

Mikropropagační technologie a Národní banka explantátů lesních dřevin

V současné kulturní krajině se vyskytují cenné populace hospodářských, ale i z lesnického hlediska dosud přehlížených dřevin, které jsou důležité z hlediska jak udržení stability ekosystému tak zachování biodiverzity. Reprodukce těchto populací klasickými metodami generativního a vegetativního množení je často obtížná, např. v důsledku nedostatečné fruktifikace, zničení semen hmyzem anebo selháním metod vegetativní reprodukce (řízkování, roubování). V těchto případech je možné pro zachování a reprodukci cenných populací využít mikropropagační postupy, které byly již vyvinuty pro řadu dřevin. Jednou z výhod této metody je možnost dlouhodobě uchovávat populace za definovaných podmínek v „Bance explantátů lesních dřevin“ a podle potřeby je reprodukovat prakticky neomezeně. Navíc množství odebíraného rostlinného materiálu pro založení primárních kultur (většinou meristemická pletiva zimních pupenů) je minimální a odběr rostlinného materiálu dárcovský strom nepoškozuje. Pro zakládání kultur se obvykle používají meristémová pletiva, takže dojde i případnému ozdravení reprodukčního materiálu.

*Dostatečná genetická variabilita množené populace je zaručena vhodným počtem klonů a klonovým složením výchozí *in vitro* množitelské populace.*

Mikropropagační technologie

Explantátové kultury

Jako explantáty se obecně označují různé části rostlin, které jsou sterilně pěstovány v *in vitro* podmínkách na definovaných živných médiích. Výchozím materiálem pro explantáty jsou menší části rostlin (propagula), mohou to být prakticky všechny rostlinné části jako samčí i samičí gametofytická pletiva, generativní pletiva, nucelus a synergidní buňky, ale také vegetativní pletiva, orgány, buňky, protoplasty a kalusy, které se při klasickém vegetativním způsobu množení nepoužívají. U lesních dřevin se jako zdrojové rostlinné části obvykle používají zralá i nezralá embrya, hypokotyly, kotyledony, vzrostné vrcholy, meristémy dormantních pupenů, jehličí nebo svazky jehličí (brachyblasty) a listy, ale také kambiální pletiva ze starších výhonů a dokonce jednotlivé buňky nebo protoplasty.

Úspěšnost mikropropagace je určena kvalitou zdrojového materiálu (stářím, zdravotním stavem, termínem odběru), manipulací s rostlinným materiálem pro přípravu explantátů (způsob a délka skladování, účinnost sterilizace vůči patogenům a její šetrnost k pletivům explantátu), výběrem kultivačních postupů *in vitro* a stanovením podmínek pro aklimatizaci při dopěstování kompletních sazenic podle odlišných růstových požadavků jednotlivých druhů (chemické složení živného média, teplota, délka a intenzita osvit).

Organogeneze

Prozatím nejúspěšnější metodou mikropropagace, zejména u listnatých dřevin, je organogeneze. Je vhodná pro klonové množení vyselektovaných dílčích populací stromů (při nedostatečné fruktifikaci nebo zničení semen hmyzem). Používá se také pro reprodukci embryí jak ze zralých semen získaných z mezidruhového křížení, která by se v přirozených podmínkách nevyvíjela, tak ze zralých semen obdržených z kontrolovaného opylování.

Při indukci organogeneze jsou hormonálně nastartovány morfogenetické pochody podmiňující diferenciaci pletiv v primárním explantátu. V jejich průběhu se vytvářejí výhony, které se použijí k další multiplikaci nebo k indukci zakořeňování. Po vytvoření kořenového systému a aklimatizaci se kompletní rostliny určené pro výsadbu vysazují na venkovní záhony k dopěstování. Ostatní materiál lze nadále uchovávat v genové bance explantátů pro další namnožení.

Organogeneze se osvědčila zejména u listnatých dřevin. V praxi byly úspěšně mikropropagovány zejména břízy (*Betula* sp.), třešeň ptačí (*Prunus avium*), eukalypty (*Eucalyptus* sp.), ořešáky (*Juglans* sp.), topoly (*Populus* sp.) a jabloně (*Malus* sp.). U jehličnanů se organogeneze využívá u zeravů (*Thuja* sp.), borovic (*Pinus* sp.), sekvojí (*Sequoia* sp.), u smrku ztepilého (*Picea abies*), douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii*), modřínu opadavého (*Larix decidua*) a tisů obecného (*Taxus baccata*).

Somatická embryogeneze

Při somatické embryogenezi (asexuální nebo adventivní embryogeneze) se vlivem hormonů vytvářejí ze somatických buněk primárního explantátu bipolární embrya s diferencovanými vzrůstovými vrcholy a základy kořenů. Často se jako primární explantát využívá nezralé zygotické embryo, z jehož haploidních i diploidních somatických buněk, nebo nepřímo z nediferencovaných buněk embryogenního pletiva se při vhodné kultivaci vytvářejí somatická embrya, která se svými biochemickými a morfoloogickými vlastnostmi neodlišují od embryí vzniklých zygoticky.

Somatická embryogeneze se u listnatých dřevin prokázala jako výhodná mikropropagační technologie. Ze zygotických embryonálních explantátů nebo endospermu se podařilo indukovat somatická embrya, která úspěšně konvertovala na kompletní rostliny u ořešáku (*Juglans regia*), jírovce maďala a jírovce pleťového (*Aesculus hippocastanum* a *A. x carnea*), lísek (*Corylus* sp.), dubů (*Quercus* sp.), lípy malolisté a lípy velkolisté (*Tilia cordata* a *T. platyphyllos*), břízy bělokoré (*Betula pendula*) a olivovníku evropského (*Olea europea*). U jehličnanů byla tato metoda popsána u smrku ztepilého (*Picea abies*), smrku sivého (*Picea glauca*), několika druhů borovic (*Pinus* sp.), douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii*), modřínu opadavého (*Larix decidua*) a sekvoje vždyzelené (*Sequoia sempervirens*). Somatická embryogeneze se pro mikropropagaci jehličnanů ukazuje jako velmi perspektivní, i když se ne vždy daří získat životaschopný sadební materiál.

Kryokonzervace

Kryokonzervace vegetativně množených rostlin, semen nebo částí semen je metoda pro jejich dlouhodobé uchování v nízkých nebo ultranízkých teplotách navozením vitrifikačního stavu, při kterém se při ochlazením netvoří krystaly ledu, které mají jinak za následek nevratné poškození rostlinných buněk.

Pro uchovávání jsou vhodná embryogenní pletiva, vypreparované vzrostné vrcholy s meristematickými buňkami, zygotická embrya nebo jejich části.

Metody kryokonzervace se ukazují velmi perspektivní pro embryogenní pletiva, z nichž se daří získat např. u smrku ztepilého i vysoké procento vitálních embryí schopných regenerace. Metody kryokonzervace (kryoprotokol) se stále vyvíjejí a předpokládá se jejich optimalizace pro jednotlivé druhy dřevin.

Kryoprotokol pro příslušný rostlinný druh je založen na metodách vyvolávajících vitrifikační stav, který je výhodný pro dlouhodobé uchování genetické informace a současně zaručuje *in vitro* regeneraci metodou organogeneze nebo somatické embryogeneze.

Národní banka explantátů lesních dřevin

Určenou osobou pro zajištění Národní banky explantátů lesních dřevin (NBE) je Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. Účelem zřízení NBE je podpora existence a obhospodařování rodičů rodiny, ortetů a klonů, tedy jedinců cenných a ohrožených regionálních populací lesních dřevin. Na pracovišti Biologie a šlechtění lesních dřevin, Výzkumného ústavu lesního hospodářství, v. v. i., byly již standardizovány postupy mikropropagace pro řadu listnatých i jehličnatých dřevin, např. pro dub letní, dub zimní, hrušeň planou polničku, jablono lesní, jeřáb oskeruši, jeřáb sudetský, jilm habrolistý, jilm horský, jilm vaz, lípu srdčitou, lípu velkolistou, třešeň ptačí, břízu trpasličí, lýkovec vonný,

vrbu dvoubarvou, smrk ztepilý a další ohrožené nebo endemické druhy. Mikropropagované klony lesních dřevin jsou uchovávány ve formě vícevrcholových kultur nebo embryogenních linií v definovaných podmínkách. Dostatečná variabilita uchovávané populace je zajišťována dostatečným počtem odvozených klonů, což je u vtroušených dřevin kolem 30 klonů a u hlavních hospodářských dřevin 50 - 100 klonů. Pro řadu dřevin byly optimalizovány i postupy dopěstování kompletních výsadby schopných sazenic (výpěstků *in vitro*). Růst, vývoj a životaschopnost sadebního materiálu je dlouhodobě ověřována na 15 demonstračních objektech. Biometrická měření přírůstků a celkový morfologický vývoj ukazují, že výpěstky *in vitro* se vyvíjejí srovnatelně se semenáčky, a ani jejich mortalita není vyšší.

Činnost a služby určené osoby spojené s Národním programem ochrany a reprodukce genofondu lesních dřevin jsou v souladu se zákonem č. 149/2003 Sb., o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin, ve znění pozdějších předpisů, mezinárodními závazky ČR (zejména Úmluva o biologické rozmanitosti, rezoluce ministerských konferencí Forest Europe, EUFORGEN, EUFGIS) a národními strategiemi ČR (Státní politika životního prostředí České republiky 2012-2020 a Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky) viz Koncepce Národní banky osiva a explantátů lesních dřevin.

Kontakty:

Národní banka explantátů lesních dřevin

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

Útvar biologie a šlechtění lesních dřevin

Strnady 136

252 02 Jíloviště

www.vulhm.cz

Zodpovědní řešitelé (kontaktní osoby)

RNDr. Jana Malá, CSc.

e-mail: mala@vulhm.cz

Tel.: 257 892 257, 602 298 805

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

e-mail: cvrckova@vulhm.cz

Tel.: 257 892 268, 602 767 860

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

e-mail: machova@vulhm.cz

Tel.: 257 892 268, 602 767 860