

METODA RYCHLÉ REGENERACE TOPOLU ŠEDÉHO (*POPULUS ×CANESCENS* AITON SM.) S VYUŽITÍM *IN VITRO* ORGANOGENEZE



Ing. EVA ŽIŽKOVÁ, Ph.D.
Mgr. MARTINA KOMÁRKOVÁ
Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.

**Metoda rychlé regenerace topolu šedého
(*Populus ×canescens* Aiton Sm.)
s využitím *in vitro* organogeneze**

Certifikovaná metodika

Ing. Eva Žižková, Ph.D.

Mgr. Martina Komárková

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Strnady 2017

Lesnický průvodce 5/2017

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

Publikace vydané v řadě Lesnický průvodce jsou dostupné v elektronické verzi na:

http://www.vulhm.cz/lesnicky_pruvodce

Vedoucí redaktor: Ing. Jan Řezáč; e-mail: rezac@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-147-5

ISSN 0862-7657

METHOD OF RAPID REGENERATION OF GREY POPLAR (*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.) USING *IN VITRO* ORGANOGENESIS

Abstract

To preserve valuable phenotype traits of grey poplars (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.) located in floodplain forest at Dyjákovice village (South Moravia, Czech Republic), method for vegetative reproduction using biotechnology technique has been developed. *Ex situ* clonal propagation was established according to *in vitro* organogenesis proceedings followed by shoots proliferation, multiplication of explants and induction of roots formation. Subsequently, the vital, regenerating and growing explants of grey poplars achieving the appropriate qualitative parameters have been rooted and transferred into the substrate to be gradually adapted for semi-sterile greenhouse conditions. The medium composition and manipulation with plant tissue cultures during cultivation are in detail described in this method with respect to all persons interested in.

Key words: grey poplar (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.), organogenesis, plant tissue cultures, micropropagation, acclimatization

Oponenti: Ing. Zuzana Vondráková, Ph.D.; Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Laboratoř biologicky aktivních látek

Ing. Miloš Pařízek; Ústav pro hospodářskou úpravu lesů Brandýs nad Labem, pobočka Hradec Králové

Adresa autorek:

Ing. Eva Žižková (Pokorná), Ph.D.; Mgr. Martina Komárková; Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.;
Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

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

e-mail: pokorna@vulhm.cz
komarkova@vulhm.cz
machova@vulhm.cz
cvrckova@vulhm.cz

Podíly autorek:

E. Žižková 30 %, M. Komárková 30 %, P. Máchová 20 %, H. Cvrčková 20 %

Obsah:

1	ÚVOD	7
2	CÍL METODIKY	8
3	VLASTNÍ POPIS METODIKY	8
3.1	Princip metody	8
3.2	Materiální a technické zabezpečení	9
3.3	Zakládání primárních kultur, mikropropagace a multiplikace topolu šedého	10
3.4	Aklimatizace mikrořízků	12
4	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	16
5	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	16
6	EKONOMICKÉ ASPEKTY	17
7	DEDIKACE	17
8	LITERATURA	18
8.1	Seznam použité související literatury	18
8.2	Seznam publikací, které předcházely metodice	19
	Summary	20

1 ÚVOD

Domácí druhy topolů jsou v lesních ekosystémech nenahraditelné z hlediska lesního hospodářství, neboť tvoří hlavní složku stromového patra lužních lesů (ČÍŽKOVÁ 2007). Topol šedý (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) z čeledi vrbových (*Salicaceae*) je spontánní kříženec topolu bílého (*Populus alba* L.) a topolu osiky (*Populus tremula* L.) s rozšířením v České republice zejména v úvalech řek Moravy, Dyje, Svatky a Odry. Roste na půdách bohatších, kyprých a vlhkých, ale dobře snáší i sušší a chudší stanoviště, včetně kyslejších půd. Kořenový systém topolu šedého je mohutně vyvinutý a vyznačuje se vysokou kořenovou výmladností s rozsahem až za obvod koruny (MOTTTL 1998; ÚRADNÍČEK et al. 2009). Pro rychlý růst, během něhož dosahují stromy výšek až 35 m již ve věku 30–40 let, lze topol šedý využít v lesním hospodářství nejen z hlediska produkce dřeva a biomasy, ale i v rámci ochranných opatření, např. při ochraně proti půdní erozi a při tvorbě zeleně v krajině (MOTTTL 1998; ÚRADNÍČEK et al. 2009).

Na území České republiky se unikátní a lesnický cenná populace topolu šedého nachází v lužních lesích na Znojemsku (LS Znojmo, revír Jaroslavice, lokalita Lužní les u Dyjákovic), je tvořena jedinci vyšších věkových tříd s cennými fenotypovými znaky, např. úzkou korunou a rovným průběžným kmenem s dobrým čištěním (BURIÁNEK, NOVOTNÝ 2016). V téže lokalitě jsou umělou obnovou zakládány porosty olše a jasanu, které v současné době podléhají infekčnímu tlaku houbových patogenů *Hymenoscyphus fraxineus* s anamorfním stadiem *Chalara fraxinea* T. Kowalski a *Phytophthora* spp, v jejichž důsledku dochází k chřadnutí a odumírání porostů (ČERNÝ et al. 2016; LIŠKA, LORENC 2017). Topol šedý patří mezi jednu z mála perspektivních dřevin, která dokáže posílit stabilitu a podpořit biodiverzitu lužních lesů. Jelikož přirozená obnova tohoto druhu 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*.

2 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsání efektivního způsobu vegetativní reprodukce topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton (Sm.)) s využitím biotechnologických postupů *in vitro* organogeneze. Uvedené standardizované postupy lze využít např. pro zachování a reprodukci cenných genotypů s vysokou produkční schopností, nacházejících se v lužních lesích na lokalitě Dyjákovice (revír Jaroslavice, LS Znojmo).

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Princip metody

Vegetativní reprodukce topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) metodou *in vitro* organogeneze je jedním z efektivních způsobů vegetativního rozmnožování. Touto metodou lze zajistit geneticky identický sadební materiál u vybraných jedinců v relativně krátkém časovém období (4 měsíce). Princip metody spočívá v založení primárních kultur z dormantních pupenů vybraných donorových jedinců topolu šedého, které jsou po povrchové sterilizaci přeneseny do aseptických podmínek na agarová živná média, na nichž je cíleně stimulována tvorba výhonů. Při dostatečném nárůstu nadzemní části rostlin jsou explantátové kultury pasážovány a multiplikovány v pravidelném intervalu za účelem získání dostatečného množství rostlinného materiálu. Vypěstované mikrořízky jsou přeneseny na zakořeňovací agarové živné médium, z něhož jsou rostliny s vyvinutými kořeny umístěny do semi-sterilních podmínek a přesazeny do sadbovačů naplněných agroperlitem. Mladé rostliny jsou postupně aklimatizovány na prostředí s nízkou relativní vlhkostí a poté jsou vysazeny do substrátu obsahujícího příměs perlitu a rašeliny. Pro dopěstování jsou výpěstky nejprve umístěny do skleníku a poté do venkovních podmínek, s cílem získat výsadby schopné sazenice. Vzhledem k velmi rychlé regeneraci, růstu, vysoké schopnosti zakládání postranních výhonů a nenáročnosti na obsah makroelementů i mikroelementů v živných médiích, je topol šedý velmi vhodnou dřevinou pro *in vitro* mikropropagaci.

V souhrnu metodika popisuje postup přípravy rostlinného materiálu pro stimulaci organogeneze v *in vitro* podmínkách a následnou aklimatizaci na podmínky *ex situ*.

3.2 Materiální a technické zabezpečení

Přístrojové vybavení:

analytické váhy, autokláv, horkovzdušný sterilizátor, laboratorní míchačka, lednička, kultivační box, laminární box, sterilizátor laboratorních nástrojů, pH metr, kahan

Chemikálie:

destilovaná voda, médium Murashige a Skoog (1962) komerčně dostupné pod názvem Murashige and Skoog Basal Salt Mixture nebo komponenty, z nichž se médium připravuje (dusičnan amonný, dusičnan draselný, chlorid vápenatý, síran hořečnatý, dihydrogen fosforečnan draselný, železito-sodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové, síran železnatý, kyselina boritá, síran manganatý, síran zinečnatý, síran měďnatý, jodid draselný, molybdenan disodný, chlorid kobaltnatý, thiamin a myo-inositol), kyselina nikotinová, pyridoxin-HCl, glycin, glutamin, 6-benzylaminopurin (BAP), kyselina indol-3-máselná (IBA), agar (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o.), sacharóza, hydroxid draselný, ethanol, komerčně dostupné dezinfekční činidlo KORSOLEX®plus (9,2 g N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin a 13,0 g didecyltrimethylammoniumchlorid).

Drobné pomůcky:

pinzeta, skalpel, lžičky, váženky, pipety a špičky, magnetické míchadlo, odměrný válec, stojánek na nástroje, Petriho miska skleněná 15 cm, kruhové filtrační papíry 12,5 cm, sirky, buničina, sterilní nádoby pro kultivaci *in vitro* explantátů, mikrote nové sáčky, chladicí taška, sadbovače s podtácky, plastové uzavírací nádoby

Požadavky na práci:

Při převádění dormantních pupenů z *ex vitro* do *in vitro* podmínek je nezbytné dodržovat aseptické podmínky při manipulaci s rostlinným materiálem, aby byla s nejvyšší účinností eliminována případná externí kontaminace.

Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro založení explantátových kultur topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) jsou rouby (čerstvé vitální větvičky, nejvhodněji z terminálních výhonů s počtem cca 5–10 pupenů) z vybraných donorových jedinců (sběr cca

30 pupenů od každého) odebrané v jarním období před vyrašením pupenů (konec února/ začátek března v závislosti na klimatických podmínkách). Odebraný rostlinný materiál se řádně označí, vloží do mikrotenových sáčků, uchovává se v chladicí tašce pro převoz do laboratoře, kde je uskladněn při teplotě 4 °C do následného zpracování (materiál by měl být zpracován neprodleně během několika dní).

Kultivační média

Založení primárních kultur a multiplikaci *in vitro* rostlin provádíme na tzv. indukčním médiu (Tabulka 1), které připravíme buď rozpuštěním komerčně dostupné směsi Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS; Sigma-Aldrich), nebo jednotlivých makroelementů a mikroelementů ve složení a koncentraci uvedených podle MURASHIGE a SKOOG (1962) v destilované vodě a obohacené o glutamin (10 mg.l⁻¹), glycin (2 mg.l⁻¹), IBA (0,1 mg.l⁻¹), BAP (0,2 mg.l⁻¹) a sacharózu (30 g.l⁻¹). Agar se přidává v množství 6 g.l⁻¹ a pH = 5,8 se upravuje pomocí 1M KOH. Pro stimulaci tvorby kořenů používáme tzv. zakořeňovací médium (Tabulka 1), které se skládá z poloviční koncentrace makroelementů i mikroelementů obsažených v MS médiu, glutaminu (10 mg.l⁻¹), glycinu (2 mg.l⁻¹), IBA (0,5 mg.l⁻¹), sacharózy (5 g.l⁻¹) a agaru (6 g.l⁻¹). Finální hodnota pH = 5,8 v roztoku se upravuje pomocí 1M KOH. Kultivační média rozléváme do připravených kultivačních nádob, které byly před použitím umístěny do horkovzdušného sterilizátoru (160 °C/ 2 h). Živná média obsahující všechny komponenty včetně fytohormonů sterilizujeme při 120 °C v autoklávu po dobu 20 minut. Média jsou uchovávána při laboratorní teplotě pro následné použití.

3.3 Zakládání primárních kultur, mikropropagace a multiplikace topolu šedého

Pupeny se sterilizují 20 min v saponátu Tween*20 (2 kapky na 10 ml), 20 min v roztoku KORSOLEX*plus (25 ml/ 500 ml destilované vody), následně se promývají 20 min pod tekoucí vodou, na 15 min jsou ponořeny do roztoku HgCl₂ (1 mg.l⁻¹) a na závěr jsou v laminárním flow-boxu 3 × ponořeny na 15 min do sterilní destilované vody. Takto ošetřené pupeny se přemístí do sterilní nádoby naplněné sterilní destilovanou vodou, kde setrvávají pro následnou manipulaci. Z pupenů se odstraní ve sterilním prostředí na Petriho misce pomocí skalpelu a pinzety povrchové šupinky. Extirpované vzrostné vrcholy se umístí do sterilních nádob obsahujících indukční médium. Pro úspěšnou organogenezi je nezbytné nepoškodit vzrostný

vrchol, který obsahuje meristematické buňky schopné buněčného dělení, tedy růst a vývoj rostlinných orgánů (zejména prýtlů) za optimálního poměru fytohormonů v kultivačním médiu. Založené explantátové kultury se udržují v řízených světelných i teplotních podmínkách (21 °C, 16 h/ 8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Po 4–6 týdnech dochází k proliferaci nasazených explantátů v prýtl (Obr. 1A). Do období zajištění dostatečného množství mikrořízků, než

Tab. 1: Složení Murashige a Skoog (MS) kultivačního média používaného pro založení *in vitro* primárních kultur rostlin, multiplikaci a zakořenění explantátů.

	Chemikálie	Indukční médium mg.l ⁻¹	Zakořňovací médium mg.l ⁻¹
Makroelementy	KNO ₃	1900	950
	NH ₄ NO ₃	1650	825
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	220
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185
	KH ₂ PO ₄	170	85
Mikroelementy	Na ₂ EDTA	37,3	18,65
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	13,9
	H ₃ BO ₃	6,2	3,1
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	8,45
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	4,3
	KI	0,8	0,4
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,125
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	0,125
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0125
Vitamíny a organické látky	Myo-inositol	100	50
	Thiamin	1	0,5
	Kyselina nikotinová	0,5	0,25
	Pyridoxin HCl	0,5	0,25
	Glutamin	10	10
	Glycin	2	2
Fytohormony	BAP	0,2	-
	IBA	0,1	0,5

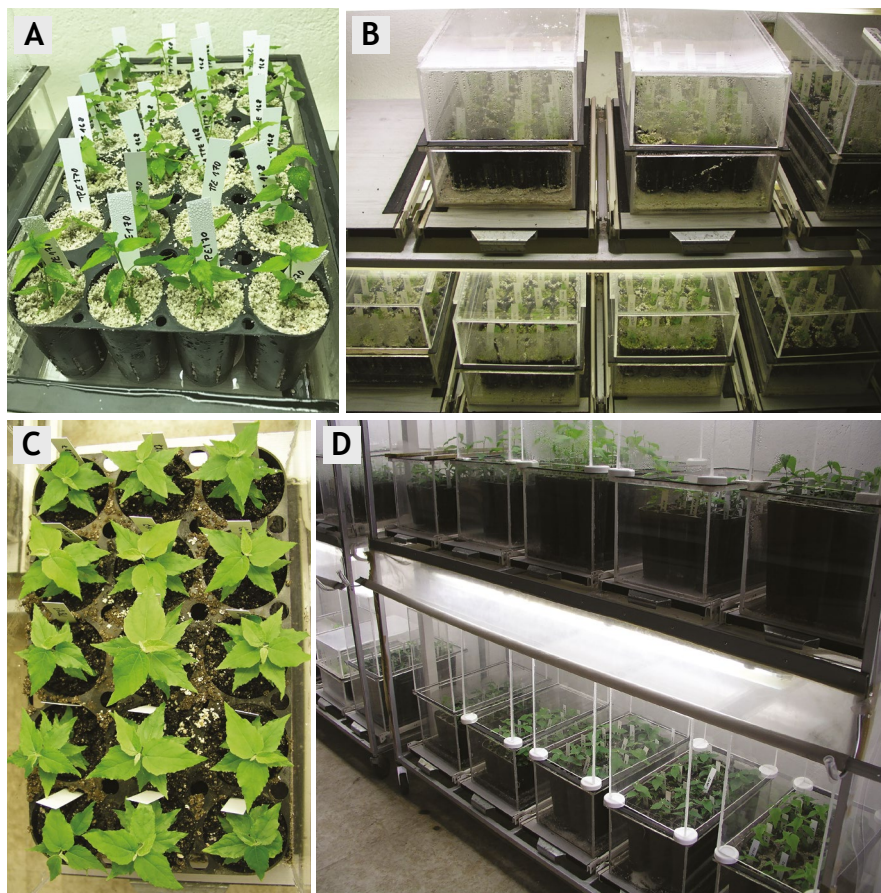
se přemístí do semi-sterilních podmínek (20 ks prýtů od každého vybraného klonu), jsou axilární, případně adventivní výhony multiplikovány na živném médiu (zpravidla 2 mikrořízky ve sterilní nádobě) s přibližným intervalem regenerace 3–4 týdny (Obr. 1B), který je shodný s intervalem i pro jiné druhy topolů, např. topol osika (MALÁ et al. 2010), topol bílý (KESERÜ et al. 2015) a topol černý (WHITEHEAD a GILES et al. 1977). Je však nezbytné zmínit, že během mikropropagace se mohou projevit výrazné klonové rozdíly u explantátů topolu šedého v *in vitro* kulturách nejen v rychlosti přirůstání a zakládání výhonů, ale i ve schopnosti tvořit kořeny. Jedná se pravděpodobně o projev vlastností použitého mikrořízku (např. velikost a část segmentu a vývojové stadium) a samotného genotypu rostliny, přičemž všechny rostliny využíváme k zakořenění.

Ke stimulaci zakořenění dochází přesazením kultur v multiplikační fázi (vždy po 1 výhonu ve sterilní nádobě) na zakořeňovací médium (vždy po 1 výhonu ve sterilní nádobě) se zvýšenou koncentrací fytohormonu IBA ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$). Z celé skupiny testovaných auxinů uvedl JIANG et al. (2015) za nejúčinnější fytohormon stimulující tvorbu kořenů u topolu kanadského (*Populus xeuramericana* 'Neva') právě exogenní aplikaci IBA v koncentraci 1 mg.l^{-1} . Po zhruba 1–2 týdnech je patrná tvorba kořenů (Obr. 1C a 1D). Dostatečně vyvinuté mikrořízky s kořeny, u nichž je kvalita posuzována vizuálně na základě morfologických znaků (délka primárního kořene a tvorba postranních kořenů), jsou následně přesazeny do připraveného agropertilu za účelem dopěstování kompletních rostlin. Po celou dobu udržování rostlin v *in vitro* podmínkách je důležité průběžně sledovat zdravotní stav explantátových kultur z důvodu snížení rizik nežádoucích kontaminací. V případě výskytu kontaminace způsobenou plísní nebo bakterií je rostlinný materiál neprodleně vyrazen ze sbírký explantátů a zlikvidován.

3.4 Aklimatizace mikrořízků

In vitro zakořeněné explantáty se přesazují do sadbovačů Quick Pot T 35 naplněných agroperlitom (Perlit Praha spol. s r. o.), které se umístí do plně přiklopených plastových boxů (Obr. 2A a 2B). Přirůstající výhony jsou pravidelně zalévány tekutým živným MS médiem, které neobsahuje fytohormony a sacharózu a je ředěno v poměru 1 : 10 destilovanou vodou. Po 1–2 týdnech aklimatizace (21°C , 24 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) v sadbovačích jsou dobře vyvinuté rostliny přesazeny do větších sadbovačů Quick Pot T 60 (Obr. 2C) obsahujících nesterilní pěstební substrát připravený ze směsi zeminy (Zahradnický substrát a. s. Soběslav), rašeliny (Rašelina a. s. Soběslav) a perlitu (Perlit Praha

nemají ochranné mechanismy v podobě voskové kutikuly, trichomů, regulace prů-
 duchů, vyznačují se přítomností velkých mezibuněčných prostor se sníženou dife-
 renciací palisádových buněk a nízkým obsahem chlorofylu (HAZARIKA et al. 2003;
 KANG a CHUN 1997), proto je nezbytná zvýšená pozornost a kontrola z hlediska
 stavu rostlin. Příkladem může být včasná diagnostika např. sníženého turgoru vody



Obr. 2: Aklimatizace topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) na semi-sterilní podmínky. Růst mikrořízků ve zcela zakrytých sadbovačích obsahující agroperlit (2A a 2B) a jejich následná kultivace v substrátu s postupným snižováním relativní vlhkosti vzduchu (2C a 2D).

v pletivech rostlin (uvadání), které může signalizovat nedostatečnou aklimatizaci na nižší relativní vlhkost v okolním prostředí (PROCHÁZKA et al. 2003).

Po zcela plném odklopení plastového krytu jsou rostliny přemístěny na plochu s možností částečné regulace cirkulace vzduchu, na níž rostliny setrvají přibližně 1–2 týdny. Po adaptaci a otužení se jedinci s dostatečně vyvinutými kvalitními fenotypovými znaky (Obr. 3A) přenesou do venkovního skleníku (Obr. 3B a 3C). Doporučujeme zvolit při přenosu rostlin do skleníku vegetační období, kdy se průměrné denní teploty pohybují mezi 10–25 °C. Ve skleníku probíhá adaptace rostlin topolu šedého na denní světlo, rostliny jsou pravidelně zalévány a kontrolovány



Obr. 3: Adaptované rostliny topolu šedého (*Populus xcanescens* Aiton Sm.) (3A) a jejich umístění do skleníku (3B a 3C) s následným přemístěním na venkovní záhon (3D).

z hlediska zdravotního stavu s důrazem na výskyt chorob a škůdců. Pro dokončení úplné aklimatizace jsou sadbovače s rostlinami přeneseny na venkovní záhony zastíněné textilií za účelem dopěstování výsadby schopných sazenic (Obr. 3D).

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Standardizovaná metodika vegetativní reprodukce topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) s využitím biotechnologických postupů pro dopěstování výsadby schopných sazenic nebyla dosud u vybraného druhu topolu popsána. Vzhledem k velkému zájmu LČR, s. p., o uchování cenných jedinců topolu šedého nacházejících se v lužním lese revíru Jaroslavice u obce Dyjákovice a provozně nízké spolehlivosti metody množení s využitím dřevitých řízků je reprodukce topolu šedého zejména prostřednictvím organogeneze *in vitro* jedinou cestou, jak získat geneticky identický sadební materiál hospodářsky cenných klonů v množství, které je omezováno pouze výrobními kapacitami.

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je zpracována v přehledné formě za účelem poskytnout získané zkušenosti a poznatky vegetativního množení topolu šedého pomocí biotechnologických postupů. Využití poznatků od založení primárních kultur, multiplikace, zakořeňování, aklimatizace až po získání výsadby schopných výpěstků je určeno nejen pro pracovníky z lesního provozu, státní správy, výzkumných institucí, univerzit, školkařských firem, ale i pro individuální zájemce o danou problematiku. Předložená metodika může být vhodnou předlohou pro zachování i jiných, nejen hospodářsky cenných druhů lesních dřevin s využitím biotechnologických postupů, např. v rámci Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou odvislé od skutečnosti, jestli se zavádí zcela nový provoz pro mikropropagaci topolu šedého nebo se uvedená metodika implementuje na pracovištích s provozem tkáňových kultur. V případě, že laboratoř již pracuje s explantáty v aseptických podmínkách, jsou náklady na zavedení postupu dané především nákupem běžných chemikálií pro přípravu kultivačních médií a potřebného spotřebního materiálu. V druhém případě, kdy se zavádí zcela nový provoz pro práci s *in vitro* kulturami se náklady značně navyšují o vybavení pro sterilizaci materiálu a kultivačních médií: autokláv a horkovzdušný sterilizátor (od 150 tis. Kč), práci s tkáňovými kulturami: kultivační box a laminární box (od 450 tis. Kč), přístroje pro přípravu a uchování kultivačních médií: analytické váhy, stolní pH-metr, laboratorní míchačka, chladnička a pipety (od 95 tis. Kč), spotřební materiál související s prací v laboratoři a postupnou aklimatizací v nesterilních podmínkách: sklo, plasty, chemikálie, pinzety, nůžky, skalpely, plastové boxy a sadbovače (80 tis. Kč) a kultivaci ve venkovních podmínkách (skleníků, venkovní záhon).

Ekonomický přínos pro uživatele souvisí zejména s vyšší jistotou zachování a namnožení vybraných jedinců s fenotypově i genotypově cennými vlastnostmi, neboť metoda vegetativního množení topolu šedého řízkováním není zdaleka tolik úspěšná. Ze založených explantátových kultur lze uvedenými metodickými postupy získat v krátkém časovém úseku neomezené množství výsadby schopných výpěstků.

7 DEDIKACE

Metodika byla zpracována skupinou autorů ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., v rámci řešení výzkumných projektů NAZV QJ1520297 „*Záchrana a reprodukce cenné populace topolu šedého*“ (80% podíl), NAZV QJ1630301 „*Tvorba nových systémů biotechnologických opatření pro zachování a rozvoj biodiverzity zemědělských plodin a lesních dřevin*“ (10% podíl) a ústavního výzkumného projektu financovaného na základě institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0116 č. j. 10462/2016-MZE-17011 (10% podíl).

8 LITERATURA

8.1 Seznam použité související literatury

- BURIÁNEK V., NOVOTNÝ P. 2016. Metodická příručka k určování domácích druhů topolů. Lesnický průvodce, 11: 35 s.
- ČERNÝ K., HAVRDOVÁ L., ZLATNÍK V., HRABĚTOVÁ M. 2016. Pěstování jasanu v prostředí s výskytem *Hymenoscyphus fraxineus*. Certifikovaná metodika. Pardubice, Studio Press: 53 s.
- ČÍŽKOVÁ L. 2007. Možnosti ochrany genových zdrojů domácích druhů topolů. In: Dreslerová J., Packová P. (eds.): Ohrožené dřeviny ČR. Geobiocenologické spisy, sv. č. 12, Brno: 57-60.
- ČÍŽKOVÁ L. 2007. Domácí topoly se stávají vzácnými dřevinami. Lesu zdar, 13 (2): 15-17.
- HAZARIKA B. N. 2003. Acclimatization of tissue cultured plants. Current Science, 85: 1705-1712.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., SOUDEK P., ŠÍMA P. 2010. Užití krátkodobé hydroponie pro selekci vhodných druhů listnatých dřevin využitelných pro remediační účely. Strnady, VÚLHM: 19 s. Lesnický průvodce, 3/2010.
- 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. Acta Pruhoniana: 85 s.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- JIANG C., Liu Z., Zheng Q. 2015. Direct regeneration of plants derived from in vitro cultured shoot tips and leaves of poplar (*Populus x euramericana* 'Neva'). Journal of Life Sciences, 9: 366-372.
- 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.

- KESERÜ Z., BALLA I., ANTAL B., RÉDEI K. 2015. Micropropagation of Leuce-poplars and evaluation of their development under sandy site conditions in Hungary. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica*, 11: 139-152.
- 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. Zpravodaj ochrany lesa: 22-25.
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J. a kol. 2003. Fyziologie rostlin. Praha, Academia: 484 s.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce: 294 s.
- WHITEHEAD H. C. M., GILES K. L. 1977. Rapid propagation of poplars by tissue culture methods. *New Zeland Journal of Forestry Science*, 7: 40-43.

8.2 Seznam publikací, které předcházely metodice

- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L.: Aspen micropropagation: use for phytoremediation of soils. *Journal of Forest Science*, 52, 2006, č. 3, s. 101-107.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L., SOUDEK P.: Effective micropropagation of mature aspen: use in breeding. *Acta Horticulturae*, 2007, 764, s. 239-246.
- MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J.: Transformace hybridní osiky pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. *Zprávy lesnického výzkumu*, 52, 2007, č. 4, s. 354-360.
- POKORNÁ E., BURIÁNEK V., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., KOMÁRKOVÁ M.: Nové poznatky o reprodukci topolu šedého (*Populus x canescence*) v *in vitro* podmínkách. *Zprávy lesnického výzkumu*, přijato do tisku.

METHOD OF RAPID REGENERATION OF GREY POPLAR (*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.) USING *IN VITRO* ORGANOGENESIS

Summary

This method presents micropropagation technique of grey poplar (*Populus* × *canescens* Aiton Sm.), which belongs for its rapid growth, high regenerative ability and early reproductive maturity to a very suitable woody plant species used for cultivation under aseptic conditions. Natural population of grey poplar located in floodplain forest at Dyjákovice village (South Moravia of the Czech Republic) is characterized by unique and valuable phenotype traits. According to a very low reproduction success of grey poplar by cutting, method of vegetative propagation based on *in vitro* organogenesis has been developed. Detail proceedings of organogenesis, multiplication, rooting and acclimatization have been followed with a high attention to vitality and regeneration of plant tissue cultures. Propagated grey poplars were cultivated on modified agar MS medium (Murashige and Skoog, 1962) 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 which rapid regeneration was observed (approximately 3–4 weeks). To induce roots formation, higher concentration of IBA (0.5 mg.l⁻¹) was applied. The healthy and rooting explants have been directly transferred into the pots containing substrate in which they have been gradually acclimatized under the control room conditions. Well adapted plantlets to surrounding environment were placed into the greenhouse and then into the outdoor flower bed, where they remain for next manipulation.

Taken together, we suppose that investigated micropropagation method will provide enough information how to preserve and contribute to gene conservation of grey poplar species.



Výzkumný ústav
lesního hospodářství
a myslivosti, v. v. i.

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 5/2017