5.1.	3	29,3333
12.5.10.	4	61,125
12.5.2.	4	57,125
12.5.4.	4	57,875
12.5.7.	4	55,5
16.6.1.	6	50,3333
16.6.2.	8	69,3125
16.6.3.	6	71,5
16.6.4.	9	70,1111
16.6.5.	4	76,0
16.6.7.	4	64,125
16.6.8.	4	53,5
16.6.9.	4	51,875
25.6.10.	4	88,0
25.6.2.	4	65,375
25.6.3.	4	60,0
25.6.6.	3	53,3333
25.6.7.	3	65,8333
25.6.8.	3	72,8333
25.6.9.	4	61,375
7.5.1.	4	45,625
7.5.10.	4	69,0
7.5.2.	4	43,625
7.5.3.	4	87,25
7.5.4.	4	69,0
7.5.5.	4	52,875
7.5.6.	2	48,75
7.5.7.	4	98,375
7.5.8.	3	66,6667
7.5.9.	2	48,25
AFO 541	2	78,0

Tabulka č. G13 – Kruskal-Wallisův test významnosti jednotlivých linií; Test statistic = 17,1171 P-Value = 0,971143

Linie	Sample Size	n<=	n>	Median	95,0 % lower CL	95,0 % upper CL
12.5.1.	3	2	1	-3,3673		
12.5.10.	4	2	2	-2,29452		
12.5.2.	4	2	2	-2,17109		
12.5.4.	4	2	2	-2,24663		
12.5.7.	4	3	1	-2,35669		
16.6.1.	6	4	2	-2,34068		
16.6.2.	8	3	5	-2,04717		
16.6.3.	6	2	4	-1,98326		
16.6.4.	9	4	5	-1,94591	-3,03674	-1,08335
16.6.5.	4	1	3	-1,94478		
16.6.7.	4	2	2	-1,98041		
16.6.8.	4	3	1	-2,257		
16.6.9.	4	2	2	-2,46051		
25.6.10.	4	1	3	-1,65294		
25.6.2.	4	2	2	-2,15245		
25.6.3.	4	2	2	-2,20907		
25.6.6.	3	2	1	-2,70805		
25.6.7.	3	2	1	-2,32728		
25.6.8.	3	1	2	-1,79176		
25.6.9.	4	2	2	-2,12647		
7.5.1.	4	2	2	-2,52858		
7.5.10.	4	2	2	-2,02963		
7.5.2.	4	3	1	-2,72145		
7.5.3.	4	1	3	-1,70606		
7.5.4.	4	2	2	-1,99449		
7.5.5.	4	2	2	-2,29945		
7.5.6.	2	2	0	-2,43725		
7.5.7.	4	1	3	-1,55304		
7.5.8.	3	2	1	-2,3979		
7.5.9.	2	1	1	-2,5438		
AFO 541	2	1	1	-1,97321		

Tabulka č. G14 – Moodyho Mediánový test významnosti rozdílu mediánů pro jednotlivé
linie; Test statistic = 12,6111 P-Value = 0,997765

12.5. Obrázková příloha



Obrázek č. O1 - Izolace embrya ze semene (Flow-box)



Zbytek semene po vypreparování embrya

Vypreparované embryo na médiu

Obrázek č. O2 – Iniciace; preparace embrya - primární explantát



Obrázek č. O3 - Stojan s kulturami v kultivační místnosti



Obrázek č. O4 – Iniciace ESM; primární explantát po 3 týdnech kultivace na GD1 médiu
(Detail - pletivo vznikající ze zóny 2 je ESM)



Obrázek č. O5 – Proliferace; Embryogenní linie 12.5.1.
(ESM po 4 týdnech kultivace na médiu LP4)



Obrázek č. O6 – Proliferace; Embryogenní linie 12.5.1.

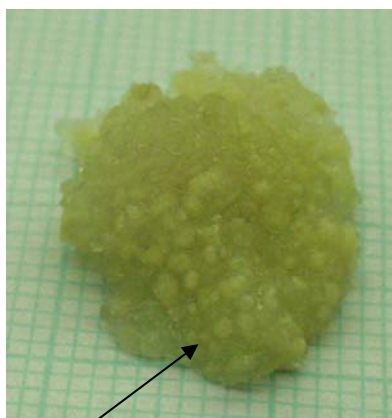
Detail - pletivo je průsvitné, bílé konzistentní s jemnou vláknitou strukturou



Obrázek č. O7 - Proliferace ESM; linie 7.5.1. na LP1 médiu – týden 0 (velikost 10 mm²)

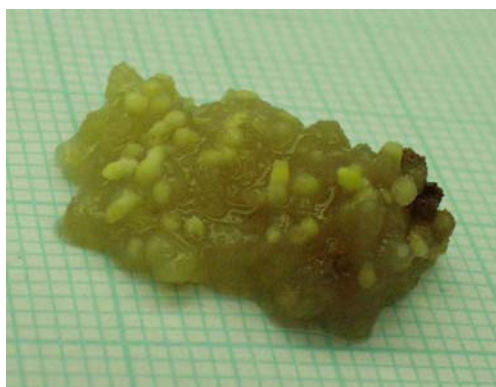


Obrázek č. O8 - Proliferace ESM; linie 7.5.1. na LP1 médiu - kultivace po 8 týdnech
(velikost 168 mm²)



Obrázek č. O9 – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 2 týdnech na médiu LP7

Zrající embrya vystupují nad povrch kultury



Obrázek č. O10 – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 3 týdnech na médiu LP7

Jasně zřetelná embrya se začínají formovat, jejich vnitřní struktura se diferencuje



Obrázek č. O11 – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 4 týdnech na médiu LP7

Embrya s formující se základy děloh a kořenového části



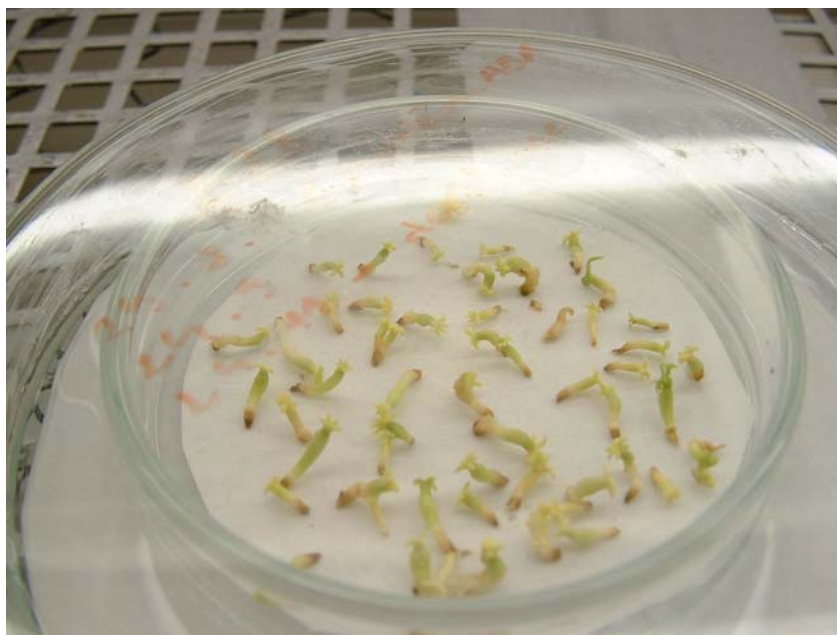
Obrázek č. O12a - Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 6 týdnech na médiu LP7

Dobře formovaná zralá embrya



Obrázek č. O12b – Maturace; linie 16.6.3. kultivace po 6 týdnech na médiu LP7

Detail – na styku kultury s médiem dochází k pozdnímu dozrávání embryí, jsou patrna embrya v jiném stupni morfologického uspořádání než média uprostřed kultury



Obrázek č. O13a -Desikace; linie 16.6.3. embrya jsou připravena k desikaci umístěná na Petriho miskách; Embrya mají zřetelně vyvinutý kořenový meristém a dělohy



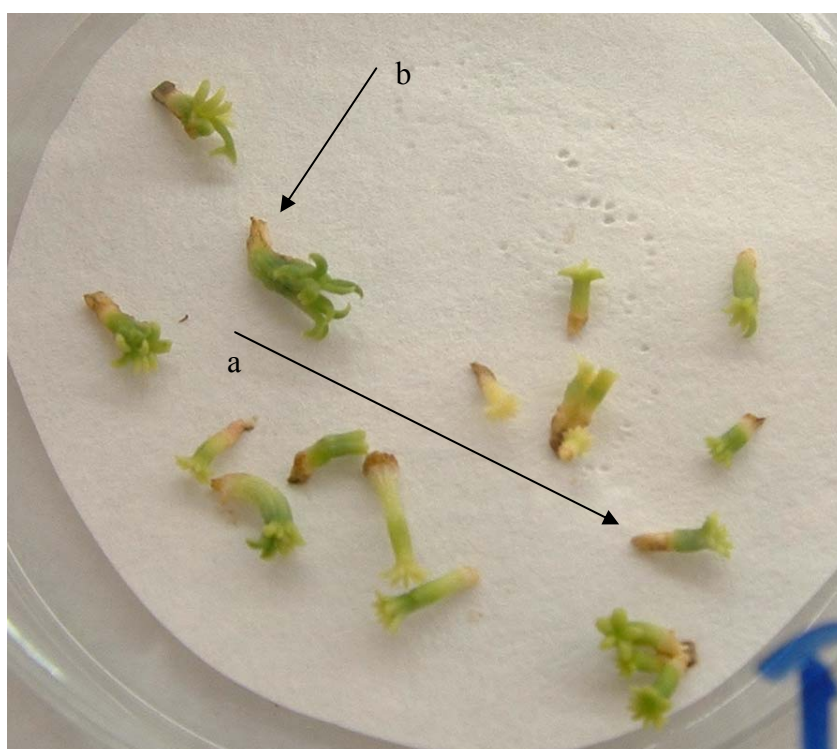
Obrázek č. O13b – Desikace; linie 16.6.3. formující se klíčící rostliny

Detail – 1 týden vývoje embryí, je patrný vývoj kořenové části



Obrázek č. O14 – Desikace; linie 16.6.3. formující se klíčící rostliny

Embrya mají velmi rozdílnou růstovou dynamiku; jsou zde vidět dobře se vyvíjejících rostliny i abnormálně klíčící embrya po 3 týdnech kultivace



Obrázek č. O14 – Desikace; linie 16.6.3. formující se klíčící rostliny

Detail – a. normálně klíčící embryo, b. abnormálně klíčící embryo



Obrázek č. O15 – Germinace; linie 16.6.3. kultivace na médiu LP10

Detail – dobře formovaná klíčící rostlina



Obrázek č. O16 – Germinace; linie 12.5.10. formující se klíčící rostliny na médiu $\frac{1}{2}$ GD6

Detail - etiolizovaná embrya



Obrázek č. O17 – Germinace; linie 12.5.10. formující se klíčící rostliny na médiu $\frac{1}{2}$ GD6

Dobře se vyvíjející klíčící rostliny



Obrázek č. O18 – Germinace; linie 12.5.10 na médiu LP10

Detail – normálně klíčící somatická embrya



Obrázek č. O18 - Germinace; linie 12.5.10 na médiu ½ GD6

Detail – normálně klíčící somatická embrya



Obrázek č. O18 – Germinace; linie 16.6.1. abnormálně se vyvíjející embrya



Obrázek č. O19 - Germinace; linie 12.5.10 na médiu LP10



Obrázek č. O19 – Konverze; dobře formovaná klíčící rostlina připravená na kultivaci *ex vitro*