

NOVÉ POZNATKY O REPRODUKCI TOPOLU ŠEDÉHO V *IN VITRO* PODMÍNKÁCHNEW INSIGHT INTO THE REPRODUCTION OF GREY POPLAR IN *IN VITRO* CONDITIONS

EVA POKORNÁ ✉ - VÁCLAV BURIÁNEK - PAVLÍNA MÁCHOVÁ - JAROSLAV DOSTÁL - MARTINA KOMÁRKOVÁ

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Czech Republic

✉ e-mail: pokorna@vulhm.cz

ABSTRACT

The main goal of the presented study is to explore an effective micropropagation method for grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton (Sm.)), which belongs to woody plant species characterized by rapid growth and early reproductive maturity. The influence of three culture media – Murashige and Skoog medium (MS), woody plant medium (WPM), and medium according to LAMBARDI et al. (2000) (LAM) differing in nutrition and phytohormone compositions have been followed in relation to shoot-tip segments growth. The best results have been achieved on MS medium enriched in glutamine (10 mg.l⁻¹), glycine (2 mg.l⁻¹), BAP (0.2 mg.l⁻¹) and IBA (0.1 mg.l⁻¹), even though the concentrations of photosynthetic pigments were comparable with apical segments cultivated on WPM medium. In addition, faster shoot regeneration and subsequent proliferation were observed in excised apical segments on selected MS medium in comparison to excised nodal segments, in which lateral buds formations was unequal and delayed due to excessive adventitious shoots formation at the base of segments. These results clearly indicate the importance of medium composition and a part of segments used for efficient *in vitro* micropropagation technique of grey poplar.

Klíčová slova: topol šedý (*Populus ×canescens*); tkáňové kultury; apikální a nodální segmenty; *in vitro* podmínky

Key words: grey poplar (*Populus ×canescens*); plant tissue cultures; apical and nodal segments; *in vitro* conditions

ÚVOD

Topol šedý *Populus ×canescens* Aiton (Sm.) z čeledi vrbovitých (*Salicaceae*) je spontánní hybrid topolu bílého (*Populus alba* L.) a topolu osiky (*Populus tremula* L.), objevující se většinou na lokalitách společného výskytu obou rodičovských druhů. Celkové rozšíření sahá od severního Španělska přes střední a jižní Evropu až po západní Sibiř. Na území České republiky je topol šedý rozšířen zejména v úvalech řek Moravy, Dyje, Svratky a Odry (MOTTL 1998; ÚRADNÍČEK et al. 2009). Vyskytuje se převážně v lužních lesích a pobřežních křovinách, má však širší ekologickou amplitudu a dobře snáší i sušší a chudší stanoviště. Vyznačuje se podobnými ekologickými nároky jako topol bílý, je však odolnější vůči suchu a snáší lépe kyselejší půdy.

Pro rychlý růst, během něhož dosahují stromy výšek až 35 m již ve věku 30–40 let a mohutný kořenový systém vyznačující se výmladkovou schopností, lze topol šedý využít v lesním hospodářství nejen z hlediska produkce, ale i v rámci ochranných opatření, např. při ochraně proti půdní erozi a při tvorbě zeleně v krajině. V současné době vyvstává zejména v lužních lesích naléhavá potřeba nahradit chřadnoucí a odumírající porosty jasanů, které v posledních letech

podléhají infekčnímu tlaku houbových patogenů *Hymenoscyphus fraxineus* s anamorfním stadiem *Chalara fraxinea* T. Kowalski a *Phytophthora* spp. (ČERNÝ et al. 2016; LIŠKA, LORENC 2017). Vzniká tak problém výběru vhodných dřevin, které vytvoří nové zdravé porosty a zároveň přinesou žádoucí ekonomický efekt. Jednou z mála perspektivních dřevin do lužních lesů je právě topol šedý. Unikátní a lesnický cenná populace topolu šedého se nachází v lužních lesích na Znojemsku (LS Znojmo, revír Jaroslavice, lokalita Lužní les u Dyjákovic), tvoří ji jedinci vyšších věkových tříd s cennými fenotypovými znaky, vyznačující se úzkou korunou a rovným průběžným kmenem s dobrým čištěním (BURIÁNEK, NOVOTNÝ 2016). Jelikož přirozená obnova na dané lokalitě probíhá omezeně a klasické metody vegetativní reprodukce selhávají (nízká úspěšnost řízkování, odumírání roubovanců), biotechnologické postupy reprodukce představují významnou alternativu pro úspěšné zachování cenných genotypů a zajištění dostatečné reprodukce topolu šedého v podmínkách *ex situ*.

Rostlinné pletivo kambium, získané izolací z topolu, bylo použito již u prvních modelových objektů studia mikropropagace rostlinných tkání a orgánů (MATHES 1964; WINTON 1968, 1970, 1971; WOLTER

1968). Ukázalo se, že rostlinné pletivo topolu vykazuje vysokou vývojovou plasticitu, podobnou jako u bylinných druhů tabáku (SANTOS et al. 2016). Stimulaci tvorby výhonků nebo kořenů (organogenezi) z nediferenciovatých buněk kalusu bylo věnováno mnoho pozornosti. CHALUPA (1974) uvádí jako nejúčinnější kombinaci, vedoucí k zakládání výhonků, modifikované médium Linsmaier and Skoog obsahující pouze cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) v koncentraci 0,15–0,70 mg.l⁻¹. Přehled prací dokumentujících regeneraci odlišných druhů topolů a jejich hybridů z tkáňových pletiv a orgánů pro biotechnologické využití uvádí KANG, CHUN (1997), kteří také obecně shrnují, že morfogeneze rostlin je ovlivněna nejen druhem a zdrojem materiálu, ale i kombinací exogenně aplikovaných růstových regulátorů. Rostlinné hormony ze skupin auxinů, cytokininů, giberelinů a kyseliny abscisové se přirozeně vyskytují v rostlinných pletivech ve velmi nízkých koncentracích (10⁻⁶–10⁻⁹ M), v nichž ovlivňují řadu růstových procesů včetně interakcí s biotickými a abiotickými činiteli (SANTNER et al. 2009). V buněčných a tkáňových explantátových kulturách jsou považovány za obecně nejvýznamnější fytohormony z hlediska regulace růstu a vývoje auxiny, cytokininu a jejich vzájemné interakce (GASPAR et al. 1996). Auxiny byly popsány jako hlavní regulátory buněčné polarity a formování buněk během embryogeneze a postembryonálního vývoje, fylotaxe, odpovědí rostlin na tropismy, zakládání vodivých pletiv stejně jako postembryonální *de novo* organogeneze zahrnující tvorbu postranních kořenů a *in vitro* indukovanou *de novo* organogenezi. Cytokiny byly klasifikovány jako látky podporující buněčné dělení, regulující meristematickou aktivitu kořenů i výhonků, aktivitu axilárních meristémů, senescenci, odpověď na stres, tvorbu vodivých pletiv a rovněž *in vitro* indukovanou *de novo* organogenezi (PERNISOVA et al. 2009, 2011; SCHALLER et al. 2015). Vzájemný poměr těchto fytohormonů, jakožto hlavních komponent živných médií, je zásadním faktorem ovlivňujícím růst a morfogenezi rostlin *in vitro* podmínkách (GASPAR et al. 1996).

V důsledku šíření houbových chorob *Melampsora laricini-populina* a *M. medusae*, postihujících na Novém Zélandu velké množství odlišných druhů topolů kultivovaných pro hospodářské využití, byla pro jedince *Populus nigra* "Italica", *P. "Flevo"*, a *P. yunnanensis* ze sekce *Algeiros* a *Tacamahaca* vyvinuta metoda rychlé propagace pomocí tkáňových kultur (WHITEHEAD, GILES 1977). Základem metody bylo modifikované složení Murashige a Skoog média (MS médium – MURASHIGE, SKOOG 1962) obohacené o růstové regulátory 6-benzylaminopurin (BAP) a kyselinu naftyloctovou (NAA), které stimulovaly tvorbu kořenů (WHITEHEAD, GILES 1977). Alternativní přístup množení topolu šedého v *in vitro* podmínkách s použitím Woody Plant Medium (WPM) bez exogenně přidaných fytohormonů popsali ŽIAUKA, KUUSIENÉ (2014), kteří pozorovali po třech měsících kultivace zvýšení počtu výhonů v souvislosti s produkcí a setrváním etylénu v pevně uzavřených nádobách ve srovnání s nádobami, u nichž docházelo k částečné výměně vzduchu. Optimálním poměrem rostlinných hormonů v živném médiu se zabývali rovněž LAMBARDI et al. (2000), kteří pozorovali nejvyšší regeneraci a růst segmentů topolu bílého (*Populus alba* L.) na médiu obsahujícím BAP a kyselinu giberelovou (GA₃) v koncentraci 0,2 mg.l⁻¹ a 0,03 mg.l⁻¹.

Je zřejmé, že mikropropagaci topolů v *in vitro* podmínkách je stále věnováno mnoho pozornosti a jsou hledány nové postupy *in vitro* kultivace a množení podle specifických potřeb lesního hospodářství a ochrany krajiny. Hlavním cílem této práce bylo zjistit a následně ověřit optimální podmínky dlouhodobého a efektivního způsobu mikropropagace topolu šedého *ex situ*. Pozornost byla věnována zejména složení kultivačního média a porovnání růstu jednotlivých rostlinných segmentů topolu šedého, s cílem získat nejefektivnější způsob rychlého klonového množení vyselektovaných jedinců udržovaných v explantátových kulturách. Souběžně byl vyhodnocen i stav fotosyntetického aparátu během regenerace apikálních vrcholů topolu šedého na testovaných médiích pomocí stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů.

MATERIÁL A METODIKA

Výchozím rostlinným materiálem pro založení primární kultury topolu šedého byly dormantní pupeny (cca 30 ks) pocházející z donorového stromu označeného TPE18 rostoucího v lokalitě Dyjákovice (N 48,78442°, E 16,29252°). Odebraný materiál byl řádně označen, uložen do mikroténového sáčku a neprodleně uskladněn do chladového boxu. Po převozu do laboratoře byly pupeny sterilizovány 20 min v saponátu Tween®20 (2 kapky na 10 ml), 20 min v roztoku KORSOLEX (25 ml/ 0,5 l destilovaná voda), promývány 20 min pod tekoucí vodou, 20 min inkubovány v roztoku HgCl₂ (1 mg.l⁻¹) a následně ponořeny do destilované vody v intervalu 3 × 15 min. Povrchové šupinky pupenů byly odstraněny ve sterilním prostředí v laminárních flowboxech pomocí skalpelu a pinzety s následnou extirpací vzrostných vrcholů. Vrcholy byly umístěny do sterilních skleněných nádob (obr. 1A) obsahujících indukční agarové živné MS médium obohacené o glutamin (10 mg.l⁻¹), glycin (2 mg.l⁻¹), BAP (0,2 mg.l⁻¹) a IBA (0,1 mg.l⁻¹), s obsahem sacharózy 30 g.l⁻¹, agarem 6 g.l⁻¹ a pH hodnotou roztoku upravenou na 5,8. Segmenty byly kultivovány v klimatizovaných podmínkách při 24 °C, 16 h/ 8 h světelné fotoperiodě a intenzitou osvětlení 30 μmol.m⁻².s⁻¹. Po zhruba 4–6 týdnech byla zaznamenána proliferace nasazených explantátů v prýty (obr. 1B). Po vyrašení hlavních, případně vedlejších výhonů (obr. 1C) byly explantátové kultury v intervalech po cca 4 týdnech několikanásobně multiplikovány k zajištění dostatečného množství rostlinného materiálu.

Pro stanovení optimálního složení kultivačního média byly testovány tři různé varianty živných médií: 1) MS médium stejného složení jako indukční agarové živné MS médium (viz výše); 2) WPM (LLOYD, McCOWN 1980) obsahující růstové regulátory BAP (0,2 mg.l⁻¹) a IBA (0,1 mg.l⁻¹) a 3) LAM živné MS médium podle LAMBARDI et al. (2000), které neobsahuje NH₄NO₃ ve srovnání s MS médiem a je obohacené o BAP (0,2 mg.l⁻¹) a GA₃ (0,03 mg.l⁻¹). Všechna testovaná živná média obsahovala sacharózu 30 g.l⁻¹ a agar 6 g.l⁻¹ s hodnotou pH 5,8. Na připravená živná média byly přeneseny extirpované vzrostné segmenty (cca 2–4 mm), u kterých byla zaznamenávána životnost a regenerace explantátů v průběhu třech týdnů a rovněž byl stanoven i obsah fotosyntetických pigmentů. Obsah chlorofylů a karotenoidů byl stanoven z deseti vzrostných vrcholů homogenizovaných 80% acetonem při pokojové teplotě. Vzorky byly následně přepipetovány do mikrozkrumavek a centrifugovány při 8000 RPM po dobu 5 min. Obsahy chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů byly detekovány pomocí UV-VIS spektrofotometru (VIS-7236, RAYLEIGH) s přepočtem podle SUMANTA et al. 2014. Měření hladin fotosyntetických pigmentů bylo provedeno ve třech biologických vzorcích ve dvou opakováních pro každou variantu.

Schopnost regenerace segmentů obsahujících meristematické buňky byla porovnána mezi apikálními vrcholy (cca 2–3 mm) a nodálními segmenty (cca 5–7 mm) topolu šedého, které byly po extirpací přeneseny na MS médium a kultivovány v místnosti s pravidelným světelným režimem (24 °C, 16 h/ 8 h světelné fotoperiodě s intenzitou osvětlení 30 μmol.m⁻².s⁻¹). Růst jednotlivých segmentů byl sledován a vyhodnocen po čtyřech dnech, třech týdnech a pěti týdnech kultivace v *in vitro* podmínkách. Celkem byla provedena tři nezávislá opakování u pěti biologických vzorků pro každou variantu.

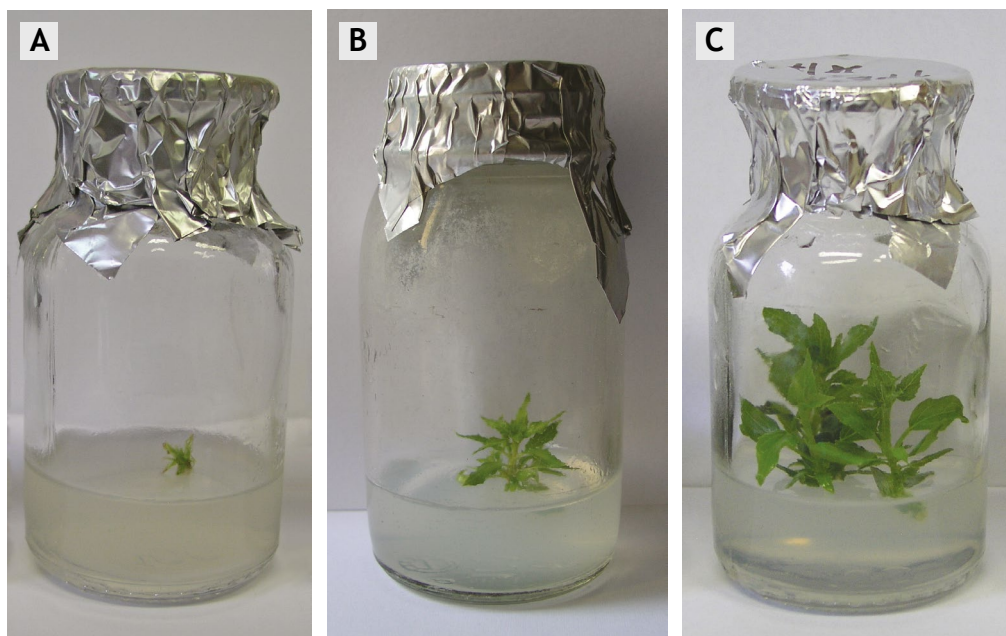
Naměřená data týkající se obsahu fotosyntetických pigmentů na testovaných médiích byla podrobena exploratorní analýze v programu QCExpert (verze 3.1, TriloByte Statistical Software, 2008), která nepotvrdila předpoklady o normalitě rozdělení. Následně byla provedena statistická analýza souborů dat z naměřených hodnot obsahu chlorofylů *a*, *b* a karotenoidů pomocí jednofaktorové Kruskal-Wallis analýzy variance (*p* > 0,05) s navazujícím mnohonásobným porovnáním Kruskalova-Wallisova testu (*p* > 0,05). Výpočty byly prováděny ve statistickém programu PASS (PASS 10. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA; NCSS © 2017).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Rychlý růst topolů je jednou z významných vlastností, která je využívána nejen v lesním hospodářství, ale např. i v energetickém průmyslu, v němž se biomasa z topolů používá ve formě obnovitelného zdroje energie (LUKÁŠOVÁ, WEGER 2009; WERNER et al. 2012). Poměrně rychlé období regenerace s vysokým počtem vytvářejících se výhonků topolu šedého v *in vitro* podmínkách ve srovnání s jinými lesními dře-

vinami (např. hrušeň polníčka, jablono lesní a jeřáb břek), jež se vyznačují delším regeneračním obdobím a nižší tvorbou výhonů (MALÁ et al. 2005, 2009, 2013), usnadňuje vyhodnotit optimální složení testovaných živných médií pro mikropropagaci topolu v relativně krátkém časovém úseku (3–4 týdny).

U tří testovaných médií (MS, WPM a LAM) byl sledován růst apikálních vrcholů topolu šedého během třech týdnů. Po prvním týdnu kultivace byla pozorována výrazná chloróza u segmentů rostoucích na médiu LAM v porovnání s ostatními variantami (obr. 2).

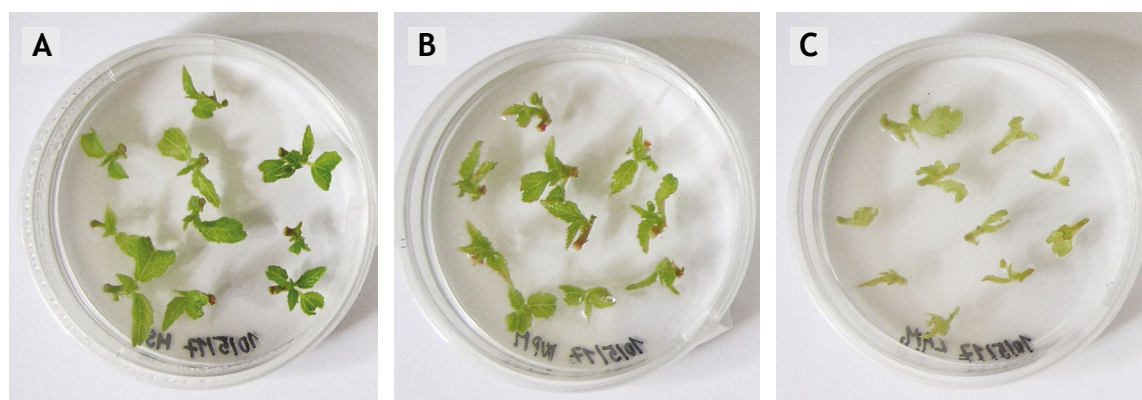


Obr. 1.

Mikropropagace topolu šedého (*Populus xcanescens*) (TPE 18) v *in vitro* podmínkách. Vyrasení axilární pupen topolu šedého (1A), růst apikálního výhonu (1B) a tvorba adventivních výhonků (1C) TPE 18 na MS médiu

Fig. 1.

Micropropagation of grey poplar (*Populus xcanescens*) (TPE 18) in *in vitro* conditions. Puffy axilar bud of grey poplar (1A), growth of apical shoot (1B) and formation of adventitious shoots (1C) TPE 18 on MS medium



Obr. 2.

Růst apikálních segmentů topolu šedého (*Populus xcanescens*) týden po extirpaci na médiích MS (Murashige a Skoog) – 2A, WPM (Woody Plant Medium) – 2B a LAM (médiu podle LAMBARDI et al. 2000) – 2C, z levé strany do pravé

Fig. 2.

Growth of apical segments of grey poplar (*Populus xcanescens*) one week after extirpation on MS (Murashige a Skoog) – 2A, WPM (Woody Plant Medium) – 2B and LAM (according to LAMBARDI et al. 2000 medium) – 2C, from the left to the right side

Apikální vrcholy kultivované na médiích MS a WPM byly srovnatelné z hlediska vývoje i sytosti zeleně barvy listů, ačkoliv u média WPM byla zaznamenána tvorba antokyanů při bázi listových výhonků (obr. 2B). Po třech týdnech kultivace byly již pozorovány výrazné rozdíly mezi testovanými variantami. Listové výhonky se nadále vyznačovaly chlorotickým zbarvením a zpomaleným růstem na médiu LAM ve srovnání s ostatními médii (obr. 3). Pomalejší regenerace rostlinných vrcholů během následujících dvou týdnů, užší listové čepele a patrné antokyanové zbarvení při bázi segmentů i na okrajích jednotlivých listů včetně kompaktnější listové růžice bylo zaznamenáno na médiu WPM (obr. 3B). Listové segmenty kultivované na médiu MS byly charakteristické sytější zelenou barvou listů i větší listovou plochou (obr. 3A). Tvorba antokyanů nebo výskyt chlorotického zbarvení v nadzemních částech rostlin je často spojována v souvislosti s reakcí na biotické nebo abiotické podmínky (BURKE 1932; KOVINICH 2014). U mnoha rostlinných druhů se antokyaniny objevují ve specifických stádiích vývoje, kde plní fotoprotektivní funkci. Za podmínek stresu však není jejich funkce dosud známa, přestože jedna z předních hypotéz se opírá o jejich roli jakožto antioxidantů zachytávajících reaktivní kyslíkové radikály (KOVINICH 2014). Je pravděpodobné, že výskyt chloróz a antokyanů u explantátů topolu šedého kultivovaných na médiích WPM a LAM je způsobeno nevyhovujícím složením médií. WPM médium se liší zastoupenou formou dusíku a médium LAM vedle odlišného zastoupení fytohormonů nemá obsažen dusík ve formě NH_4NO_3 v porovnání s živným médiem MS. CHATURVEDI et al. (2004) uvádí, že nejúčinnější z testovaných cytokininů, podílející se na indukci tvorby výhonků u topolu osiky, je BAP v koncentraci $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ v médiu. Námi zvolená koncentrace BAP byla nepatrně nižší ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$) u všech testovaných médiích pro topol šedý, avšak i při této koncentraci jsme pozorovali vhodný růst a dostatečnou proliferaci v nadzemních částech rostlinných segmentů.

Na základě pozorovaných rozdílů v sytosti zelené barvy a tvorby antokyanů u apikálních segmentů v průběhu tří týdnů na testovaných médiích byl za účelem přesnějšího vyhodnocení spektrofotometricky stanoven obsah fotosyntetických pigmentů, zejména chlorofyl *a*, *b* (Chl *a*, Chl *b*) a karotenoidy (Cars) v pletivech čtyřtýdenních výhonků rostlin. Zatímco hladiny Chl *a* i Chl *b* v listových segmentech

rostoucích na médiu MS (Chl *a* $55,87 \pm 11,52 \text{ mg.ml}^{-1}$; Chl *b* $15,82 \pm 3,32 \text{ mg.ml}^{-1}$) se významně nelišily od obsahu pigmentů při kultivaci na médiu WPM (Chl *a* $53,49 \pm 6,99 \text{ mg.ml}^{-1}$; Chl *b* $17,18 \pm 1,71 \text{ mg.ml}^{-1}$), apikální vrcholy kultivované na médiu LAM se vyznačovaly významně sníženým obsahem Chl *a* ($17,64 \pm 1,27 \text{ mg.ml}^{-1}$) i Chl *b* ($6,19 \pm 0,26 \text{ mg.ml}^{-1}$) ve srovnání s oběma médii (obr. 4). Stejný trend se ukázal i u celkového množství Chl (*a+b*) a karotenoidů, kde byl rovněž potvrzen statisticky významný rozdíl mezi variantou média LAM s obsahem Chl (*a+b*) $23,84 \pm 1,41 \text{ mg.ml}^{-1}$ a Cars $10,17 \pm 0,33 \text{ mg.ml}^{-1}$ a oběma dalšími testovanými variantami médií, média WPM s hladinou Chl (*a+b*) $70,67 \pm 8,67 \text{ mg.ml}^{-1}$ a celkovou koncentrací Cars $24,28 \pm 1,02 \text{ mg.ml}^{-1}$ a média MS s obsahem Chl (*a+b*) $71,69 \pm 14,82 \text{ mg.ml}^{-1}$ a Cars $22,85 \pm 3,99 \text{ mg.ml}^{-1}$ (obr. 4). Explorační analýza nepotvrdila předpoklady o normalitě rozdělení dat vztažených k obsahu fotosyntetických pigmentů na testovaných médiích. Statisticky významný vliv typu média na obsah fotosyntetických pigmentů Chl *a*, *b*, (*a+b*) a karotenoidů byl zjištěn pomocí Kruskalova-Wallisova testu mnohonásobného porovnání na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (obr. 5, tab. 1).

V práci SZADEL et al. (2003) byla zjištěna nižší koncentrace chlorofylů a karotenoidů u vyvíjejících se listů topolu bavlíkového (*Populus deltoides*) kultivovaného ve skleníku, ve srovnání s listy plně vyvinutými, což s našimi daty ze stanovení fotosyntetických pigmentů v mladých výhoncích topolu šedého naznačuje úzkou spojitost naměřených hodnot se stářím rostlin. Umístění jednotlivých variant pokusných explantátů v kultivační místnosti na plně osvětlené místo nám umožnilo stanovit maximální hodnoty fotosyntetických pigmentů, neboť bylo zjištěno, že při zastínění dochází k významnému snížení koncentrace celkových chlorofylů a karotenoidů u listnatých i jehličnatých druhů dřevin (LICHTENHALER et al. 2007). Na základě našich výsledků usuzujeme, že testovaná média WPM a LAM nejsou svým složením vhodná pro mikropropagaci topolu šedého v *in vitro* podmínkách, a proto jsme pro další experimenty zvolili médium MS.

Za účelem zjistit rychlý způsob multiplikace topolu šedého, např. pro zajištění dostatečného množství rostlinného materiálu k experimentální činnosti, byla porovnána regenerace extirpovaných vzrostných vrcholů a nodálních segmentů kultivovaných na živném MS médiu.

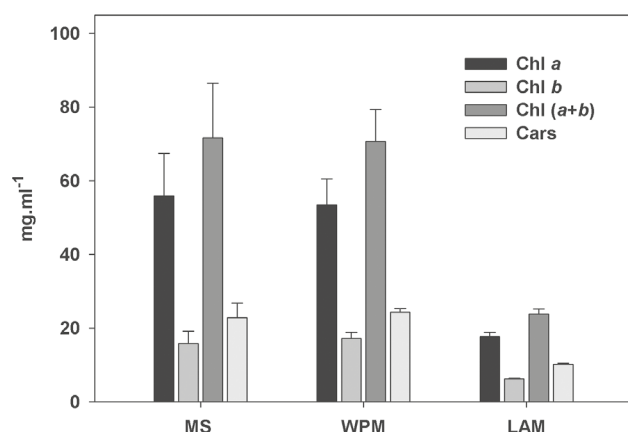


Obr. 3.

Růst apikálních segmentů topolu šedého (*Populus xcanescens*) tři týdny po extirpaci na médiích MS (Murashige a Skoog) – 3A, WPM (Woody Plant Medium) – 3B a LAM (médium podle LAMBARDI et al. 2000) – 3C, z levé strany do pravé

Fig. 3.

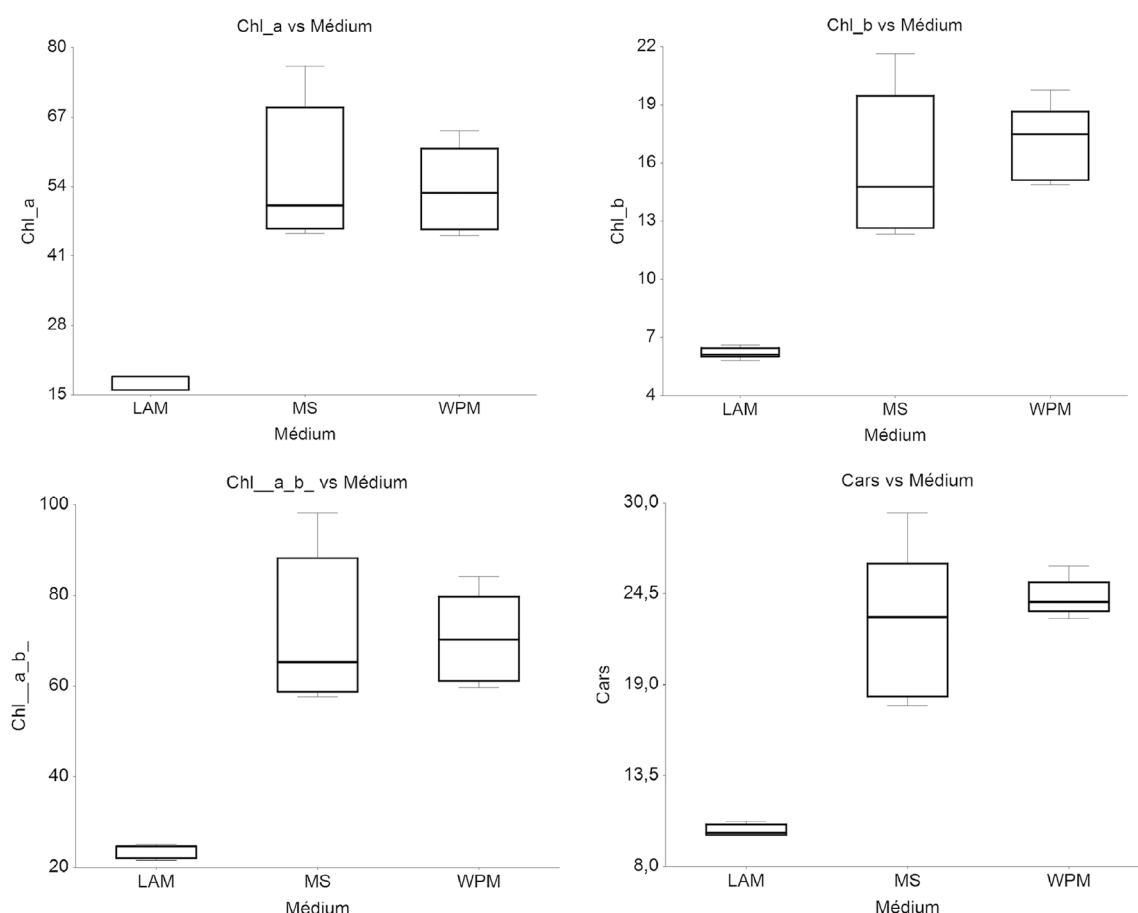
Growth of apical segments of grey poplar (*Populus xcanescens*) three weeks after extirpation on MS (Murashige a Skoog) – 3A, WPM (Woody Plant Medium) – 3B and LAM (according to LAMBARDI et al. 2000 medium) – 3C, from the left to the right side

**Obr. 4.**

Obsah fotosyntetických pigmentů v nadzemních částech topolu šedého (*Populus ×canescens*) kultivovaných tři týdny na třech různých médiích: MS (Murashige a Skoog), WPM (Woody Plant Medium) and LAM (according to LAMBARDI et al. 2000). Chl *a* – chlorofyl *a*, Chl *b* – chlorofyl *b*, Chl (*a+b*) – celkový obsah chlorofylů (*a+b*), Cars – karotenoidy

Fig. 4.

Content of photosynthetic pigments in above-ground tissues of grey poplar (*Populus ×canescens*) cultivated three weeks on three different media: MS (Murashige a Skoog), WPM (Woody Plant Medium) and LAM (according to LAMBARDI et al. 2000). Chl *a* – chlorophyll *a*, Chl *b* – chlorophyll *b*, Chl (*a+b*) – total contents of chlorophylls (*a+b*), Cars – carotenoids

**Obr. 5.**

Jednofaktorová Kruskal-Wallis ANOVA analýza variance ($p > 0,05$) obsahu chlorofylů *a* (Chl *a*; 6A), *b* (Chl *b*; 6B), *a+b* (Chl (*a+b*); 6C) a karotenoidů (Cars; 6D) v nadzemních částech segmentů topolu šedého (*Populus ×canescens*) kultivovaných čtyři týdny na třech různých kultivačních médiích – Murashige a Skoog (MS), Woody plant médium (WPM) a médium podle LAMBARDI et al. (2000) (LAM)

Fig. 5.

Kruskal-Wallis One-Way ANOVA analysis of variance ($p > 0.05$) of chlorophylls *a* (Chl *a*; 6A), *b* (Chl *b*; 6B), *a+b* (Chl (*a+b*); 6C) and carotenoids (Cars; 6D) in above-ground tissue segments of grey poplar (*Populus ×canescens*) cultivated fourth weeks on three different cultivation media: MS (Murashige a Skoog), WPM (Woody Plant Medium) and LAM (according to LAMBARDI et al. 2000)

Tab. 1.

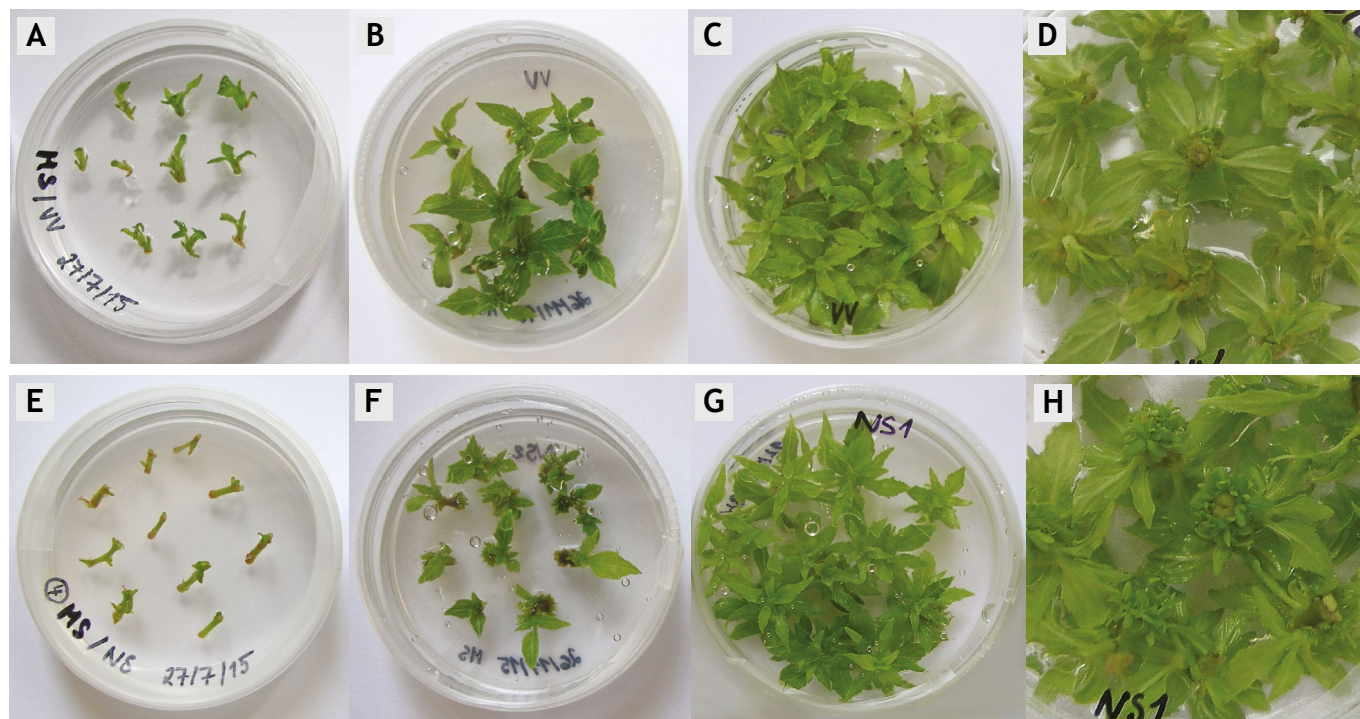
Kruskal-Wallis Z-Value test mnohonásobného porovnání obsahu fotosyntetických pigmentů (chlorofylů *a*, *b*, (*a+b*) a karotenoidů (Cars)) na testovaných médiích Murashige a Skoog (MS), Woody plant médium (WPM) a médium podle LAMBARDI et al. (2000) (LAM) v segmentech topolu šedého (*Populus ×canescens*)

Tab. 1.

Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Test of photosynthetic pigments (chlorophylls *a*, *b*, (*a+b*) and carotenoids (Cars)) contents on tested media Murashige and Skoog (MS), woody plant medium (WPM) and medium according to LAMBARDI et al. (2000) (LAM) in grey poplar segments (*Populus ×canescens*)

Chl <i>a</i>	LAM	MS	WPM
LAM	0	*	*
MS	*	0	
WPM	*		0
Chl <i>b</i>	LAM	MS	WPM
LAM	0	*	*
MS	*	0	
WPM	*		0
Chl (<i>a+b</i>)	LAM	MS	WPM
LAM	0	*	*
MS	*	0	
WPM	*		0
Cars	LAM	MS	WPM
LAM	0	*	*
MS	*	0	
WPM	*		0

* odlišné skupiny ($\alpha = 0,05$)/* different groups ($\alpha = 0.05$)

**Obr. 6.**

Průběh regenerace extirpovaných vrcholů (6A-6D) a nodálních segmentů (6E-6H) topolu šedého (*Populus ×canescens*) na Murashige a Skoog médiu. Růst segmentů čtyři dny po extirpaci (6A a 6E), tři týdny po extirpaci (6B a 6F) a čtyři týdny po extirpaci (6C, 6D, 6G a 6H). U obrázků 6D a 6H jsou znázorněny bazální části segmentů

Fig. 6.

Course of regeneration of extirpated apicals (6A-6D) and nodal segments (6E-6H) of grey poplars (*Populus ×canescens*) on Murashige and Skoog medium. Segments growth fourth days after extirpation (6A a 6E), three weeks after extirpation (6B a 6F) and fourth weeks after extirpation (6C, 6D, 6G a 6H). For pictures 6D and 6H are illustrated basal parts of segments

Po čtyřech dnech od extirpace rostlinných segmentů bylo pozorováno rychlejší prorůstání apikálních vrcholů oproti nepatrnému zakládání bočních pupenů u nodálních segmentů (obr. 6A a 6E). Rozdíl v regeneraci mezi sledovanými segmenty byl zaznamenán i po třech týdnech kultivace, kde zejména u nodálních segmentů došlo k nadměrné tvorbě adventivních výhonků při jejich bázi (obr. 6F) na úkor rozrůstání úžlabního pupenu, což nebylo pozorováno u apikálních vrcholů (obr. 6B). Přestože se rozdíl v regeneraci u obou částí sledovaných segmentů vyrovnal po pěti týdnech (obr. 6C a 6G), byla i nadále patrná vysoká tvorba adventivních výhonků při bázi nodálních segmentů ve srovnání s apikálními vrcholy (obr. 6D a 6H). Vyšší proliferace výhonků z apikálních segmentů oproti nodálním segmentům byla zaznamenána např. u arabského hrachu (PAZOS-NAVARRO et al. 2012) a pukolu okrouhlolistého (NIRANJAN et al. 2010). Naopak např. u papriky čínské byla vyšší tvorba výhonků pozorována u nodálních segmentů (KEHIE et al. 2012), kde byla hlavní příčinou tohoto jevu vyšší koncentrace exogenně aplikovaných syntetických cytokininů v živném médiu.

Z našich pozorování vyplývá, že extirpované vzrostné vrcholy jsou vhodnějším materiálem pro mikropropagaci topolu šedého v aseptických podmínkách než nodální segmenty, a to z hlediska optimálnějšího růstu, ale také s ohledem na pracovní proces pasážování explantátů, kdy vysoká tvorba adventivních výhonků u nodálních segmentů zpomaluje manipulaci s rostlinným materiálem při pasážování. Potenciál vysoké tvorby u nodálních segmentů by naopak mohl být využit pro rychlé klonové množení vybraného jedince nebo pro experimenty vyžadující velké množství výchozího materiálu, např. pro účely transformačních technik.

ZÁVĚR

Topol šedý je z hlediska rychlého růstu a regenerační schopnosti velmi vhodnou dřevinou pro kultivaci v aseptických podmínkách. Zjistili jsme, že složení živného média, stejně jako použitá část segmentů pro multiplikaci rostlin v *in vitro* podmínkách významně ovlivňuje rychlost regenerace i životnost explantátů. Ze tří testovaných médií bylo za neoptimálnější složení média vyhodnoceno živné MS médium obohacené o glutamin (10 mg.l⁻¹), glycin (2 mg.l⁻¹), BAP (0,2 mg.l⁻¹) a IBA (0,1 mg.l⁻¹). Z hlediska optimalizace mikropropagačních postupů jsou vhodnější meristematická pletiva pocházející z apikálních částí ve srovnání s nodálními segmenty.

Poděkování:

Práce byla finančně podpořena z poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0117 (č. j. 6779/2017-MZE-14151) a výzkumného projektu NAZV QJ1520297. Autoři rovněž děkují za technickou pomoc s kultivací topolu šedého Daně Petschlové, ing. Luďce Čížkové, Ph.D. za pomoc s výběrem topolu šedého v revíru Jaroslavičce a kolegům z VÚLHM, v. v. i., ing. Jiřímu Čápkovi a ing. Martinu Fulínovi, Ph.D. za zajištění sběru rostlinného materiálu. V neposlední řadě patří poděkování za pomoc a spolupráci pracovníkům LS Znojmo.

LITERATURA

- BURIÁNEK V., NOVOTNÝ P. 2016. Metodická příručka k určování domácích druhů topolů. Strnady, VÚLHM: 35 s. Lesnický průvodce, 11/2016.
- BURKE E. 1932. Chlorosis of tree. *Plant Physiology*, 7: 329–334.
- ČERNÝ K., HAVRDOVÁ L., ZLATNÍK V., HRABĚTOVÁ M. 2016. Pěstování jasanu v prostředí s výskytem *Hymenoscyphus fraxineus*. Pardubice, Studio Press: 51 s.
- GASPAR T., KEVERS C., PENEL C., GREPPIN H., REID M. H., THORPE T. A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 32: 272–289.
- CHALUPA V. 1974. Control of root and shoot formation and production of trees from poplar callus. *Biologia Plantarum*, 16: 316–320.
- CHATURVEDI H.C., SHARMA A.K., AGHA B.Q., JAIN M., SHARMA M. 2004. Production of cloned trees of *Populus deltoides* through *in vitro* regeneration of shoots from leaf, stem and root explants and their field cultivation. *Indian Journal of Biotechnology*, 2: 203–208.
- KANG H., CHUN Y.W. 1997. Plant regeneration through organogenesis in poplar. In: Klopfenstein, N.B. et al. (eds.): *Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus*. Fort Collins, CO: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station: 13–23. General technical report RM-GTR-297.
- KEHIE M., KUMARIA S., TANDON P. 2012. *In vitro* plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Capsicum chinense* Jacq. Cv. Naga King Chili. 3 Biotech, 2: 31–35.
- KOVINICH N., KAYANJA G., CHANOCA A., RIEDL K., OTEGUI M.S., GROTEWOLD E. 2014. Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in *Arabidopsis*. *Planta*, 240: 931–940.
- LAMBARDI M., FABBRI A., CACCAVALE A. 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. *Plant Cell Reports*, 19: 213–218.
- LICHTENHALER H.K., AČ A., MAREK M.V., KALINA J., URBAN O. 2007. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 577–588.
- LIŠKA J., LORENC F. 2017. Houbové choroby v lesích Česka v roce 2016. In: Knížek M. (ed.): *Škodliví činitelé v lesích Česka 2016/2017 – Praktická ochrana lesa v současných podmínkách*. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí. Průhonice, 19. 4. 2017. Strnady. VÚLHM: 22–25. Zpravodaj ochrany lesa.
- LOYD G., MCCOWN B.H. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *International Plant Propagators' Society, Combined proceedings*, 30: 421–427.
- LUKÁŠOVÁ M., WEGER J. 2009. Možnosti genetické identifikace klonů a kříženců topolu Simonova, černého, bavlíkového a Maximovičova (*Populus Simonii*, *P. nigra*, *P. maximowiczii*) metodou simple sequence repeat. *Acta Pruhoniciana*, 92: 19–25.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L. 2005. Využití mikropropagace pro reprodukci genových zdrojů vybraných ušlechtilých listnatých dřevin (*Malus sylvestris*, *Pyrus pyramidalis*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* a *Prunus avium*). *Zprávy lesnického výzkumu*, 50: 219–224.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., KARADY M., NOVÁK O., MIKULÍK J., HAUSEROVÁ E., GREPLOVÁ J., STRNAD M., DOLEŽAL K. 2009. Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 341–348.

- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J. 2013. Mikropropagace hrušně polničky (*Pyrus pyrausta* (L.) Burgsdorf). Strnady, VÚLHM: 20 s. Lesnický průvodce 2/2013.
- MATHES M.C. 1964. The in vitro formation of plantlets from isolated aspen tissues. *Phyton*, 21: 137–141.
- MOTTL J. 1998. Sortiment topolů vhodný pro krajinářské a sadovnické úpravy. In: Tábor I. (ed.): Využití topolů v sadovnické a krajinářské tvorbě. Průhonice, Výzkumný ústav okrasného zahradnictví Průhonice: 85 s. Acta Pruhoniciana.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- NCSS. © 2017. PASS¹⁵ Sample Size [online] [cit. 2017-06-16]. Dostupné na/Available on: <http://www.ncss.com/software/pass/procedures/>
- NIRANJAN M.H., SUDARSHANA M.S., GIRISHA S.T. 2010. In vitro shoot induction from excised shoot tips and nodal segment explants of *Lagerstroemia indica* (L) – A medical cum ornamental shrub. *Journal of Biomedical Science and Research*, 2: 212–217.
- PAZOS-NAVARRO M., DEL RIO J.A., ORTUNO A., ROMERO-ESPINAR P., CORREAL E., DABAUZA M. 2012. Micropropagation from apical and nodal segments of *Bituminaria bituminosa* and the furanocoumarin content of propagated plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87: 29–35.
- PERNISOVA M., KLÍMA P., HORÁK J., VÁLKOVÁ M., MALBECK J., SOUCEK P., REICHMAN P., HOYEROVÁ K., DUBOVÁ J., FRIML J., ZAŽÍMALOVÁ E., HEJÁTKO J. 2009. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 3609–3614.
- PERNISOVA M., KUDEROVÁ A., HEJÁTKO J. 2011. Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. *Current Protein and Peptide Science*, 12: 137–147.
- SANTNER A., CALDERON-VILLALOBOS L.I., ESTELLE M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5: 301–307.
- SANTOS R.B., ABRANCHES R., FISCHER R., SACK M., HOLLAND T. 2016. Putting the spotlight back on plant suspension cultures. *Frontiers in Plant Science*, 7: 297. DOI: 10.3389/fpls.2016.00297.
- SCHALLER G.E., BISHOPP A., KIEBER J.J. 2015. The Yin-Yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27: 44–63. DOI: 10.1105/tpc.114.133595
- SUMANTA N., CHOUDHURY I.H., NISHIKA J., SUPRAKASH R. 2014. Spectrometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4: 63–69.
- SZADEL A., LORENC-PLUCIŃSKA G., KAROLEWSKI P., MATYSIAK R. 2003. Photochemical activity, photosynthetic pigments and carbohydrates in poplar leaves fumigated with sulphur dioxide. *Dendrobiology*, 49: 57–61.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 367 s.
- WERNER C., HAAS E., GROTE R., GAUDER M., GRAEFF-HÖNNINGER S., CLAUPEIN W., BUTTERBACH-BAHL K. 2012. Biomass production potential from *Populus* short rotation systems in Romania. *GCB Bioenergy*, 4: 642–653.
- WHITEHEAD H.C.M., GILES K.L. 1977. Rapid propagation of poplars by tissue culture methods. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 7: 40–43.
- WINTON L.L. 1968. Plantlet formation from aspen tissue cultures. *Science*, 160: 1234–1235.
- WINTON L.L. 1970. Shoot and tree production from aspen tissue cultures. *American Journal of Botany*, 57: 904–909.
- WINTON L.L. 1971. Tissue culture propagation of European aspen. *Forestry Science*, 17: 348–350.
- WOLTER K.E. 1968. Root and shoot initiation in aspen callus cultures. *Science*, 219: 509–510.
- ŽIAUKA J., KUUSIENĖ S. 2014. Multiplication and growth of hybrid poplar (*Populus alba* x *P. tremula*) shoots on a hormone-free medium. *Acta Biologica Hungarica*, 65: 346–354.

NEW INSIGHT INTO THE REPRODUCTION OF GREY POPLAR IN *IN VITRO* CONDITIONS

SUMMARY

Grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton (Sm.)) is a spontaneous hybrid of *Populus alba* L. and *Populus tremula* L. with a fast-growing ability and early reproductive maturity, commonly occurring in a floodplain forests and shore shrubberies. Due to the infection pressure caused by fungi pathogens (e.g. *Hymenoscyphus fraxineus* T. Kowalski) and death of many varieties of ash stands located at floodplain forests in the Czech Republic, selection of new tree species with eligible traits is needed. Therefore, grey poplar population with unique phenotype traits located at the Znojmo region (South Moravia, Czech Republic) have been selected as one of the perspective woody plant species for replacement of ash plantings using biotechnology methods.

The main object of the presented study is to explore an effective micropropagation method for grey poplar species with focus on medium composition and type of plant segments used for subsequent regeneration. The influence of three culture media – Murashige and Skoog medium (MS), woody plant medium (WPM), and medium according to LAMBARDI et al. (2000) (LAM) differing in nutrition and phytohormone compositions have been followed in relation to shoot-tip segments growth. The best regeneration responses of plants during three weeks of cultivation have been achieved on MS medium enriched in glutamine (10 mg.l⁻¹), glycine (2 mg.l⁻¹), BAP (0.2 mg.l⁻¹) and IBA (0.1 mg.l⁻¹) in comparison to WPM and LAM medium (Fig. 2 and 3). According to spectrophotometric analysis of photosynthetic pigments including chlorophylls *a* and *b* (Chl *a* and Chl *b*) and carotenoids (Cars) by using 80% acetone as extractant solvent, no significant differences in pigment concentrations have been detected on MS and WPM media ($p > 0.05$), even though the obvious anthocyanins formation at the marginal parts of leaves as well as at the base of segments were determined on WPM medium especially after three weeks of cultivation (Fig. 3, 4 and 5; Table 1). Additionally, apical segments cultivated on LAM medium exhibited significant reduction of photosynthetic pigments down to 31.57% (Chl *a*), 39.13% (Chl *b*) and 44.51% (Cars) in comparison to MS medium (Fig. 4 and 5). Similar trends with significant decrease of Chl and Cars contents were evaluated in variant LAM contrary to variant WPM medium in which the contents of Chl *a*, Chl *b* and Cars were up to 95.74%, 108.6% and 106.26% respectively (Fig. 5 and 6). Moreover, *in vitro* organogenesis from grey poplar apical and nodal segments revealed faster shoots regeneration and subsequent proliferation in excised apical segments on selected MS medium in comparison to excised nodal segments in which lateral buds formations was unequal and delayed due to excessive adventitious shoots formation at the base of segments (Fig. 6). The enormous formation of adventitious shoots has also negative effects in the point of time demandingness during manipulation and micropropagation of plants. These results clearly indicate that modified MS medium containing plant growth regulators has positive effects on plant growth and vitality of grey poplars, while apical segments are the most desirable for *in vitro* shoot regeneration. In summary, we found the importance of medium composition and a type of segments used for efficient *in vitro* micropropagation technique of grey poplar.

Zasláno/Received: 08. 08. 2017

Přijato do tisku/Accepted: 03. 10. 2017