

Somatická embryogeneze jehličnanů



Ústav experimentální
botaniky AV ČR, v. v. i.



Akademie věd
České republiky

věda 39
kolem
nás
co to je...

Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky, v. v. i., (ÚEB) byl založen v roce 1962, kdy se osamostatnila část Biologického ústavu ČSAV se zaměřením na fyziologii rostlin. Jak již napovídá název ústavu, ÚEB se zabývá výzkumem biologie rostlin za využití experimentálních přístupů. Rostliny se v ÚEB studují na různých úrovních: od rostlinné buňky či genomu přes rostlinná pletiva nebo orgány až po rostliny a rostlinná společenstva v interakci s jejich prostředím.

Posláním ÚEB je provádět kvalitní základní výzkum, který ale v mnoha případech přechází v prakticky zaměřené bádání. Publikace v prestižních vědeckých časopisech jsou tak doplňovány mezinárodními patenty a šlechtitelskými osvědčeními nových rostlinných odrůd. V laboratořích ÚEB potkáte množství studentů z pražských i olomouckých vysokých škol, stejně tak často ale zaslechnete také angličtinu či španělštinu vědců z různých částí světa. Někteří z nich u nás pracují dlouhodobě, jiní jen po dobu omezenou získaným stipendiem či studijním pobytům.

Pracoviště ÚEB se nacházejí v Praze-Lysolajích, Praze-Krči a v Olomouci. Špičková olomoucká pracoviště jsou také součástí Centra regionu Haná pro zemědělský a biotechnologický výzkum. Olomoučtí kolegové se zabývají analýzou genetické informace více druhů rostlin, pro což vyvinuli převratnou unikátní metodu umožňující „čtení“ rozsáhlých genomů (např. pšenice). Tato metoda je založena na tom, že nejprve jsou roztrženy jednotlivé chromozomy – dědičná informace, obsažená v určitém chromozómu již představuje zvládnutelný objem pro vlastní čtení. V Olomouci se dále věnují i výzkumu rostlinných hormonů (především cytokininů a brasinosteroidů). Součástí tohoto výzkumu je i analytické pracoviště, které dokáže stanovit nesmírně nízké koncentrace těchto látek již i na úrovni jednotlivých buněk. Na výzkumu rostlinných cytokininů lze demonstrovat půvab a určitou nevyzpytatelnost vědy, neboť studium hormonů rostlin přineslo trochu nečekaný významný objev nových látek s cytostatickým (protirakovinným) účinkem, které by mohly být velmi významné při výrobě nových účinných léčiv.

Pražské laboratoře se specializují na studium transportu rostlinného hormonu auxinu na buněčné úrovni, což vedlo k objasnění molekulární funkce přenašečů auxinu ven z buňky. Auxin ovšem není jediným studovaným hormonem, vědci v ÚEB se věnují i metabolismu cytokininů a kyseliny abscisové. Významných výsledků bylo v ÚEB dosaženo v oboru regulace růstu a signálních molekul rostlinných buněk, především řízení polarity klíčové pro růst pylové láčky a kořenových vlásků. Dále pak pražští kolegové studují odpověď rostlin vystavených stresovým podmínkám či po jejich napadení viry, bakteriálními a houbovými chorobami. Součástí ÚEB je i laboratoř, která studuje somatickou embryogenezi jehličnanů. V jiné laboratoři využívají výsledky svého základního výzkumu získané při studiu odezvy rostlin na stres způsobený xenobiotiky pro ochranu životního prostředí pomocí tzv. fytořemediací. Některé ze získaných výsledků jsou již využívány v praxi. Základní výzkum je někdy přímo spojen s výzkumem aplikovaným: důležitým týmem v ÚEB je skupina, která se zabývá šlechtěním jabloní odolných vůči chorobám, především proti strupovitosti. Produktem jejich výzkumu je několik desítek nových odrůd jabloní, které jsou registrované a právně chráněné v mnoha zemích světa. Ústav experimentální botaniky prodává pěstitelům po celém světě licence na množení těchto odrůd. Ročně se tak na základě těchto licencí vypěstuje a prodá více než 1,2 milionu jabloní.

Jak probíhá somatická embryogeneze jehličnanů?

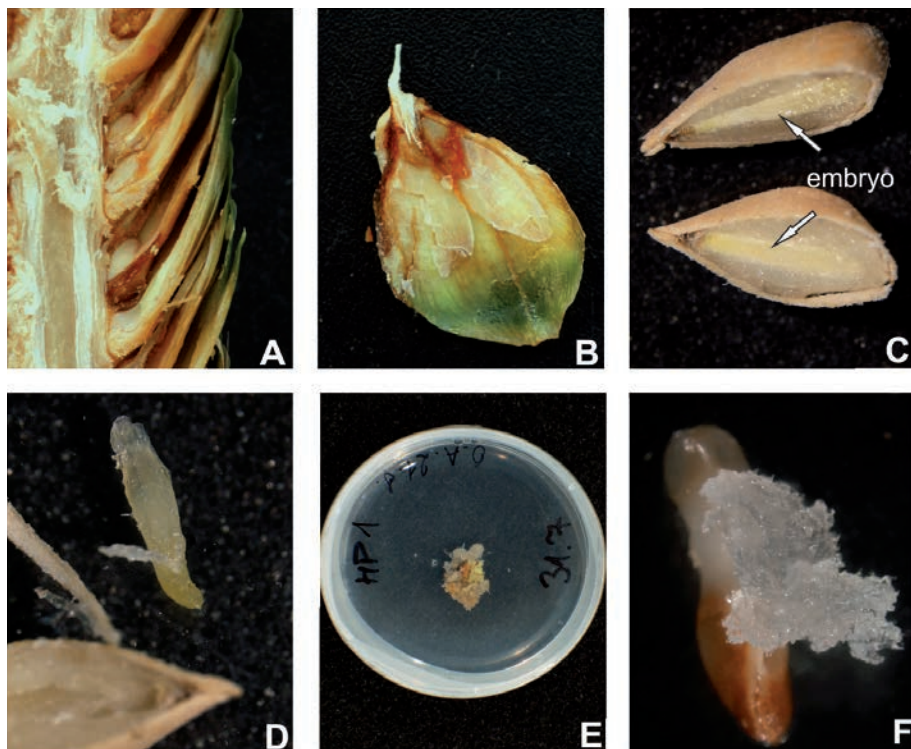
Proces somatické embryogeneze jehličnanů byl poprvé popsán v roce 1985 Václavem Chalupou (Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Communicationes Institutii Forestalis Cechoslovaca* 14: 65–90, 1985) a nezávisle na něm i Inger Hakmanovou a Sarou von Arnold (Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *Journal of Plant Physiology* 12: 149–158, 1985). Celý proces probíhá v *in vitro* podmínkách (tj. sterilně ve skle) a skládá se z pěti základních kroků – indukce (odvození) embryogenní kultury, její proliferace (zmnožení), maturace (zrání) somatických embryí, desikace a klíčení. Úspěch procesu somatické embryogeneze je dán kvalitou odvozené embryogenní linie. Ta je určena její schopností vytvářet raná somatická embrya, výnosem, tj. počtem a kvalitou zralých somatických embryí, a schopností embryí klíčit, tj. poskytnout kvalitní klíčící rostliny s dobře vyvinutým kořenovým systémem i nadzemní částí rostliny, které jsou schopné po převedení *ex vitro* (tj. do nesterilních kultivačních podmínek, např. do skleníku) pokračovat ve vývoji až do stadia vzrostlých stromů. Úspěch celého procesu závisí jednak na použitém výchozím materiálu, jednak na přesném dodržování optimálních podmínek nutných pro každý jednotlivý krok somatické embryogeneze.

Řízení procesu somatické embryogeneze

Základním principem somatické embryogeneze je tedy získání embryogenní kultury a následně její kultivace *in vitro* na přesně definovaných médiích, jejichž složení určuje (řídí) další vývoj somatických embryí. Embryogenní kultury jehličnanů jsou kultivovány na médiích, která se do určité míry liší složením nebo obsahem minerálních i organických látek. Bývají často označována zkratkami vycházejícími většinou ze jmen autorů, kteří složení média po optimalizaci poprvé publikovali; např. pro kultivace smrkových kultur jsou používána média GD (podle práce Gupty a Durzana z roku 1986) nebo Litvay (podle práce Litvay a další, 1981), pro kultury jedlí jsou častější MS (podle práce Murashige a Skooga z roku 1962), popř. SH média (podle práce Shenka a Hildebrandta z roku 1972) atd. Důležitou složkou média jsou cukry, z nichž se nejčastěji používá sacharóza. Některé embryogenní kultury jsou k zásobení cukry citlivější – např. embrya jedlí dozrávají lépe na médiích s obsahem maltózy, popř. laktózy. Také zvýšený obsah organické složky média (zejména glutaminu a kaseinu) tomuto procesu napomáhá. Pro zrání embryí smrků však tyto látky tak významné nejsou. Pro kultivace se většinou používají pevná média ztužená agarem, ale také syntetickým phytagelem nebo gelitem. Kultivace probíhá přímo na médiu, popř. na filtračním papíru položeném na médiu, v Petriho miskách nebo v plastových kultivačních miskách Magenta apod. Embryogenní kulturu lze kultivovat i v tekutém médiu, problémem však je nutnost ho provzdušňovat. K tomu se běžně používají třepačky, avšak embryogenní kultura má specifickou strukturu, a je proto k jakékoliv manipulaci velmi citlivá, je snadno zranitelná. Zpravidla nastávají situace, kdy je provzdušnění dostatečné, ale kultura v důsledku intenzivního protřepávání ztrácí svůj embryogenní charakter, protože se raná embrya rozpadají, nebo je provzdušňování šetrnější, avšak kultura nepokračuje

ve vývoji v důsledku nedostatečného přístupu vzduchu. Řešením může být použití kultivace v pozvolna se otáčejících baňkách, avšak i v tomto nejšetrnějším systému je možné kultivovat kultury jen po určité dobu a poté je nutné je vrátit na pevné médium. Ke zrání embryí dochází v tomto systému v tekutém médiu jen výjimečně. Embrya mohou dozrávat na tekutém médiu pouze v případech, že jsou uložena na prámcích, které na médiu plavou, a embryogenní kultura s embryi je tudíž částečně na vzduchu a zároveň není stresována manipulací při provzdušňování ani při přesazování na čerstvé médium.

Včasné ověření optimálních podmínek pro vývoj somatických embryí je nutné pro každý materiál připravený pro experimentální práci. Složení minerálních a organických látek v médiu i způsob kultivace jsou důležitými podmínkami dobrého výnosu i dobré kvality embryí. Nejsou však podmínkou určující. Vývoj embryogenní kultury a zrání somatických embryí jsou řízeny především fytohormony. Změny



Obr. 1 Indukce embryogenní kultury smrku

A - řez šiškou smrku, semena uložena pod šupinami

B - šupina se dvěma semeny

C - podélný řez semenem (a embryem)

D - embryo vyjmuté ze semene

E - kultivace embrya na médiu v Petriho misce, stav po 2 týdnech

F - vznik bílé vláknité embryogenní kultury, která vyrůstá přímo z původního zygotického embrya

fytohormonálního složení média vyvolávají změny ve vývoji somatických embryí a umožňují tak časovat proces somatické embryogeneze. V řízení somatické embryogeneze se uplatňují především cytokininy, auxiny a kyselina abscisová. Cytokininy, nejčastěji benzylaminopurin (BAP), popř. kinetin (kin), jsou nutnou součástí média v počátečních stádiích somatické embryogeneze, podmiňují vznik embryogenní kultury a také její proliferaci, tj. opakující se tvorbu (multiplikaci) raných somatických embryí. Pro mnoho embryogenních linií jehličnanů je v počátečních fázích somatické embryogeneze nutná také přítomnost auxinu. Většinou bývá jako auxin používána kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D). V některých případech byly úspěšně použity i další auxiny, např. kyselina naftyloctová (NAA), ale užití 2,4-D je v somatické embryogenezi nejběžnější. Pro smrkové embryogenní kultury je přítomnost 2,4-D nezbytná v období proliferace; pokud není auxin přítomen, kultura se vyvíjí pomalu a poskytuje méně kvalitní raná somatická embrya. Některé embryogenní kultury jedlí naopak vytvářejí raná somatická embrya lépe na médiích bez auxinu – např. kultury *Abies nordmanniana*; naproti tomu např. kultury *Abies alba* reagují na přítomnost 2,4-D stejně jako kultury smrkové. Platí tedy, že pro každou odvozenou embryogenní kulturu je potřeba ověřit také optimální fytohormonální složení média pro optimální průběh procesu somatické embryogeneze. Dalším klíčovým fytohormonem somatické embryogeneze je kyselina abscisová (ABA). Tento fytohormon umožňuje a podmiňuje pokračování vývoje raných somatických embryí. Obvykle jsou embryogenní kultury před aplikací ABA kultivovány asi týden na médiu zcela bez fytohormonů a potom přesazeny na médium, v němž je ABA jediným fytohormonem. Tato fytohormonální změna způsobuje, že ustává obnova raných embryí, která byla podmiňována přítomností cytokininů a popř. auxinu, a stávající raná embrya nezanikají, ale pokračují ve vývoji – zrají. Přítomnost ABA v médiu je důležitá až do doby, kdy jsou embrya zralá, protože její přítomnost brání obnovení procesu proliferace, který je v tomto období nežádoucí. Další vývoj embryí už probíhá bez fytohormonů v médiu.

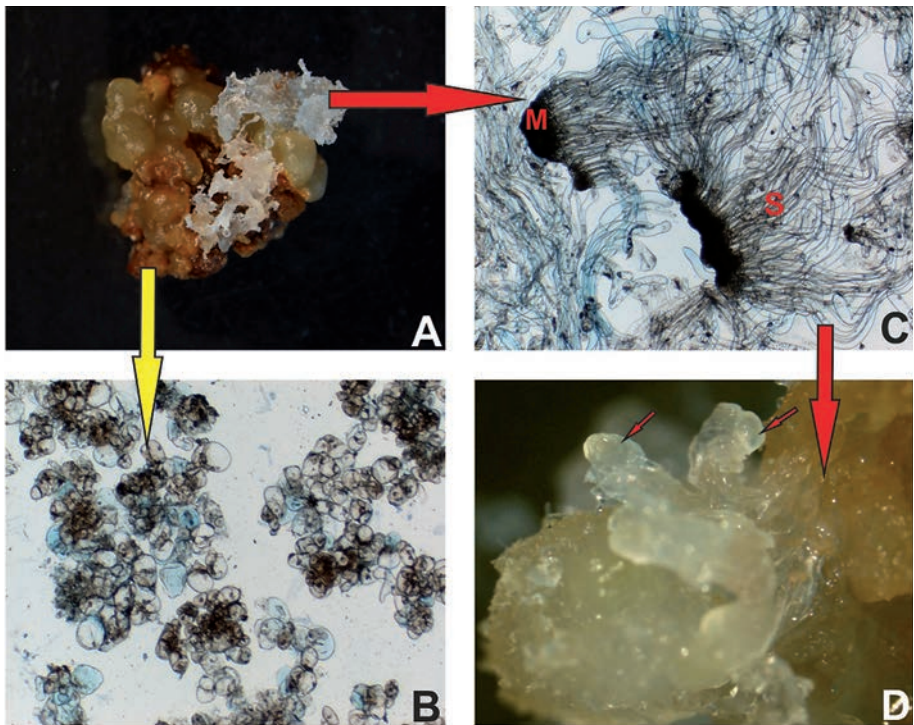
V průběhu vývoje somatických embryí se mění také endogenní hladina fytohormonů. Ta je ovlivněna nejen obsahem fytohormonů v médiu, ale odpovídá i vývojevým změnám somatických embryí. Obsah cytokininů v embryích v průběhu celého procesu somatické embryogeneze kolísá na poměrně nízké úrovni (většinou se pohybuje v desítkách až stovkách pmol/g sušiny), k nárůstu obsahu cytokininů obvykle dochází až na konci procesu somatické embryogeneze, tj. zejména při klíčení. V průběhu vývoje embrya se mění také kvalitativní složení cytokininů přítomných v embryích v jednotlivých fázích embryogeneze. Zásadní jsou změny v obsahu nativního auxinu – kyseliny indolyl-3-octové (IAA) v embryích. Na médiích s 2,4-D je většinou obsah IAA v embryích vyšší než na médiích bez této látky. Endogenní hladina IAA dosahuje v somatických embryích maxima (v tisících pmol/g sušiny) v době, kdy dochází k jejich polarizaci – tj. v době, kdy se tvoří apikální a kořenový meristém; k dalšímu nárůstu dochází až v době klíčení embryí. Endogenní hladina ABA je vysoká (stovky nmol/g sušiny) po celou dobu zrání, protože také obsah ABA v médiu je hodně vysoký (20 μ M). K poklesu hladiny endogenní ABA dochází až ke konci zrání embryí a v následných fázích embryogeneze probíhajících bez přítomnosti fytohormonů. Obecně lze shrnout, že pro řízení průběhu procesu somatické embryogeneze je nutný zejména vliv cytokininů při získávání embryogenní kultury, omezení vlivu auxinu

před zahájením zrání embryí pomocí působení ABA a zejména snížení hladiny ABA před klíčením embryí, protože vysoká hladina ABA klíčení inhibuje.

■ Základní kroky v procesu somatické embryogeneze

Indukce embryogenní kultury

Prvním krokem somatické embryogeneze je odvození embryogenní kultury, která se má stát zdrojem somatických embryí (obr. 1). Nejčastěji se jako výchozí materiál používají nezralá zygotická embrya, i když se už podařilo získat kulturu např. i z meristémů klíčících rostlin. Nejlepšího výnosu embryogenních kultur při indukci lze dosáhnout z nezralých embryí odebraných ze semen šišek sbíraných na konci června a na začátku července. Zelené šišky je třeba dobře omýt, vyloupat z nich semena, která je nutné sterilizovat, např. roztokem přípravku SAVO nebo



Obr. 2 Vznik kalusu a embryogenní kultury smrku

A - mateřský explantát = zygotické embryo s vyvíjejícím se kalusem i embryogenní kulturou po 3 týdnech kultivace

B - struktura kalusu, stejnocenné kulovité buňky, barvení trypanovou modří (TM)

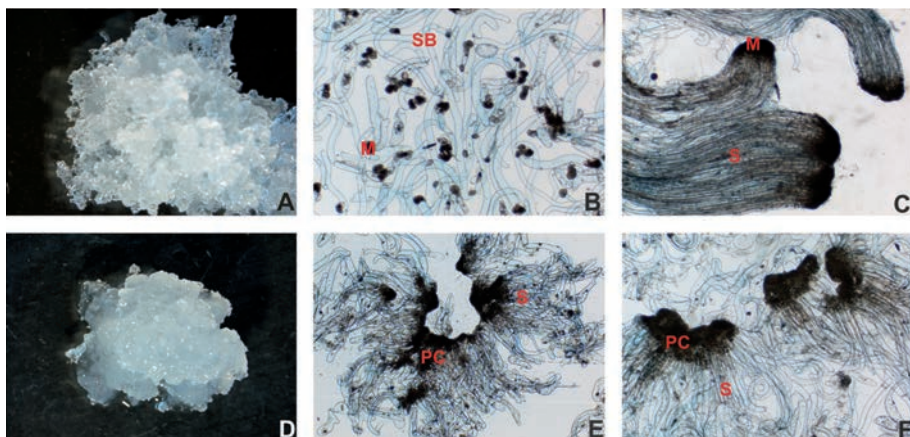
C - struktura embryogenní kultury - je vždy tvořena malými meristematickými a dlouhými suspenzorovými buňkami, které vytvářejí raná somatická embrya nebo polyembryogenní komplexy (TM)

(M = meristematická embryonální hlava, S = suspenzor tvořený vláknitými suspenzorovými buňkami)
D - nezralá somatická embrya (označená šipkami)

jiným sterilizačním činidlem. Další práce už probíhá ve sterilních podmínkách. Semena je nakonec třeba dobře omýt sterilní vodou a potom je možné z nich ve sterilním prostředí laminárního boxu odebírat embrya. Ta jsou často tak malá, že je nutné použít k jejich získání binokulární lupu. Celá izolovaná embrya nebo jejich části jsou pak uloženy na pevné agarové médium do malých Petriho misek, vždy jedno embryo do jedné misky. Optimální chemické složení živného média se liší pro jednotlivé druhy jehličnanů – např. pro indukci embryogenní kultury smrku se používá médium GD se sacharózou a fytohormony 2,4-D a cytokininy; pro jedle je vhodnější médium MS se sacharózou a cytokininy. Petriho misky s embryi jsou uzavřeny parafilmem a uloženy do kultivační místnosti. Kultivace probíhá potmě při teplotě 21–23 °C. Už po dvou týdnech se začínají na některých embryích objevovat nápadná bílá vlákna, která postupně celé embryo překryjí. Bílá vláknitá hmota je už tvořena nezralými somatickými embryi. Při indukci embryogenní kultury může dojít i ke vzniku kalusu – nediferencované tkáně (obr. 2). Nestává se, že by vznik kalusu předcházel vývoji embryogenní kultury, resp. že by z kalusu vznikala embryogenní kultura. Vždy dochází buď ke vzniku embryogenní kultury, nebo ke vzniku kalusu, třeba i na jednom mateřském explantátu. Kultura embryogenní a kalusová se dají snadno odlišit – bílá vlákna jsou pro embryogenní kulturu zcela typická. Kalus naopak bývá většinou kompaktní a má nažloutlou až hnědavou barvu. Rozdíl mezi těmito kulturami je zřetelně vidět ve větším zvětšení pod mikroskopem a pro zlepšení pozorování je vhodné materiál obarvit. Položíme-li malou část nově indukované kultury na podložní sklo, obarvíme kapkou trypanové modři a roztláčíme pod krycím sklem, můžeme po odmytí barvy vodou pozorovat, že je kalus tvořen výhradně jednotlivými kulatými buňkami. Embryogenní kultura je tvořena nezralými somatickými embryi nebo polyembryogenními komplexy, popř. buňkami, které se z nich uvolnily. Každé somatické embryo má meristematickou embryonální hlavu, na kterou nasedá ohon z dlouhých vláknitých suspenzorových, tj. podpůrných a vyživovacích buněk. Správný poměr mezi množstvím suspenzorových a meristematických buněk je zřejmě zásadní pro další vývoj embryí. Z jednotlivých zygotických embryí použitých jako mateřský explantát se vyvíjejí různé embryogenní linie, které se liší morfologicky, tj. uspořádáním nezralých somatických embryí, velikostí i četností polyembryogenních center i dalšími parametry. Ještě větší rozdíly lze nalézt mezi embryogenními kulturami odvozenými od různých druhů jehličnanů (obr. 3).

Proliferace embryogenní kultury

Embryogenní kultura má specifické vlastnosti – při kultivaci zůstává směsí raných somatických embryí, která nepokračují ve vývoji. Dochází k postupnému rozpadu velkých nezralých embryí a polyembryogenních center, zároveň však vznikají nová somatická embrya (a centra), která se zvětšují a ve vývojovém stadiu nezralých embryí se opět rozpadají atd. Tento proces kontinuální obnovy kultury, při němž dochází také k nárůstu embryonální hmoty, se nazývá proliferace embryogenní kultury. V proliferaující kultuře bývají zastoupena nezralá embrya v různém stadiu vývoje (obr. 3) – malá vznikající embrya sestávající jen z několika buněk suspenzorových i meristematických, velká dobře vyvinutá nezralá embrya s velkou meristematickou embryonální hlavou a dobře organizovaným suspenzorem i rozpadávající se embrya s narušenou embryonální hlavou a porušeným suspenzorem; často jsou



Obr. 3 Proliferace embryogenní kultury

A - vláknitá proliferující embryogenní kultura jedle

B - struktura embryogenní kultury jedle (*Abies cephalonica*, linie AR21), drobná raná embrya s jednotlivými dlouhými suspenzorovými buňkami (TM)

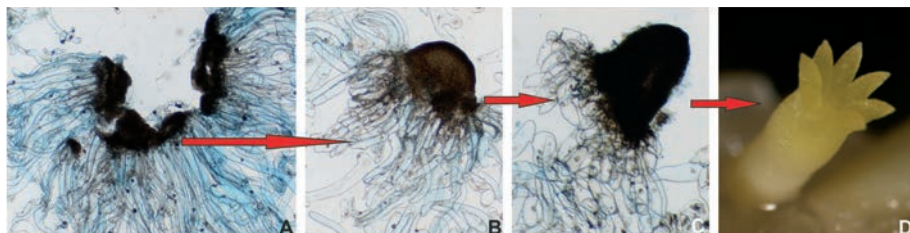
C - struktura embryogenní kultury jedle (*Abies alba*, linie OR 7), raná embrya s menšími embryonálními hlavami a mohutným suspenzorem (TM)

D - proliferující embryogenní kultura smrku

E - struktura embryogenní kultury smrku (*Picea abies*, linie AFO 541), která vytváří dlouhé polyembryogenní komplexy, jednotlivá raná embrya se téměř nevyskytují (TM)

F - struktura embryogenní kultury smrku (*Picea abies*, linie C 110), která vytváří menší polyembryogenní centra s větším meristémem, ze kterého se snadno uvolňují jednotlivá raná embrya (TM)

(M = meristematická embryonální hlava, S = suspenzor, SB = volné suspenzorové buňky, PC = polyembryogenní centrum)



Obrázek 4

Obr. 4 Průběh maturace somatického embrya

A - raná somatická embrya na začátku maturace, kdy se začínají oddělovat z polyembryogenních center (TM)

B - oddělené jednotlivé embryo se zvětšující se embryonální hlavou (1.-2. týden maturace) (TM)

C - embryo s prodlužující se embryonální hlavou a rozpadajícím se suspenzorem (2.-3. týden maturace) (TM)

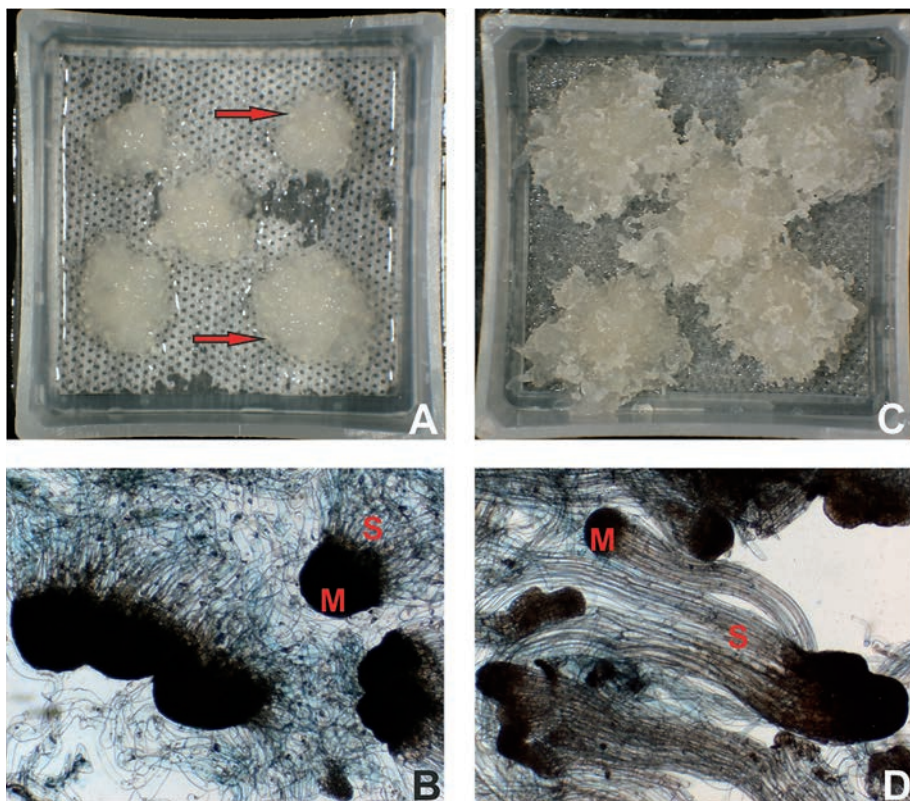
D - zralé kotyledonární somatické embryo s dobře vyvinutými dělohami, které jsou v kruhu kolem apikálního meristému

přítomna i polyembryogenní centra v různém stadiu vývoje a také jednotlivé suspenzorové buňky, které se uvolnily z větších suspenzorů. Pokusy synchronizovat tuto kulturu byly dosud neúspěšné, tj. nepodařilo se zatím získat proliferující embryogenní kulturu, kde by byla všechna nezralá embrya ve stejném stadiu vývoje či rozpadu. To sice vyplývá z celkové povahy procesu proliferace, nicméně to komplikuje experimentální práci, protože při plánování pokusů i jejich vyhodnocení je nutné vždy zohlednit variabilitu proliferující kultury. Při kultivaci je nutné bílé kupky embryogenní kultury pravidelně přesazovat na pevné médium – často stejného minerálního složení jako v indukci, s obsahem sacharózy a zpravidla také s obsahem 2,4-D nebo jiného auxinu a s cytokininy. I v době proliferace jsou kultury kultivovány potmě při teplotě kolem 22 °C. Pokud se při přesazení odstraní vnitřní část kupky, která obsahuje rozpadlé zbytky nezralých embryí, a přesazuje se pouze dobře rostoucí vláknitá část kupky, je možné udržovat embryogenní kulturu v proliferaci hodně dlouho – měsíce i roky. Může tak poskytovat velké množství materiálu, resp. velký počet raných embryí pro další použití. Dynamika proliferace se liší u jednotlivých embryogenních linií i v rámci jednotlivého druhu jehličnanu, i mezi druhově. Platí však bez výjimky, že pokud dojde k chybě při přesazování, kultury se na vyčerpaném médiu rozpadají, tmavnou a nejsou už dále schopny regenerovat.

Maturace somatických embryí

Zrání neboli maturace somatických embryí je zahájena po přesazení proliferující embryogenní kultury na maturační médium, které obsahuje jediný fytohormon – ABA. V důsledku této změny dojde k zastavení proliferace a stávající nezralá embrya se nerozpadnou, ale pokračují ve vývoji až do stadia zralých kotyledonárních embryí, tj. embryí s dobře vyvinutými dělohami (obr. 4). Proces maturace trvá několik týdnů, během této doby je třeba kupky s embryi pravidelně a velmi šetrně přesazovat na čerstvé médium nejen kvůli dobrému zásobení živinami, ale také aby vysoká hladina ABA byla zachována po celou dobu zrání. Pro lepší zrání embryí jedlí je vhodné změnit také zásobení organickými látkami (přidat do maturačního média maltózu namísto sacharózy), ale obecně platí, že přítomnost ABA je pro zrání zásadní. V průběhu maturace je výhodné pěstovat embryogenní kulturu se zrajícími embryi tak, aby byla manipulace s nimi co nejšetrnější. Využívá se kultivace na filtračním papíru položeném na pevném médiu nebo kultivace na prámecích plovoucích po tekutém médiu apod. I zrání embryí probíhá potmě při teplotě kolem 22 °C.

Na počátku maturace dochází ke zvětšování meristematické části embryí a k postupnému oddělování jednotlivých embryí z polyembryogenních center (obr. 5). Meristémy se výrazně prodlužují. V polovině maturace se už embrya začínají polarizovat, tj. začíná se vytvářet kořenový meristém jako základ kořene (radikuly) a na opačném konci embrya meristém apikální jako základ pro vzrostlý vrchol embrya. V tomto období přestává být embryo závislé na suspenzoru, dochází k výrazné redukci suspenzorové části embrya, postupně na kořenové bázi embrya zůstává jen několik suspenzorových buněk. V této době se vytvářejí divivá pletiva a embryo se stává zcela nezávislým na suspenzoru. Koncem maturace se embryo stále prodlužuje, dorůstají dělohy, kterých je zpravidla větší počet, a vytvářejí kruh kolem apikálního meristému. Kvalitní zralé embryo je štíhlé, kompaktní, s dělohami, které většinou začínají zelenat (obr. 4).

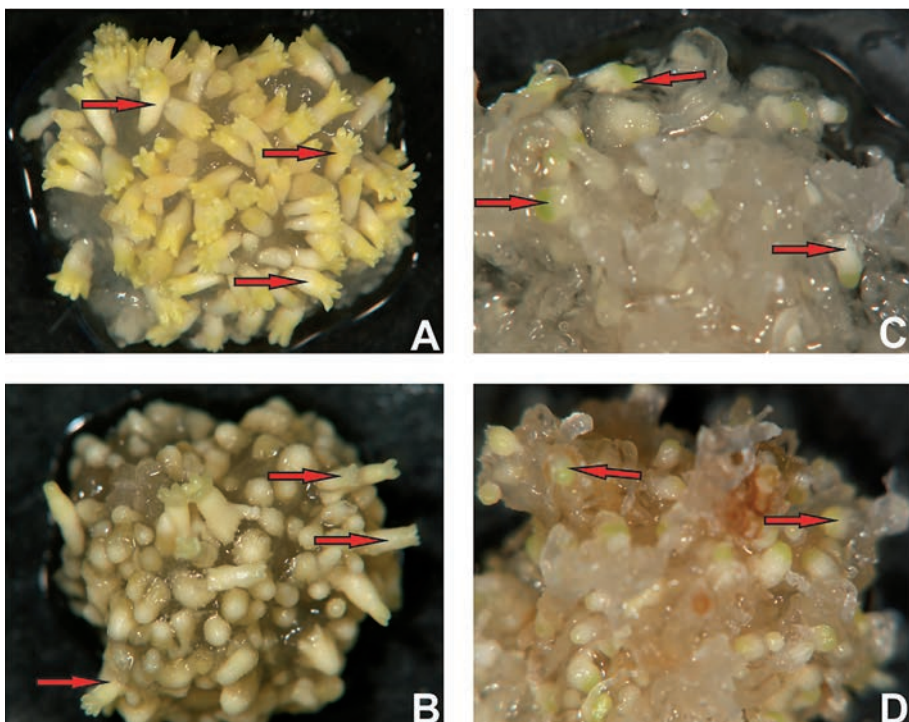


Obr. 5 Embryogenní kultura na prámku po 2 týdnech maturace
 A - 5 kupek maturující embryogenní kultury smrku na prámku, po 2 týdnech maturace začínají být embrya pozorovatelná i pouhým okem (šipky ukazují na zrající embrya)
 B - struktura zrající kultury smrku, zvětšené embryonální hlavy, suspensor je dosud funkční (TM)
 C - 5 kupek maturující embryogenní kultury jedle na prámku, po 2 týdnech maturace zůstává kultura vláknitá, embrya nejsou patrná pouhým okem
 D - struktura zrající kultury jedle, zvětšené embryonální hlavy, suspensor zůstává zachován, oddělování embryí není příliš zřetelné (TM)
 (M = meristematická embryonální hlava, S = suspensor)

Vzhledem k tomu, že do maturace vstupuje proliferující kultura, která obsahuje nezralá embrya v různé fázi vývoje, ukazuje se, že ne všechna z těchto embryí jsou schopna dozrát. Na konci maturace zůstává řada embryí nedovyvinutá, resp. neschopna zrání dokončit. Výnosem maturace je tak jednak určité množství kvalitních embryí (většinou se udává počet embryí na 1g nasazené proliferující embryogenní kultury), jednak embrya kulovitá, malformovaná apod. Výnos embryí i podíl mezi počtem kvalitních a nekvalitních embryí na konci maturace je typický pro každou embryogenní kulturu a může se u jednotlivých embryogenních kultur výrazně lišit (obr. 6). Je proto nutné pečlivě vybírat materiál pro experimentální práci, aby vyhovoval požadavkům, které jsou v daném experimentu zásadní.

Desikace zralých embryí

Většina zralých embryí obtížně klíčí. Úspěšnému klíčení brání zřejmě především vysoký obsah ABA ve zralých embryích, protože celý proces maturace probíhá na médiu s vysokým obsahem tohoto fytohormonu. Ukázalo se, že pokud je mezi zrání a klíčení embryí vložen krok desikace, úspěšnost klíčení se výrazně zlepší. Během desikace jsou jednotlivá zralá embrya položena na suchý filtrační papír a ponechána v prostředí vysoké vlhkosti (až 100 %), nejčastěji jsou otevřené misky s embryi na suchém papíře uloženy do nádoby s vodní lázní (obr. 7). Desikace trvá několik týdnů (nejčastěji 3 týdny), probíhá při teplotě nižší než 20 °C a v podmínkách dlouhého dne. V této době embrya mírně rostou, často jim zelenají dělohy a na bázi kořene se vytváří typický červený proužek. Zároveň dochází k mírnému snížení obsahu vody v embryích. Nejvýznamnějším procesem v průběhu desikace je zřejmě snižování endogenní hladiny ABA v embryích, která klesá v tomto období asi na polovinu. Dochází však i k dalším biochemickým změnám, které podmiňují úspěšné klíčení.



Obr. 6 Zralá somatická embrya na konci maturace

A, B - porovnání výnosu somatických embryí ze 2 různých embryogenních linií smrku; podíl kvalitních embryí (dlouhá embrya s dobře vyvinutými dělohami) se liší - typická kvalitní embrya jsou označena šipkami

C, D - porovnání výnosu somatických embryí ze 2 různých embryogenních linií jedle; maturace jedlí probíhá pomaleji, zralá embrya mají většinou zachován suspenzor, dělohy nejsou vyvinuty tak dokonale jako u smrků - typická embrya jsou označena šipkami



**pěstování
stromků**

Somatic



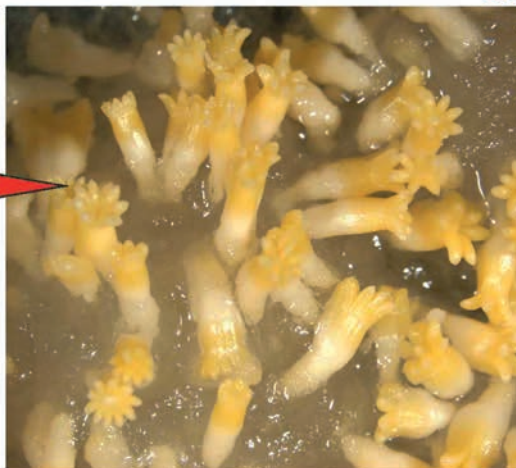
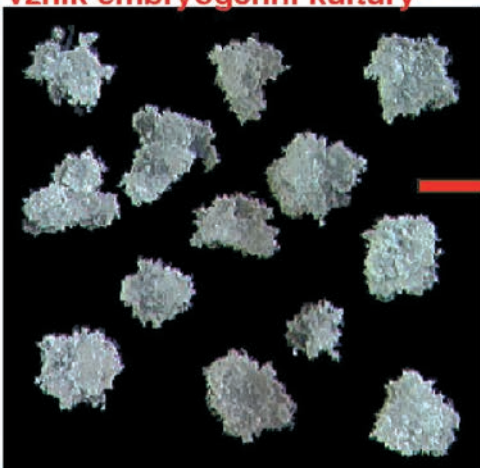
sběr šišek



**nezralé somatické
embryo**

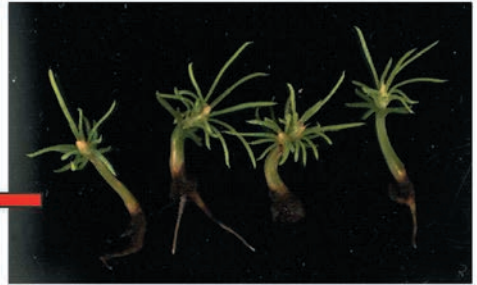
vznik embryonální kultury

zr

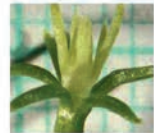
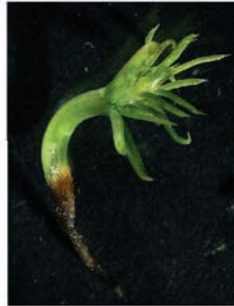




převádění rostlin „ex vitro“



klíčení



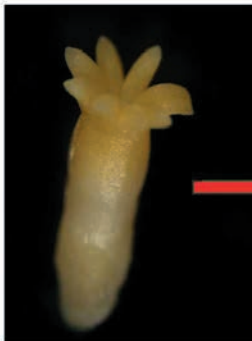
odrůstající pupen

vzrostlý vrchol

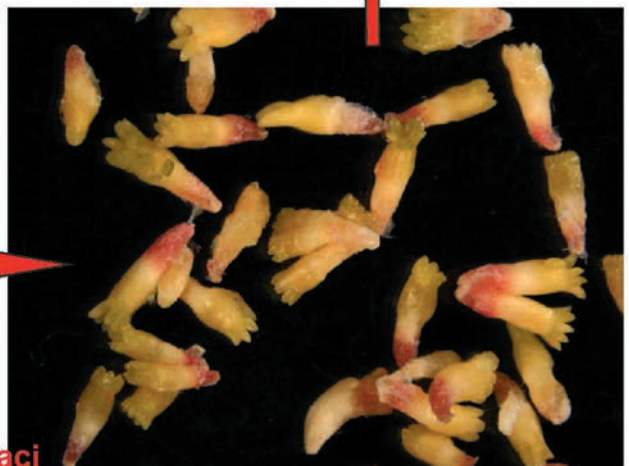


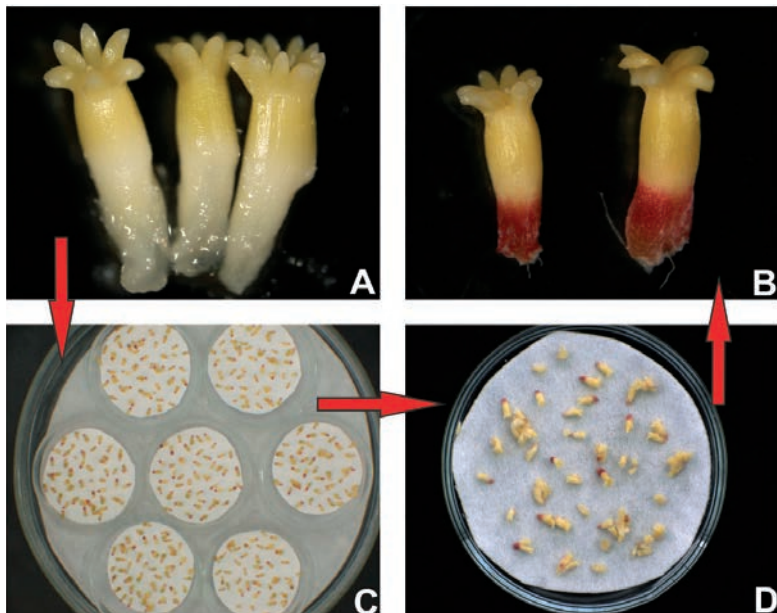
**klíčková embryogeneze
jehličnanů**

malá somatická embrya



embrya v desikaci





Obr. 7 Desikace somatických embryí

A - zralá somatická embrya smrku na počátku desikace

B - desikovaná somatická embrya smrku na konci desikace

C - embrya na suchém papíru v malých Petriho miskách ve vodní lázni (ve velké Petriho misce na papíru zalitým vodou) během desikace

D - detail Petriho misky s desikovanými embryi

Klíčení

Desikovaná embrya klíčí na pevném médiu se sníženým obsahem minerálních látek a nízkým obsahem sacharózy, zcela bez fytohormonů. Do média se přidává aktivní uhlí, které může jednak absorbovat látky uvolňované embryem do média, jednak umožňuje kořenům růst potmě. Světlo obvykle inhibuje růst i zakládání kořenů, proto je zatemnění kořenů pro další vývoj klíčící rostliny důležité. Klíčení probíhá v podmínkách dlouhého dne při teplotě kolem 20 °C. Během 2–3 týdnů začíná růst hlavní kořen, klíčící rostlina roste a dělohy jsou výrazně zelené. Apikální meristém zůstává plochý, bez morfologických změn. Teprve po dalších týdnech klíčení začíná vývoj nadzemní části klíčící rostliny. Apikální meristém se zvětšuje, prodlužuje a začínají se zakládat listy – jehlice, které vytvářejí zelený trs nad dělohami. Postupně se apikální meristém dluží, vzniká olistěný stoněk a dělohy začínají žloutnout. Tohoto stadia klíčící rostlina dosáhne po několika (2–3) měsících klíčení (obr. 8).

Dobře vyvinuté rostliny je možné převést *ex vitro*, tj. začít je pěstovat nesterilně v půdě. Často se klíčící rostliny vysazují do rašelinových tablet, ty jsou umístěny do skleníků s vysokou vzdušnou vlhkostí, rostliny se postupně otužují a přivykají nižší vlhkosti, než byla v *in vitro* systému. Takto připravené a dobře rostoucí rostliny je potom možné vysazovat ven a dál je pěstovat stejně jako semenáčky.

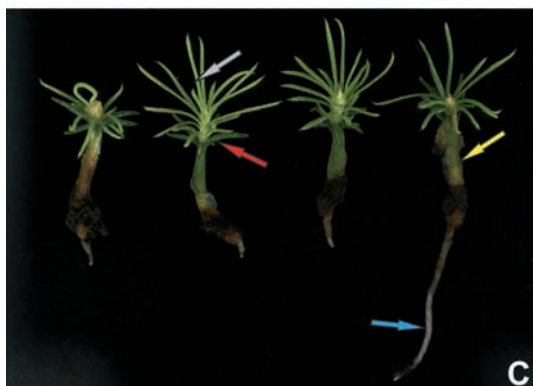
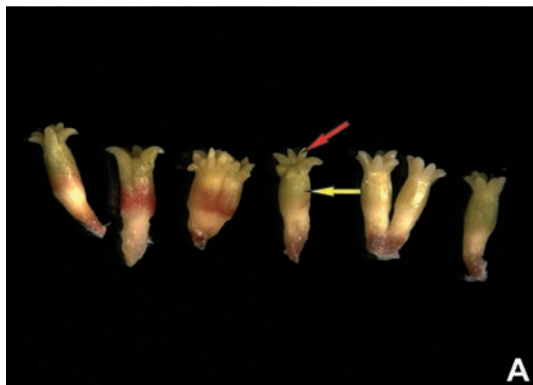
Vliv nepříznivých podmínek (stresu) na průběh somatické embryogeneze

V průběhu somatické embryogeneze mohou být somatická embrya stejně jako embryogenní kultura vystavena působení nepříznivých vnějších podmínek, které mohou ovlivnit další vývoj embryí nebo velikost výnosu. Působení sucha v desikaci je dokonce jedním z důležitých kroků procesu somatické embryogeneze. Vliv vnějších podmínek je možné charakterizovat pomocí změn v obsahu polyaminů (PA), které bývají někdy také řazeny do skupiny rostlinných hormonů. Jsou to látky se širokým spektrem účinků. Společně s ostatními fytohormony regulují různé morfogenní procesy, účastní se regulace dlužení buněk a tvorby buněčné stěny, mezibuněčného přenosu signálů a uplatňují se i v embryogenezi. Jde o malé molekuly s několika aminoskupinami. Mohou se vyskytovat volně nebo v konjugované formě, byly detekovány v buněčné stěně, vakuolách, mitochondriích, chloroplastech i v cytoplazmě. V rostlinách jsou zastoupeny především diamin putrescin (Put), triamin spermidin (Spd) a tetraamin spermin (Spm). Jejich hladina se zvyšuje nejen v době intenzivního růstu, ale především v odpovědi na stresové podmínky. První reakcí rostliny ve stresu je zvýšená produkce a ukládání reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou být pro rostlinu škodlivé, a PA fungují jako výkonné antioxidanty. Změny jejich obsahu mohou tedy fungovat jako ukazatel míry poškození rostliny nebo embrya stresem.

Jestliže somatická embryogeneze probíhá v optimálních podmínkách, zvyšuje se nejvíce celkový obsah volných PA během zrání embryí, nižší je během desikace a stoupá znovu při klíčení. Podíl jednotlivých PA v celkovém obsahu se ale liší, Put je nejvíce zastoupen na konci maturace, Spm stoupá nejvýrazněji při klíčení, koncentrace Spd je ve všech fázích somatické embryogeneze nejvyšší a podílí se nejvíce na celkovém obsahu PA. Pro optimální charakteristiku stavu PA v embryích v různé fázi somatické embryogeneze se proto nejčastěji užívá poměr mezi obsahem Spd a Put. Při optimálním průběhu somatické embryogeneze tento poměr roste téměř exponenciálně až do konce desikace a během klíčení mírně klesá. Pokud je při měření obsahu PA zjištěn jiný průběh změn v poměru Spd/Put, je zřejmé, že byla embryogenní kultura vystavena stresovým podmínkám, se kterými se vyrovnávala prostřednictvím změn v obsahu PA.

Jak lze embryogenní kultury uchovávat?

Embryogenní kultury mohou být uchovávány ve stadiu proliferace. Problémem je však nutnost pravidelného ošetřování kultur, protože podmínkou jejich dobrého fyziologického stavu je správné přesazování kultury v optimálním časovém intervalu na optimální médium. Je proto potřeba pokusit se uchovávat kultury jinak, nejlépe ve stabilizovaném stavu, aby mohla být manipulace s uskladněnou kulturou minimální. Navíc je třeba počítat s tím, že každá embryogenní kultura stárne a její schopnost proliferace (i maturace) se snižuje. Zároveň se tak snižuje i výnos zralých somatických embryí. Rychlost stárnutí se liší nejen u embryogenních kultur odvozených od různých druhů jehličnanů, ale i u jednotlivých embryogenních linií jednoho druhu. Velmi rychle stárnou např. embryogenní kultury borovice, jejich schopnost vytvářet dobře vyvinutá embrya mizí už v prvním roce po indukci. Naopak u některých embryogenních



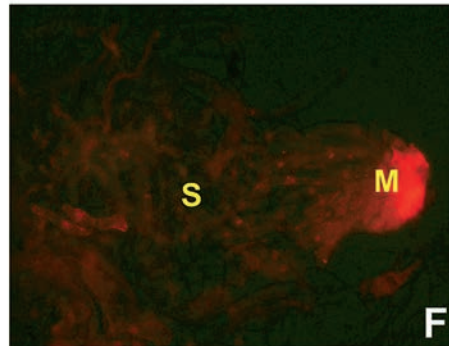
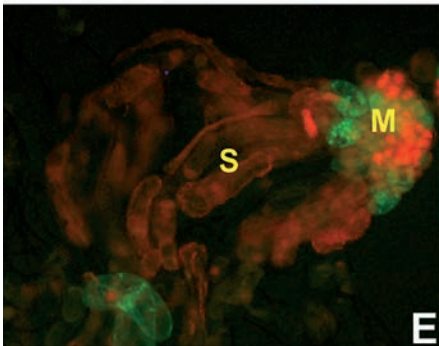
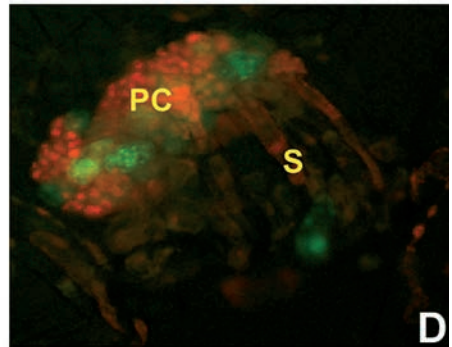
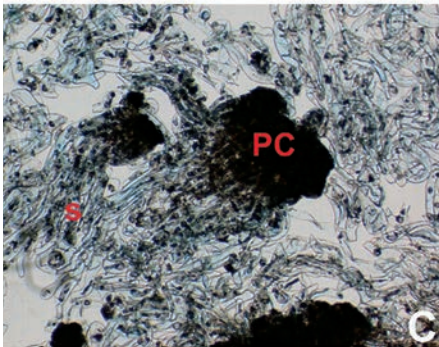
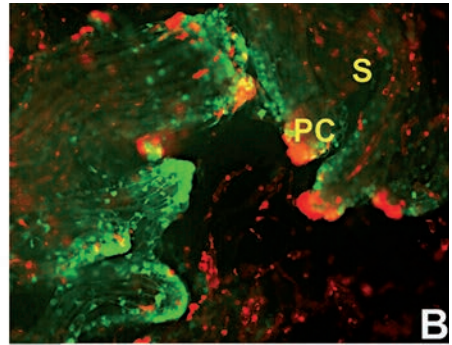
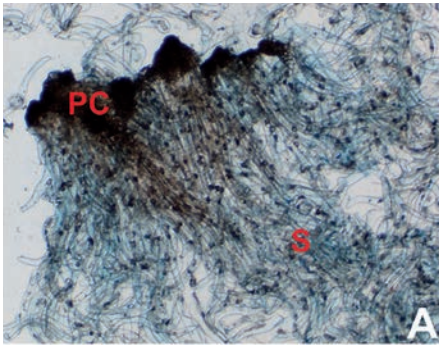
Obr. 8 Klíčící somatická embrya smrku
 A - somatická embrya po 3 dnech klíčení
 B - somatická embrya po 3 týdnech klíčení, kdy se začíná vyvíjet kořen
 C - somatická embrya (resp. klíčící rostliny) po 3 měsících klíčení, kdy se tvoří listy a dlouží stoněk
 šipky označují dělohy (červená), hypocotyl (žlutá), kořen (modrá), listy, resp. jehlice (šedá)

linií smrku zůstává tato schopnost zachována i déle než 10 let. I problém se stárnutím embryogenních kultur by měla pomoci řešit vhodná metoda skladování, která by umožnila uchovat embryogenní kultury v optimálním stavu po dlouhou dobu.

Tyto požadavky splňuje metoda kryoprezervace, která se k uchování embryogenních kultur využívá. Jde o šetrné zamrazování proliferujících kultur a jejich

skladování ve speciálních kontejnerech s tekutým dusíkem při teplotě blízké se $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$. K tomu, aby bylo možné kultury zchladit na tak nízkou teplotu a také je po skladování znovu rozmrazit a dál pěstovat, je nutné dodržovat při zamrazování i rozmrazení přesný postup, který zajistí, aby nedošlo k nevratnému poškození živého materiálu. Při zamrazení je hlavním problémem vysoký obsah vody v živých buňkách. Pokud by se při zchlazení uvnitř buňky vytvořily velké krystaly ledu, došlo by k poškození buněčných stěn i buněčných organel. Před zamrazením se proto kultury pěstují v tekutém živném médiu, do kterého se přidávají cukry nebo cukerné alkoholy. Ty se stávají součástí cytoplazmy a zamezují vzniku větších ledových krystalů. Těsně před zamrazením se přidává do média dimethylsulfoxid, který napomáhá optimálnímu průběhu zamrazování. Ošetřený rostlinný materiál je pak pomalu řízeně zamrazován pozvolným snižováním teploty až na $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pak se přenáší do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nakonec jsou nádobky se zmrazeným materiálem uloženy do speciálních držáků a umístěny do kontejneru s tekutým dusíkem. Zde mohou být uloženy měsíce i roky. Materiál je tak stále připraven pro další použití po rozmrazení. To probíhá rychle, vhozením nádobek se zamrazenou kulturou do vlažné vody. Rozmrazený rostlinný materiál je umístěn na filtrační papír položený na živném médiu v Petriho misce. Papír i s embryogenní kulturou je pak několikrát v krátkém (několikahodinovém) intervalu přenášen na čerstvé médium, aby byl z kultury rychle odstraněn dimethylsulfoxid. Regenerace embryogenní kultury potom probíhá na proliferačním médiu potmě při $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Průběh kryoprezervace i regenerace embryogenní kultury lze dobře sledovat, pokud odebraný malý vzorek kultury obarvíme fluoresceindiacetátem (FDA) a propidium jodidem (PI), protože pak můžeme odlišit živé (zelené) a mrtvé (červené) buňky v embryogenní kultuře. FDA prochází cytoplazmatickou membránou, uvnitř buňky je metabolizován na zelený fluorescein, který zůstává uvnitř živé buňky, kde je možné ho detekovat. Naproti tomu PI proniká do buňky jen skrz poškozené cytoplazmatické membrány a uvnitř se váže na nukleové kyseliny. Zde je možné detekovat jeho intenzivní červenou barvu. Míra poškození kultury je tedy dobře patrná jako poměr zelených a červených buněk ve vzorku materiálu. Pro lepší orientaci při popisu anatomických změn, ke kterým v kultuře dochází, je dobré použít ještě další barvení – většinou se používá barvení trypanovou modří. Z porovnání výsledků získaných pomocí různého barvení je zřejmé, že už samotné ošetření kultury před zamrazením poškozuje jak meristematické, tak suspenzorové buňky. Míra poškození se zvyšuje při zamrazování (obr. 9). Nezůstávají žádné živé polyembryogenní komplexy ani celá raná embrya schopná po rozmrazení pokračovat v proliferaci. Těsně po rozmrazení jsou v meristémtech patrné pouze jednotlivé živé buňky, ze kterých regenerují postupně celá raná embrya (obr. 10). Vývoj embrya pak probíhá obdobně jako u embrya zygotického – dochází k polárnímu dělení jednotlivých živých buněk, které dává vzniknout meristematické a suspenzorové části raného embrya. Nově vytvořená somatická embrya jsou potom schopna proliferovat, dochází postupně i k nárůstu embryogenní hmoty. Celý proces regenerace trvá zpravidla 2–3 týdny, avšak délka regenerace se liší u různých druhů jehličnanů i u jednotlivých embryogenních kultur téhož druhu. Vlastnosti embryogenní kultury, tj. rychlost proliferace, výnos embryí, kvalita klíčení apod., se vlivem kryoprezervace nemění. Zamrazené



Obr. 9 Embryogenní kultura smrku v průběhu kryoprezervace; barvení trypanovou modří a FDA + PI
 A - kultura ošetřená před zamrazením (trypanová modř)
 B - kultura ošetřená před zamrazením; vitální barvení FDA + PI ukazuje mírné poškození polyembryogenních center i suspenzorových buněk
 C - kultura těsně po rozmrazení (trypanová modř)
 D - rozmrazené poškozené polyembryogenní centrum s malým množstvím živých buněk v meristému (FDA + PI)
 E - poškozené somatické embryo těsně po rozmrazení, několik živých buněk v meristematické embryonální hlavě, výjimečně se objevují i živé buňky v suspenzoru (FDA + PI)
 F - mrtvé somatické embryo (FDA + PI)
 (PC = polyembryogenní centrum; S = suspenzorové buňky; M = meristematická embryonální hlava)

uskladněné kultury jsou tedy dobrým zdrojem materiálu pro získání specifického – vybraného materiálu pro další množení stromů.

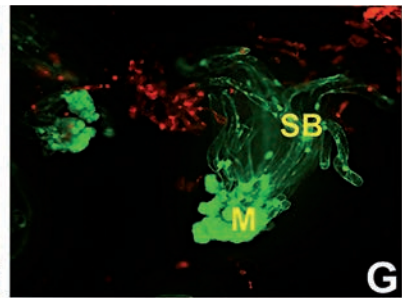
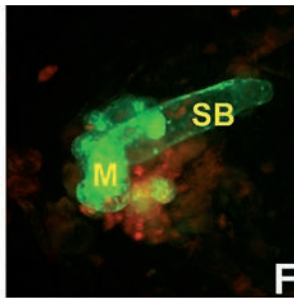
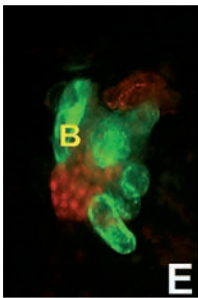
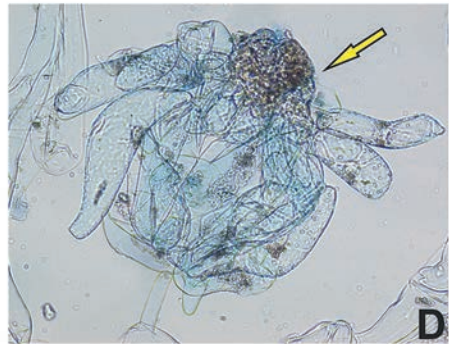
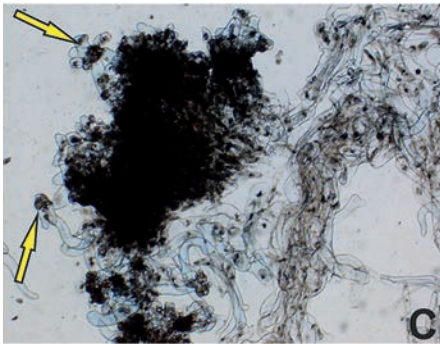
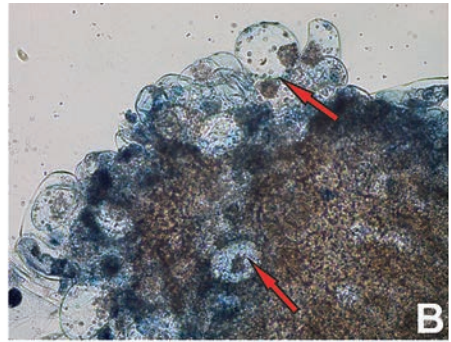
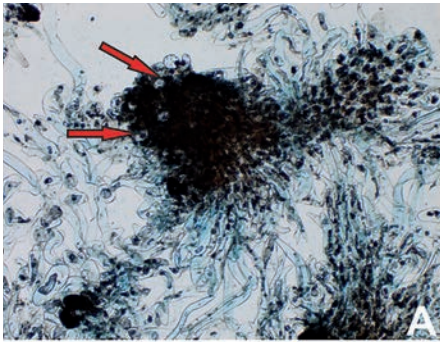
Využití somatické embryogeneze jehličnanů

- Somatická embryogeneze nabízí možnost získat bohaté potomstvo z minimálního množství semen. Toho lze využít především pro množení stromů, které mají významné vlastnosti a neposkytují dostatečné množství semen. Embryogenní kultury odvozené z těchto jedinců mohou být skladovány a připraveny k pěstování dalších rostlin vždy, když bude potřeba.
- Proces somatické embryogeneze je složitější a pracnější způsob množení jehličnatých stromů. Je proto také finančně náročnější než běžné způsoby pěstování ze semen nebo řízků. Proto je využíván pro speciální případy množení jehličnanů, kdy není výhodné a vhodné použít standardní postupy. Tento způsob množení jehličnanů se využívá např. k pěstování stromů pro technické využití, tj. na technických plantážích osazených pouze stromy určenými k průmyslovému využití. Somatická embryogeneze je také důležitou metodou pěstování vánočních stromků. Zaručuje zachování dobré kvality i vzhledu vybraných jehličnatých stromů.
- Somatická embryogeneze slouží také jako systém pro studium vývoje embrya. Ukazuje se, že průběh somatické a zygotické embryogeneze je srovnatelný; somatické i zygotické embryo prochází obdobnými vývojovými fázemi, liší se pouze dynamika obou procesů. Je proto výhodné studovat vývoj embrya v průběhu somatické embryogeneze jako paralelu k vývoji embrya zygotického. Mezi základní témata studia embryogeneze patří studium fytohormonální regulace vývoje embrya, vliv stresových faktorů na vývoj embrya, proteomická studia průběhu embryogeneze, studium významu programované buněčné smrti v procesu embryogeneze apod.
- Významnou oblastí studia je optimalizace procesu somatické embryogeneze a podmínek klíčení a převádění rostlin *ex vitro*. Výzkum směřuje především k zjednodušení a popř. automatizování práce s rostlinným materiálem. Cílem je snížení podílu lidské práce a v důsledku toho i zlevnění celého procesu pěstování rostlin ze somatických embryí. Využívají se automatické linky k třídění embryí, charakteristika optimálních embryí pomocí analýzy obrazu, kultivace v bioreaktorech apod.

Studium somatické embryogeneze v Ústavu experimentální botaniky

V ÚEB studujeme somatickou embryogenezi jehličnanů již od roku 1994. Výsledky naší práce publikujeme na konferencích i v časopisech. Témata abstraktů i článků dokumentují problematiku, kterou jsme se postupně zabývali a také směřování našeho výzkumu somatické embryogeneze.

V prvních etapách práce jsme se zejména snažili vyřešit problémy s kultivací embryogenních kultur, optimalizovali jsme postup kultivace v jednotlivých etapách somatické embryogeneze. První výsledky jsme publikovali na konferencích



Obr. 10 Regenerace embryogenní kultury smrku po rozmrazení

A - začátek regenerace embryogenní kultury z jednotlivých živých buněk poškozeného polyembryogenního centra, 4 dny po rozmrazení (trypanová modř)

B - totéž v detailu, šipky ukazují na živé buňky na povrchu i ve vnitřních vrstvách meristému (trypanová modř)

C - pokračování regenerace kultury 7 dní po rozmrazení, vznik raných somatických embryí, embrya jsou označena šipkami (trypanová modř)

D - nově vytvořené rané somatické embryo v detailu (trypanová modř)

E - začátek regenerace embryogenní kultury, jednotlivé živé buňky na bývalém meristému (FDA + PI)

F - vznik raného somatického embrya, začátek tvorby meristematické embryonální hlavy a suspensoru (FDA + PI)

G - zahájení proliferace, tvorba dalších raných somatických embryí, 2 týdny po rozmrazení embryogenní kultury (FDA + PI)

(B = jednotlivé živé buňky; SB = suspensorové buňky; M = meristém)

v letech 1996 a 1997 (11, 8). Experimentovali jsme se složením kultivačního média a prověřovali úlohu fytohormonů v průběhu vývoje somatických embryí. Zjišťovali jsme změny endogenních hladin auxinu, ABA i cytokininů v závislosti na složení média a ve vztahu k vývoji embryí (9), porovnávali jsme obsahy fytohormonů v somatických a zygotických embryích (7). Popsali jsme anatomické změny, ke kterým dochází v průběhu vývoje embrya (5) a změny v obsahu i zastoupení jednotlivých sacharidů. Po shrnutí našich výsledků (10, 6) jsme se snažili prohloubit naše znalosti o úloze ABA (2) i cytokininů (12). Dále jsme ověřovali možnosti kryoprezervace embryogenních kultur (13). Věnovali jsme se i studiu úlohy cytoskeletu při vývoji somatických embryí (15). V posledních letech studujeme vliv stresových faktorů na průběh somatické embryogeneze zejména ve spojení se změnami obsahu polyaminů (1, 3). Naše studia jsme prováděli většinou na embryogenních kulturách smrku (*Picea abies*), ale odvodili jsme a studovali i kultury jedlí (14).

Seznam vybraných publikací:

(1) CVIKROVÁ, M., VONDRÁKOVÁ, Z., ELIÁŠOVÁ, K., PEŠEK, B., TRÁVNÍČKOVÁ, A., VÁGNER, M. The impact of UV-B irradiation applied at different phases of somatic embryo development in Norway spruce on polyamine metabolism. *Trees*: DOI 10.1007/s00468-015-1280-6, 2015; (2) FISCHEROVÁ, L., FISCHER, L., VONDRÁKOVÁ, Z., VÁGNER, M. Expression of the gene encoding transcription factor PaVP1 differs in *Picea abies* embryogenic lines depending on their ability to develop somatic embryos. *Plant Cell Rep.* **27**(3): 435–441, 2008; (3) GEMPERLOVÁ, L., FISCHEROVÁ, L., CVIKROVÁ, M., MALÁ, J., VONDRÁKOVÁ, Z., MARTINCOVÁ, O., VÁGNER, M. Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce. *Tree Physiology* **29**(10): 1287–1298, 2009; (4) LIPAVSKÁ, H., SVOBODOVÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J., KUMSTÝŘOVÁ, L., VÁGNER, M., VONDRÁKOVÁ, Z. Somatic embryogenesis in Norway spruce: carbohydrate status during embryo maturation and the effect of polyethyleneglycol treatment. *In Vitro Cell. Dev. Biol./Plant.* **36**(4): 260–267, 2000; (5) SVOBODOVÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J., KUMSTÝŘOVÁ, 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. Physiol. Biochem.* **37**(3): 209–221, 1999; (6) VÁGNER, M., FISCHEROVÁ, L., ŠPAČKOVÁ, J., VONDRÁKOVÁ, Z. Somatic embryogenesis of Norway spruce. In: S. M. JAIN, P. K. GUPTA (eds.). *Protocols of Somatic Embryogenesis – Woody Plants*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 141–155, 2005; (7) VÁGNER, M., KUMSTÝŘOVÁ, L., VONDRÁKOVÁ, Z., EDER, J., MACHÁČKOVÁ, I., CHALUPA, V. Endogenous level of IAA, ABA and cytokinins during somatic and zygotic embryogenesis of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). In: *Rezervation and Reproduction of Genetic Sources of Forest Trees*. Praha (CZ), 11.24, 2000; (8) VÁGNER, M., VONDRÁKOVÁ, Z., STRNADOVÁ, Z., CVIKROVÁ, M., EDER, J., LIPAVSKÁ, H., ZIKMUNDOVÁ, M., VANĚK, T., MACHÁČKOVÁ, I. Norway spruce somatic embryogenesis: endogenous levels of

phytohormones during somatic embryo development. *Abstracts*, s. 29, Amiens, France: COST 822 Working Group 2, 1997; (9) 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; (10) VÁGNER, M., VONDRÁKOVÁ, Z., ŠPAČKOVÁ, J., CVIKROVÁ, M., EDER, J., LIPA VSKÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J., SVOBODOVÁ, H., MACHÁČKOVÁ, I. Norway spruce somatic embryogenesis: endogenous levels of phytohormones during somatic embryo development. In: A. ALTMAN et al.(eds.). *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*, s. 93–96, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999; (11) VÁGNER, M., VONDRÁKOVÁ, Z., VANĚK, T., MACHÁČKOVÁ, I. Growth and endogenous plant growth regulators in embryogenic culture of *Picea abies*. *Abstracts*, s. 25. Sanremo, Italy: COST 822 Working Group 2, 1996; (12) VIČÁNKOVÁ, A., VONDRÁKOVÁ, Z., FISCHEROVÁ, L., VÁGNER, M., MACHÁČKOVÁ, I. Immunolocalization of cytokinins in Norway spruce somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* **26**(3) suppl.: 27, The 14th FESPB Congress Book Abstracts, Cracow, Poland, August 23–27, 2004; (13) VONDRÁKOVÁ, Z., CVIKROVÁ, M., ELIÁŠOVÁ, K., MARTINCOVÁ, O., VÁGNER, M. Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree Physiology* **30**(10):1335–1348, 2010; (14) VONDRÁKOVÁ, Z., ELIÁŠOVÁ, K., FISCHEROVÁ, L., VÁGNER, M. The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, **6**(4): 587–596, 2011; (15) VONDRÁKOVÁ, Z., ELIÁŠOVÁ, K., VÁGNER, M. The anti-actin drugs latrunculin and cytochalasin affect the maturation of spruce somatic embryos in different ways. *Plant Science* 221–222: 90–99, 2014.

Špičkový výzkum v oblasti biologie rostlin je velice náročný na přístrojové vybavení. V ÚEB tak najdete velice nákladné a unikátní přístroje na třídění chromozomů, speciální elektronové, konfokální a fluorescenční mikroskopy a řadu analytických zařízení schopných stanovit chemické látky v nesmírně nízké koncentraci. Přístrojové vybavení je alfou a omegou našeho výzkumu – bez špičkových přístrojů nelze dělat prvotřídní vědu.

Pracovníci ÚEB se významným způsobem podílejí na výuce především na přírodovědeckých fakultách Univerzity Karlovy v Praze a Univerzity Palackého v Olomouci, ale i na několika dalších vysokých školách. S Univerzitou Palackého v Olomouci má ÚEB i společnou laboratoř. Pracovníci ÚEB každý semestr odpřednášejí více než 1000 hodin na vysokých školách. V laboratořích ÚEB najdete průběžně několik desítek studentů, kteří zde vypracovávají své bakalářské, magisterské či doktorandské práce. V posledních letech se do vědecké práce v ÚEB čím dál častěji zapojují i nadaní středoškolsí studenti.

ÚEB pořádá pravidelně významné mezinárodní vědecké kongresy a konference, z nichž jmenujme kongres Auxins and Cytokinins in Plant Development, zorganizovaný již devětkrát a pravidelně navštěvovaný nejvýznamnějšími světovými kapacitami v oboru, či konferenci Methods in Plant Sciences se šesti úspěšnými ročníky, zaměřenou především na mladé vědecké pracovníky.

V neposlední řadě je důležitou součástí práce ÚEB i ediční a publikační činnost. ÚEB již více než 50 let vydává dva mezinárodní vědecké časopisy (o jejich velmi slušném mezinárodním renomé svědčí tzv. impaktní faktor, který je jakýmsi univerzálním měřítkem kvality vědeckého časopisu). Časopis *Biologia Plantarum* je zaměřen na různé aspekty biologie rostlin, časopis *Photosynthetica* je pak úžeji specializován na proces využití slunečního záření ve fotosyntetickém procesu.

Bližší podrobnosti o výzkumu prováděném v ÚEB najdete na webových stránkách www.ueb.cas.cz. Ovšem nejlepším způsobem, jak nahlédnout do každodenní vědecké práce v ÚEB a shlédnout přístrojové vybavení v akci, je pracoviště osobně navštívit. Ideální příležitostí pro to je týden vědy a techniky, v jehož rámci ÚEB pořádá obvykle tři dny otevřených dveří (tradičně druhý týden v listopadu). Vědci v této době přerušují svou běžnou práci a věnují se návštěvníkům. Každý rok ÚEB navštíví kolem tisíce návštěvníků (především studentů) a drtivá většina z nich odchází velmi spokojena.

Proces somatické embryogeneze jehličnanů nabízí možnost množít jehličnaté stromy nepohlavní cestou. Vznikají tak geneticky shodní jedinci, které je vhodné využít zejména ve speciálních situacích, kdy je např. třeba získat potomstvo určitého stromu nebo připravit kvalitní sazenice budoucích vánočních stromků. Pak je účelné využít schopnosti rostlin vytvářet z tělních buněk embrya – zárodky budoucích rostlin. Ve sterilních podmínkách v kultivačních nádobách na přesně definovaném médiu může na izolované části mateřské rostliny vzniknout embryogenní kultura, která se stává zdrojem téměř neomezeného počtu somatických embryí. Ta se postupně vyvíjejí a zrají, až z nich je možné vypěstovat kvalitní klíčící rostliny. Čtenáři se mohou seznámit s jednotlivými kroky somatické embryogeneze od založení embryogenní kultury až po klíčení a také s úskalími této metody množení rostlin.

V EDICI VĚDA KOLEM NÁS PŘIPRAVUJEME:

Milan Řípa: **Historie termojaderné fúze v ČR**

Julie Jančárková: **Nikolaj Lvovič Okuněv**

Ivana Štětinová: **ScholarOne systém**

DOSUD VYŠLO:

Radek Mikuláš: **Stromatolity**

Petr Zacharov: **Observatoř Milešovka**

Václav Cílek: **Nové počasí**

Edice Věda kolem nás | Co to je...

Somatická embryogeneze jehličnanů | Zuzana Vondráková, Kateřina Eliášová,
Lucie Fischerová a Martin Vágr

Vydalo Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., pro Ústav
experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 – Lysolaje.

Grafická úprava dle osnovy Jakuba Krče a sazba Serifa.

Technická redaktorka Monika Chomiaková. Odpovědná redaktorka

Petra Královcová. Vydání 1., 2015. Ediční číslo 11916.

Tisk **SERIFA**®, s. r. o., Jímonická 80, 158 00 Praha 5.

Další svazky získáte na:

www.vedakolemnas.cz | www.academiaknihy.cz | www.eknihy.academia.cz