

**METODIKA PRO BEZPEČNÉ UCHOVÁNÍ
IN VITRO KULTUR TOPOLU ŠEDÉHO
(*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.)
V ULTRANÍZKÝCH TEPLITÁCH**

LESNICKÝ PRŮVODCE



**Ing. EVA POKORNÁ, Ph.D.
a kol.**

**Certifikované
METODIKY
PRO PRAXI**

5/2018

**Metodika pro bezpečné uchování
in vitro kultur topolu šedého
(*Populus ×canescens* Aiton Sm.)
v ultranízkých teplotách**

Certifikovaná metodika

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.

Ing. Miloš Faltus, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Mgr. Matěj Semerák

Ing. Jiří Zámečník, CSc.

Lesnický průvodce 5/2018

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 978-80-7417-173-4

ISSN 0862-7657

METHODOLOGY FOR SAFE PRESERVATION OF *IN VITRO* CULTURE OF GREY POPLAR (*POPULUS ×CANESCENS* AITON SM.) IN ULTRA-LOW TEMPERATURES

Abstract

This methodology describes two biotechnological approaches including micropropagation and cryopreservation for safe and long-term storage of grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) species under ultra-low temperatures (-196 °C). *In vitro* culture from donor grey poplar dormant buds has been established according to organogenesis induction. Grey poplar shoots were multiplied on modified MS medium enriched in 10 mg.l⁻¹ glutamin, 2 mg.l⁻¹ glycin, 0.2 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.1 mg.l⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA) to ensure sufficient amount of explants for their storage in -196 °C. Grey poplar explants were pre-cultivated for six weeks and then the apical segments were extirpated for cryopreservation protocol. Subsequently, grey poplar apical segments were treated with cryoprotective solutions (vitrification method) and immersed into the liquid nitrogen. Eight weeks after thawing we achieved 90% of regenerated grey poplar apical segments on modified MS medium characterized by shoot growth. The individual steps of micropropagation as well as cryopreservation of grey poplar explants are in details described in this methodology with the assumption to use this protocol for other valuable and threatened woody plant species.

Key words: *in vitro* culture, grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.), cryoprotective solution, cryopreservation

Oponenti: Mgr. Kateřina Eliášová, Ph.D.; Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.; Laboratoř biologicky aktivních látek
Ing. Vlasta Knorová; Ministerstvo zemědělství, Oddělení ochrany lesa

Foto na obálce:

Snímky zachycují izolované vzrostné vrcholy topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) a jejich regeneraci v kontrolních podmínkách, po 4hod. dehydrataci a po 4hod. dehydrataci s následnou kryoprezervací.

Adresy autorů:

Ing. Eva Pokorná, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Mgr. Matěj Semerák

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

Strnady 136

Jíloviště 252 02

email: pokorna@vulhm.cz

machova@vulhm.cz

semerak@vulhm.cz

Ing. Miloš Faltus, Ph.D.

Ing. Jirí Zámečník, CSc.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

Drnovská 507/73

16100 Praha 6

email: faltus@vurv.cz

zamecnikw@vurv.cz

Obsah

1 ÚVOD	7
2 CÍL METODIKY	9
3 VLASTNÍ POPIS METODIKY	10
a) Princip metody	10
b) Materiální a technické zabezpečení	10
c) Zakládání primárních kultur, mikropropagace a multiplikace topolu šedého v <i>in vitro</i> podmínkách	12
d) Předkultivace rostlinného materiálu	14
e) Vitřifikace	14
f) Ošetření ultranízkou teplotou (-196 °C)	16
g) Regenerace rostlinných segmentů	17
4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	18
5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	19
6 EKONOMICKÉ ASPEKTY	20
7 DEDIKACE	21
8 LITERATURA	22
8.1 Seznam použité související literatury	22
8.2 Seznam publikací, které předcházely metodice	23
SUMMARY	24

1 ÚVOD

Rostlinné explantátové kultury (*in vitro* kultury neboli tkáňové kultury) jsou zakládány z izolovaných částí rostlin např. spór, semen, nezralých a zralých zárodků, orgánů, pletiv, jednotlivých buněk i buněk zbavených buněčných stěn (protoplasty), které jsou kultivovány v *in vitro* podmínkách. Pro zakládání a udržování těchto kultur se uplatňuje poznatek vysoké regenerační schopnosti rostlin a rovněž i zachování schopnosti rostlinné buňky dát ostatním buňkám vznik rostlinného těla, tzv. totipotence (PROCHÁZKA et al. 2003; PAVLOVÁ, FISCHER 2011). Růst a vývoj rostlinných explantátů probíhá na živném médiu o definovaném složení ve sterilním prostředí při zcela kontrolovaných podmínkách (GAIKWAD et al. 2017). Tkáňové kultury mají značný význam v rostlinných biotechnologiích, ve kterých umožňují nové přístupy např. v oblasti produkce rostlin a zlepšení jejich stavu, eliminaci chorob, produkci sekundárních metabolitů a bezpečného uchovávání (BHOJWANI 1990). Pro zakládání *in vitro* kultur lesních dřevin se využívají nejrozličnější části rostlinných pletiv a orgánů, od kalusů, embryí, děložních lístků, apikálních a nodálních segmentů, po kořeny, výhonky, dormantní pupeny a jiné (MINOCHA, JAIN 2000).

V České republice jsou ohrožené a cenné druhy lesních dřevin v zájmu pozornosti nejen jednotlivých vlastníků a odborníků z oblasti lesního hospodářství, ale i orgánů státní správy. Ministerstvo zemědělství si v rámci vyhlášeného Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin na období 2014–2018 klade za hlavní cíl zachovat a reprodukovat genofond lesních dřevin jako součást národního bohatství pro budoucí generace. Za tímto účelem je pro budoucí využití hodnotných a ohrožených populací lesních dřevin v lesním hospodářství České republiky zřízena banka osiva a explantátů provozovaná VÚLHM, v. v. i., který dlouhodobě uchovává požadované vzorky konkrétních druhů dřevin ve specifických podmínkách.

Jedním z možných přístupů bezpečného uchování lesních dřevin vedle kultivace explantátových kultur je i využití metody kryoprezervace, která umožňuje v ultranízké teplotě kapalného dusíku (-196 °C) dlouhodobě skladovat genetické zdroje rostlin. Při teplotě kapalného dusíku jsou u rostlinného materiálu pozastaveny nejen metabolické a biochemické procesy, ale i buněčné dělení, u uskladněného rostlinného materiálu neprobíhají změny a nedochází ke zhoršení jeho stavu (KAVIANI 2011). V této metodice je za modelovou dřevinu určenou ke kryoprezervaci explantátových kultur lesních dřevin vybrán topol šedý (*Populus ×canescens* Aiton Sm.), který je z hlediska rychlé regenerace a poměrně krátkého intervalu

3–4 týdnů multiplikace mikrořízků (ŽIŽKOVÁ et al. 2017) velmi vhodnou dřevinou pro optimalizaci postupu kryoprezervace s následným využitím i pro jiné druhy lesních dřevin. POKORNÁ et al. (2017) zjistili, že topol šedý nejlépe roste na živném Murashige a Skoog médiu (MURASHIGE, SKOOG 1962) obohaceném o glutamin (10 mg.l^{-1}), glycin (2 mg.l^{-1}), BAP ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$) a IBA ($0,1 \text{ mg.l}^{-1}$), přičemž extirpované vzrostné vrcholy jsou vhodnějším materiálem k mikropropagaci explantátů ve srovnání s nodálními segmenty. Tyto poznatky jsou v metodice uplatněny zejména pro zajištění dostatečného materiálu určeného ke kryoprezervaci. Předkládaná metodika bezpečného a dlouhodobého uchování topolu šedého v životaschopném stavu při působení ultranízké teploty je zaměřena na aplikaci jedné z kryoprezervačních technik, a to vitifikaci s využitím kryoprotektivních roztoků.

2 CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je popsat bezpečný a dlouhodobý způsob uchování *in vitro* kultur topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) v ultranízkých teplotách (-196 °C). Významnou součástí metodiky je pracovní postup, který podrobněji popisuje hlavní kroky kryoprezervace topolu šedého shrnuté v částech a) princip metody, b) materiální a technické zabezpečení, c) zakládání primárních kultur, mikropropagace a multiplikace topolu šedého v *in vitro* podmínkách, d) předkultivace rostlinného materiálu, e) vitrifikace, f) ošetření ultranízkou teplotou (-196 °C) a g) regenerace rostlinných segmentů. Metodické postupy uplatněné pro kryokonzervaci explantátových kultur topolu šedého lze s příslušnými modifikacemi využít i pro další druhy lesních dřevin. Uvedený vitrifikační postup jsme vyzkoušeli např. pro jablň lesní (*Malvus sylvestris* L.).

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

a) Princip metody

Metoda je založena na bezpečném a dlouhodobém uchování vybraných druhů lesních dřevin pro budoucí generace s využitím vitrifikačního postupu, při kterém jsou aplikovány kryoprotektivní roztoky snižující obsah vody v rostlinných buňkách a pomocí nichž se může dosáhnout až tzv. skelného stavu (amorfní pevná fáze hmoty, která umožňuje uchování rostlinného materiálu ve stabilním a funkčním stavu zabraňující tvorbě ledových krystalů). K navození optimálního stavu rostlinného materiálu určeného ke kryoprezervaci předchází proto několik opatření, které je nezbytné z hlediska úspěšnosti metody dodržet. Jedná se především o aklimatizaci *in vitro* kultur v kultivační místnosti se sníženou teplotou (4 °C) po dobu 6 týdnů a aplikaci roztoku sacharózy k rostlinným explantátům 2 týdny před izolací vzrostných vrcholů. V průběhu vitrifikace jsou postupně aplikovány kryoprotektivní roztoky se zvyšující se koncentrací sacharózy pro dosažení skelného stavu u rostlinných buněk před uchováním v ultranízkyých teplotách (-196 °C).

b) Materiální a technické zabezpečení

Přístrojové vybavení:

analytické váhy, autokláv, horkovzdušný sterilizátor, laboratorní míchačka, chladnička, kultivační box, laminární box, sterilizátor laboratorních nástrojů, pH metr, kahan, Dewarova nádoba na kapalný dusík, Dewarova nádoba pro uložení vzorků v kapalném dusíku, PC, tiskárna čárového kódu, tiskárna

Chemikálie:

destilovaná voda, médium MURASHIGE, SKOOG (1962) komerčně dostupné pod názvem Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS; Sigma-Aldrich) 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, glycerol, hydroxid draselný, ethanol, kapalný dusík, komerčně dostupné dezinfekční činidlo KORSOLEX®plus (9,2 g N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin a 13,0 g didecyldimethylammoniumchlorid) (BODE).

Drobné pomůcky:

pinzeta, skalpel, nůžky, lžičky, váženky, pipety a špičky, magnetické míchadlo, odměrný válec, Erlenmeyerova baňka, skleněné kádinky, stojánek na nástroje, hliníková fólie, hliníkové plíšky 20×6×0,05 mm, injekční jehly 0,7×40 mm, skleněné kultivační nádoby, Petriho misky skleněné (průměr 15 cm), Petriho misky plastové (průměr 6 cm), kruhové filtrační papíry 12,5 cm, zápalky, buničina, sterilní nádoby pro kultivaci *in vitro* explantátů, kryozkumavky 1,8 ml (NUNC, Thermo Fisher Scientific), polystyrénový džbán, stojánek na kryozkumavky, parafilm, mikrotenový sáček, chladicí taška.

Požadavky na práci:

Při zakládání výchozích explantátových kultur metodou organogeneze je při převádění dormantních pupenů z *ex vitro* do *in vitro* podmínek nezbytné dodržovat aseptické podmínky při manipulaci s rostlinným materiálem, aby byla s nejvyšší účinností eliminována případná externí kontaminace. Značné obezřetnosti je potřeba i při manipulaci s kapalným dusíkem (-196 °C), který může způsobit nenávratné poškození tkáně.

Rostlinný materiál

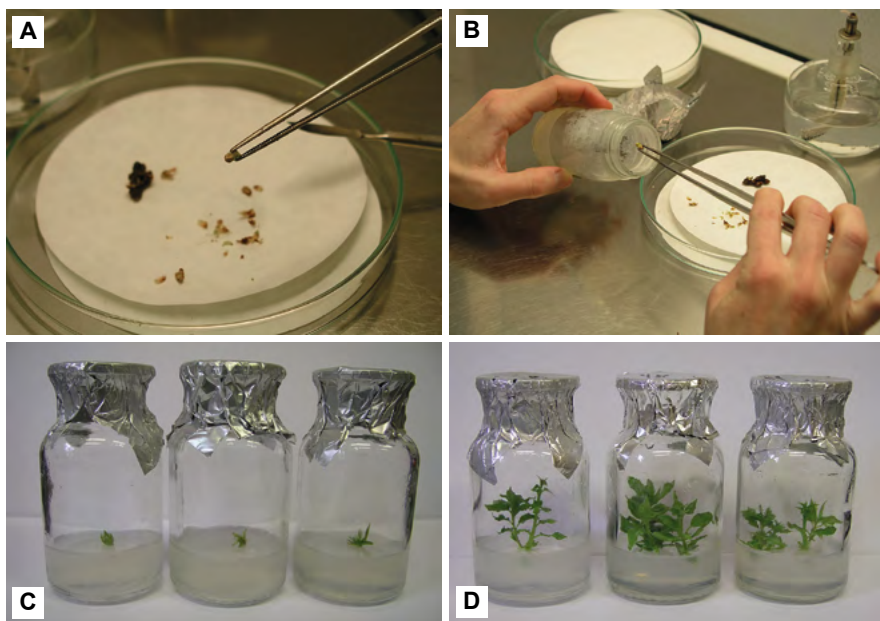
Výchozím materiálem pro založení *in vitro* kultur modelové dřeviny topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) jsou rouby (čerstvé vitální větvičky, nejvhodněji z terminálních výhonů s počtem cca 5–10 pupenů; celkem cca 30 pupenů) odebírané v jarním období před vyrašením pupenů (konec února/ začátek března v závislosti na klimatických podmínkách). Odebraný rostlinný materiál se vloží do mikrotenového sáčku, uchovává se v chladicí tašce pro převoz do laboratoře, kde je uskladněn při teplotě 4 °C pro následující včasné zpracování pro založení primárních explantátových kultur.

c) Zakládání primárních kultur, mikropropagace a multiplikace topolu šedého v *in vitro* podmínkách

Pupeny topolu šedého se sterilizují 20 min v saponátu Tween®20 (2 kapky na 10 ml), 20 min v dezinfekčním 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 skleněné sterilní nádoby naplněné sterilní destilovanou vodou s navazujícím umístěním do laminárního flowboxu, kde jsou následně zpracovány. Z pupenů se odstraní ve sterilním prostředí na skleněné Petriho misce pomocí skalpelu a pinzety povrchové šupiny (Obr. 1A). Ošetřené pupeny se vzrostným vrcholem se umístí do sterilních nádob obsahujících indukční médium (Obr. 1B a 1C). Toto médium 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 v publikaci MURASHIGE a SKOOGA (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. Kultivační médium rozléváme do skleněných kultivačních nádob, které byly před použitím ošetřeny v horkovzdušném sterilizátoru (160 °C/ 2 h). Kultivační nádoby o celkovém objemu 200 ml naplněné cca 50 ml živným médiem, obsahující všechny komponenty včetně fytohormonů sterilizujeme při 120 °C v autoklávu po dobu 20 minut. Vysterilizované kultivační nádoby s příslušným živným médiem jsou uchovávány při laboratorní teplotě pro následné použití.

Pro úspěšnou indukci organogenní aktivity je nezbytné nepoškodit vzrostný vrchol, který obsahuje meristematické buňky schopné buněčného dělení (Obr. 2), a podpořit růst a vývoj rostlinných orgánů pomocí aplikace optimálního poměru fytohormonů v kultivačním médiu (viz indukční médium). Založené explantátové kultury (Obr. 1C) se udržují v řízených světelných i teplotních podmínkách (21 °C, 16 h/ 8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení 30 μmol.m⁻².s⁻¹). Po 4–6 týdnech dochází k proliferaci nasazených explantátů v prýty. Axilární, případně adventivní výhony jsou pasážovány jednou za 14 dnů na multiplikačním živném médiu (Obr. 1D) s přibližným intervalem regenerace prýtů 3–4 týdny. Uvedené časové rozpětí regenerace je shodné s intervalem i pro jiné druhy topolů, např. topol osika (MALÁ et al. 2010), topol bílý (KESERÜ et al. 2015) a topol černý (WHITEHEAD, GILES et al. 1977). Pasážování explantátů topolu šedého provádíme do období zajištění dostatečného množství mikrořízků s odpovídajícím množstvím vzrost-

ných vrcholů (cca 300 vzrostných vrcholů) pro následné využití pro kryoprotokoly. V případě modelové dřeviny topolu šedého je složení multiplikačního média shodné s indukčním médiem (POKORNÁ et al. 2017).



Obr. 1: Založení primárních *in vitro* kultur topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.). Odstranění povrchových šupin z dormantních pupenů v *in vitro* podmínkách (1A), umístění pupenu se vzrostným vrcholem do sterilních skleněných nádob obsahujících indukční médium (1B a 1C), růst apikálních výhonů a prorůstání adventivních výhonů (1D).

Fig. 1: Establishing primary *in vitro* cultures of grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.). Removal of surface scales from dormant buds in *in vitro* conditions (1A) and transfer of bud with a shoot apex into the sterile glass jars containing an induction medium (1B and 1C), growth of apical shoots and formation of adventitious shoots (1D).

d) Předkultivace rostlinného materiálu

Mikrořízky topolu šedého, umístěné ve sterilních skleněných nádobách, se přemístí do chladové kultivační místnosti s pravidelným světelným režimem (16 h/ 8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a konstantní teplotou 4°C . Pozitivní účinky otužení explantátů při 4°C po dobu 2 týdnů před kryoprezervací zjistili VIDAL et al. (2005), kteří kombinaci teploty a časového intervalu 2 týdny uvádějí za nejúčinnější pro prorůstání apikálních segmentů u kaštanovníku jedlého (*Castanea sativa* Mill.). Dva týdny před izolací vzrostných vrcholů se v laminárním flowboxu na pevné médium ke všem rostlinným explantátům připipetuje 0,7 M roztok sacharózy, aby byla výsledná koncentrace působení sacharózy na rostlinné mikrořízky 0,3 M. Izolace vzrostných vrcholů (Obr. 3A a 3B) probíhá v laminárním flowboxu na skleněné Petriho misce za použití pinzety, skalpelu, případně injekční jehly v časově nejkratším možném intervalu, aby nedošlo k poškození rostlinného materiálu vysušením. Izolované vzrostné vrcholy (2–3 mm dlouhé) se umísťují po 10 kusech do plastových Petriho misek na indukční médium s 0,3 M obsahem sacharózy, která významně snižuje obsah vody v rostlinných segmentech, čímž ovlivňuje i jejich následnou regeneraci. HALMAGYI et al. (2010) testovali různé koncentrace sacharózy (0,1–1,5 M) během předkultivace segmentů u odlišných kultivarů jabloně. Zjistili shodný účinek 0,1 M a 0,25 M sacharózy na regeneraci segmentů (100 %) všech testovaných kultivarů jabloně po 24 h, avšak po 48 h se u testovaných kultivarů projevila rozdílná regenerace.

Petriho misky s izolovanými segmenty (Obr. 3A a 3B) se umístí do druhého dne do kultivační místnosti s řízenými světelnými i teplotními podmínkami (21°C , 16 h / 8 h světelná fotoperioda s intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vrchní část misek se zakryje bílým papírem, aby se snížila stresová odpověď na extirpaci u rostlinných segmentů.

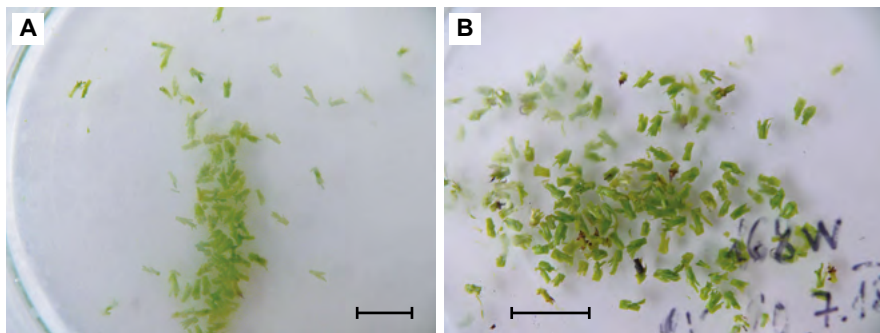
e) Vitifikace

Izolované vzrostné vrcholy jsou po předkultivaci postupně dehydrovány kryoprotektivními roztoky (KR 1–4, Tab. 1), které cíleně snižují obsah vody v rostlinných buňkách (optimálně na 3–4%) v závislosti na délce jejich působení. Stanovení kryystalově vázaných molekul vody v rostlinném materiálu v průběhu vitifikace můžeme provést metodou diferenční skenovací kalorimetrie, která umožňuje stanovit



Obr. 2: Boční pupen topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) (2A), izolace vzrostného vrcholu (2B) obsahující meristematické buňky (2C). Úsečka reprezentuje délku 0,5 mm.

Fig. 2: Lateral bud of grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) (2A), isolation of shoot apex (2B) containing meristematic cells (2C). The line represents the length 0.5 mm.



Obr. 3: Extirpované vzrostné vrcholy topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) (3A a 3B). Úsečka reprezentuje délku 10 mm.

Fig. 3: Extirped shoot apices of grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) (3A and 3B). The line represents the length 10 mm.

i teplotu tání a tzv. skelný stav. Postup aplikace kryoprotektivních roztoků KR 1–4 na vzrostné vrcholy probíhá v laminárním flowboxu a je vždy shodný z hlediska použití pomůcek. Dehydratace je prováděna ve skleněné kádince (25 ml) obsahující KR (15 ml), do něhož jsou segmenty za pomoci pinzety ponořeny. Roztoky KR 1 a 2 necháme působit vždy 30 min, přičemž v KR 3 jsou vzrostné vrcholy inkubovány 240 min. Během inkubace v jednotlivých KR jsou segmenty několikrát promíchávány. Po uplynutí časového intervalu je daný KR odsát sterilní pipetou a okamžitě nahrazen KR o vyšší koncentraci sacharózy. Před ukončením inkubace rostlinných segmentů v KR 3 si popíšeme kryozkumavky a připravíme si pomůcky k ošetření rostlinných segmentů ultranízkou teplotou.

Tab. 1: Složení kryoprotektivních roztoků (KR) aplikovaných k vzrostným vrcholům topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) po předkultivaci

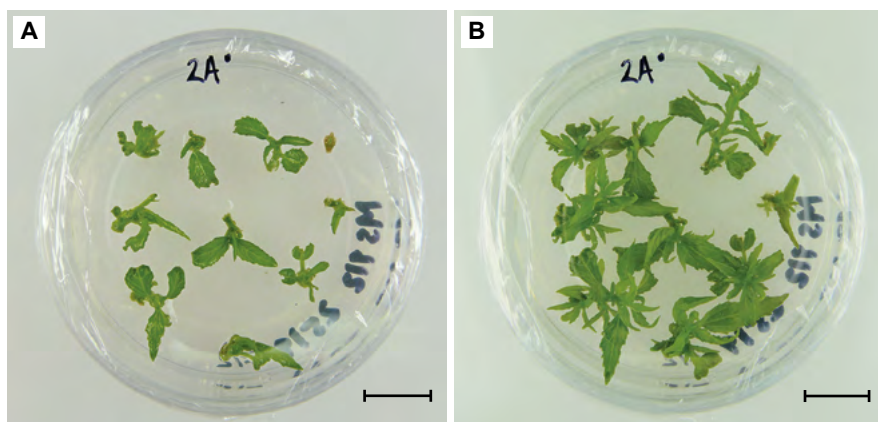
Kryoprotektivní roztok	Sacharóza (g . l ⁻¹)	Glycerol (g . l ⁻¹)	Voda (g . l ⁻¹)
KR 1	136,9	184,2	871
KR 2	250	250	642
KR 3	400	400	286
KR 4	256,7	-	743,3

f) Ošetření ultranízkou teplotou (-196 °C)

Po odsátí KR 3 jsou vzrostné vrcholy topolu šedého (10 ks) umístěny za pomoci injekční jehly na hliníkové plíšky, které jsou po uchopení pinzetou co nejrychleji ponořeny do polystyrénové nádoby naplněné kapalným dusíkem. Po ošetření rostlinných segmentů ultranízkou teplotou přemístíme pinzetou hliníkové plíšky do kryozkumavek (jeden plíšek s deseti segmenty do jedné kryozkumavky), které opatrně uzavřeme víčkem, ale neutahujeme jej, aby mohl kapalný dusík volně pronikat přes závit do kryozkumavky. Kryozkumavka je řádně označena čárovým kódem s detailním záznamem o pořadovém čísle položky, lokalizaci ve skladovacím systému a datem zamražení. Informace o vzorku je rovněž zapsána do databáze zamražených položek. Označené kryozkumavky jsou umístěny do skladovací Dewarovy nádoby naplněné kapalným dusíkem, jehož obsah je pravidelně kontrolován a v případě vyššího odparu včetně poklesu hladiny je kapalný dusík doplněn.

g) Regenerace rostlinných segmentů

Vyhodnocení regenerace rostlinných segmentů topolu šedého z důvodu kontroly úspěšnosti procesu vitifikace se provádí tzv. odtáním vzorku, při kterém je hliníkový plíšek inkubován 60 min v kapalném dusíku pro stanovení kontrolní regenerace, vyjmut pinzetou z kryozkumavky a okamžitě ponořen do kryoprotektivního roztoku KR 4 na 30 min a zahřátého na 40 °C. Vzrostné vrcholy topolu šedého (10 ks) se po 30 min inkubace v KR4 přemístí pomocí pinzety do plastových Petriho misek obsahujících indukční médium. Vyhodnocení regenerace rostlin provádíme po dvou (Obr. 4A) a osmi (Obr. 4B) týdnech od zahájení kultivace na indukčním médiu, vždy pro 10 ks apikálních vrcholů ve třech biologických opakováních. Schopnost regenerace explantátu se projeví po dvou týdnech kultivace přítomností chlorofylu u sledovaného segmentu a po osmi týdnech zejména prorůstáním nového výhonu.



Obr. 4: Regenerace extirpovaných vzrostných vrcholů topolu šedého (*Populus xcanescens* Aiton Sm.) ošetřených ultranízkou teplotou (-196 °C) po dvou (4A) a osmi (4B) týdnech. Úsečka reprezentuje délku 10 mm.

Fig. 4: Regeneration of extirped shoot apices of grey poplar (*Populus xcanescens* Aiton Sm.) treated with ultra-low temperature (-196 °C) after two (4A) and eight (4B) weeks. The line represents the length 10 mm.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Ve standardizované metodice jsou propojeny znalosti a zkušenosti biotechnologických postupů mikropropagace a kryoprezervace rychlerostoucí dřeviny topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.), které nebyly dosud u vybraného druhu topolu popsány. Podle zahraniční literatury byl kryoprotektivní postup aplikován např. u topolu bílého (*Populus alba* L.), při němž bylo docíleno 60% regenerace explantátů, avšak ve srovnání s naším postupem se lišil v postupech předkultivace segmentů a ve složení kryoprotektivního roztoku obsahujícího i dimethylsulfoxid (LAMBARDI et al. 2000). Použitím námi aplikovaného metodického postupu byla u vzrostných vrcholů topolu šedého dosažena 90% regenerace po osmi týdnech kultivace po ošetření ultrazvukem teplotou.

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Účelem předložené metodiky je poskytnout získané zkušenosti a poznatky ze dvou oblastí biotechnologických metod, *in vitro* kultivace a kryoprezervace, vyvinutých pro topol šedý (*Populus ×canescens* Aiton Sm.). Využití poznatků od založení primárních kultur po multiplikaci topolu šedého s následným dlouhodobým a bezpečným uchováním apikálních částí *in vitro* kultur v ultranízkých teplotách může být přínosné nejen pro cílenou skupinu lidí z oboru (např. pracovníci z výzkumných institucí, univerzit, školkařských firem), ale i pro všechny, kteří se o danou problematiku zajímají, případně pracují s *in vitro* kulturami. Předpokládáme, že metodika se uplatní především při mikropropagaci a následném dlouhodobém uchovávání kultur rychlerostoucích dřevin a dřevin s vysokou regenerační schopností. Modifikované postupy mohou být využity i pro další druhy lesních dřevin s cílem jejich dlouhodobého uchovávání. Dlouhodobým a bezpečným uskladněním rostlinného materiálu pomocí kryokonzervace je možné vytvořit bezpečnostní zálohy vzorků genových zdrojů. Uvedené metodické postupy jsou pilotním vstupem i pro následné naplňování Národního programu ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin, který zajišťuje v České republice oblast ochrany a reprodukce genetických zdrojů lesních dřevin a udržuje tuto oblast v plném souladu s platnými právními předpisy a mezinárodními úmluvami a dohodami. Jedná se zejména o naplnění Úmluvy o biologické rozmanitosti zveřejněné ve Sdělení Ministerstva zahraničních věcí č. 134/1999 Sb., o přijetí Úmluvy o biologické rozmanitosti dne 5. června 1992 v Rio de Janeiru, k níž byl dne 29. října 2010 přijat v Nagoji „Nagojský protokol“ o přístupu ke genetickým zdrojům a spravedlivém a rovnocenném sdílení přínosů plynoucím z jejich využívání. Národní program zajišťuje i naplnění závěrů ministerských konferencí Forest Europe (Štrasburk 1990, Helsinky 1993, Lisabon 1998, Vídeň 2003, Varšava 2007, Oslo 2011 a Madrid 2015) a v neposlední řadě i naplnění cílů aktualizované Státní politiky životního prostředí České republiky 2012–2020 schválené usnesením vlády č. 6 ze dne 9. ledna 2013, dále Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky pro období 2016–2025 schválené usnesením vlády České republiky č. 193 ze dne 9. března 2016 a Strategie resortu Ministerstva zemědělství České republiky s výhledem do roku 2030 č. 838 ze dne 29. listopadu 2017.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou odvislé od skutečnosti, jestli se zavádí zcela nový provoz pro mikropropagaci a kryoprezervaci topolu šedého, nebo se uvedená metodika implementuje na pracovištích s provozem *in vitro* kultur včetně jejich dlouhodobého a bezpečného uskladnění. V případě, že laboratoř je plně vybavena pro práci s tkáňovými kulturami a jejich uskladněním v ultranízkých teplotách, jsou náklady na zavedení postupu dané především nákupem běžných chemikálií pro přípravu kultivačních médií, pomůcek a potřebného spotřebního materiálu. V druhém případě, kdy se zavádí zcela nový provoz pro práci s *in vitro* kulturami a jejich uskladněním v ultranízkých teplotách, se náklady značně navyšují o vybavení pro sterilizaci materiálu a kultivačních médií: autokláv a horkovzdušný sterilizátor (celkem cca 150 tis. Kč), práci s tkáňovými kulturami: kultivační box a laminární box (celkem cca 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: sklo, plasty, chemikálie, pinzety, nůžky, skalpely. Náklady na uskladnění rostlinného materiálu v ultranízkých teplotách jsou promítnuty v pořízení Dewarovy nádoby na kapalný dusík a Dewarovy nádoby na uchování vzorků v kapalném dusíku (cca 80 tis. Kč). Celkově se náklady pohybují za zavedení celého provozu přibližně v rozmezí 800 tis. Kč.

Ekonomický přínos pro uživatele souvisí zejména s vyšší jistotou bezpečného a dlouhodobého uchování vybraných druhů lesních dřevin. Skladováním vzorků v ultranízké teplotě při námi zjištěné vysoké regenerační schopnosti vzrostných vrcholů zaručuje poskytnutí značného množství rostlinného materiálu pro jejich budoucí využití.

7 DEDIKACE

Metodika byla zpracována spoluprací kolektivu autorů z Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (EP a PM) a Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. (MF a JZ), v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QJ1630301 „*Tvorba nových systémů biotechnologických opatření pro zachování a rozvoj biodiverzity zemědělských plodin a lesních dřevin*“ a za podpory Ministerstva zemědělství, institucionálních podpor MZE-RO0118 a MZE- RO0418.

8 LITERATURA

8.1 Seznam použité související literatury

- BHOJWANI S. 1990. Plant tissue culture applications and limitations. Elsevier Science: 460 s.
- GAIKWAD A. V., SINGH S. K., GILHOTRA R. 2017. Plant tissue culture – a review. Journal of Pharmaceutical Research & Education 2: 217-220.
- HALMAGYI A., DELIU C., ISAC V. 2010. Cryopreservation of Malus cultivars: Comparison of two droplet protocols. Scientia Horticulture 124: 387-392.
- 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.
- MINOCHA S. C., JAIN S. M. 2000. Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology. In: Molecular Biology of Woody Plants, Vol. 1: 315 – 339. Kluwer Academic Publishers: 520 s.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- PAVLOVÁ L., FISCHER L. 2011. Růst a vývoj rostlin. Praha, Karolinum: 325 s.
- POKORNÁ E., BURIÁNEK V., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL M., KOMÁRKOVÁ M. 2017. Nové poznatky o reprodukci topolu šedého v *in vitro* podmínkách. Zprávy lesnického výzkumu, 62 (4): 213-223.
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J. a kol. 2003. Fyziologie rostlin. Praha, Academia: 484 s.
- KAVIANI B. 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. Australian Journal of Crop Science 5: 778-800.
- 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.
- VIDAL N., SÁNCHEZ C., JORQUERA L., BALLESTER A., VIEITEZ A. M. 2005. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. In Vitro Cell & Development Biology 41: 63-68.

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.

ŽIŽKOVÁ E., KOMÁRKOVÁ M., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H. 2017. Metoda rychlé regenerace topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) s využitím *in vitro* organogeneze. *Lesnický průvodce*, 5/2017.

8.2 Seznam publikací, které předcházely metodice

POKORNÁ E., FALTUS M., MÁCHOVÁ M., ZÁMEČNÍK J., FULÍN M. 2018. Grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) explant acclimation to improve the cryotolerance and cryoconservation of a unique poplar genotype. *Trees structure and function* (odesláno do redakce).

POKORNÁ E., BURIÁNEK V., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., BENÁKOVÁ M. 2017. Nové poznatky o reprodukci topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) v *in vitro* podmínkách. *Zprávy lesnického výzkumu*, 62(4): 213-223.

ŽIŽKOVÁ E., KOMÁRKOVÁ M., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H. 2017. Metoda rychlé regenerace topolu šedého (*Populus ×canescens* Aiton Sm.) s využitím *in vitro* organogeneze. *Strnady, VÚLHM*: 20 s. *Lesnický průvodce 5/2017*. 5: 20 s.

METHODOLOGY FOR SAFE PRESERVATION OF *IN VITRO* CULTURE OF GREY POPLAR (*POPULUS* × *CANESCENS* AITON SM.) IN ULTRA-LOW TEMPERATURES

Summary

This method presents combination of two biotechnologies, micropropagation and cryopreservation used for grey poplar (*Populus ×canescens* Aiton Sm.), which has been selected as a representative species based on fast growth and regeneration ability. This method describes in details proceedings of organogenesis, multiplication, precultivation of explants, isolation of shoot apices, application of cryoprotective solutions, immersion into the liquid nitrogen and regeneration of grey poplar segments. Briefly, the primary *in vitro* cultures have been established from dormant buds cultivated on modified MS medium (enriched in 10 mg.l⁻¹ glutamine, 2 mg.l⁻¹ glycine, 0.2 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurine and 0.1 mg.l⁻¹ indole-3-butyric acid) under sterile conditions for 3–4 weeks to reach sufficient amounts of explants for multiplication (Figure 1). Subsequently, plant material was transferred into the cultivation room with low temperature (4 °C) for 6 weeks. After 4 weeks of particular precultivation conditions explants were treated with the solution of sucrose (0.7 M) to reach the final concentration 0.3 M sucrose in the modified MS medium. Shoot apices have been extirpated and cultivated overnight on modified MS medium containing 0.3 M sucrose. Following the vitrification protocol, extirpated shoot apices containing meristematic cells (Figure 2 and 3) were treated with cryoprotective solutions ensuring cells dehydration to prevent plant cells from ice crystals formation (Table 1.). After the application of cryoprotective solutions, grey poplar apices were immersed into the liquid nitrogen for their safety long-term storage under ultra-low temperature. For evaluation of regeneration status and cryopreservation efficiency the grey poplar segments were put into the warm (40 °C) sucrose solution (0.75 M) for 30 min and transferred to modified MS medium. Using this method we reached relatively high post-thaw recovery (90%) of grey poplar explants (Figure 4).

Taken together, we suppose that investigated micropropagation and cryopreservation methods will serve as a valuable source of information for safety and long-term storage of woody plant species.



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

www.vulhm.cz

LESNICKÝ PRŮVODCE 5/2018