

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Michael Vičan

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



Mikropropagace topolu, organogeneze a regenerace

Bakalářská práce

Michael Vičan

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph. D.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michael Vičan
Název práce	Mikropropagace topolu, organogeneze a regenerace
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph. D.
Rok obhajoby	2015
Abstrakt	<p>Předložená bakalářská práce se věnuje mikropropagaci topolu, organogenezi a regeneraci v <i>in vitro</i> podmínkách. Topol patří mezi původní druhy České republiky. Je významný pro produkci biomasy, pro schopnost genetické transformace a s rozvojem <i>in vitro</i> metod patří mezi modelové rostliny rostlinné fyziologie a molekulární genetiky. Teoretická část patří literární rešerši zabývající se botanickou charakteristikou topolu, množením <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> a kultivačními podmínkami. Experimentální část se zabývá návrhem funkční metodiky pro mikropropagaci u vybraných klonů topolů. Pro klony byla navržena sterilizace a složení média pro proliferaci. Dodatečně bylo do bakalářské práce zařazeno odvození <i>in vitro</i> kultury paulovnie.</p>
Klíčová slova	Mikropropagace, topol, <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , paulovnie
Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Michael Vičan
Title of thesis	Mikropropagation, organogenesis and regeneration of poplar
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators, Palacký University Olomouc
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph. D.
The year of presentation	2015
Abstrakt	The presented bachelor thesis studies <i>in vitro</i> micropropagation, organogenesis and regeneration of poplar. Poplar among the indigenous species of the Czech republic. It is important of transformation and among the model plant of plant physiology. The theoretical part of this work consist of review of botanical characteristic of poplar, propagation <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> and culture conditions. The experimental part deals with the functional methodology for micropropagation of selected poplar clones. For clones was designed sterilization and media composition for proliferation. In addition to the bachelor thesis was situated derive <i>in vitro</i> culture of paulownia.
Keywords	Micropropagation, poplar, <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , paulownia
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne

Poděkování:

Rád bych poděkoval Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, čas a trpělivost, které mi při řešení této práce věnovala. Dále chci poděkovat Bc. Janě Vaškové za přínosné rady a pomoc při experimentech.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce.....	10
3. Současný stav řešené problematiky.....	11
3.1 Botanická charakteristika.....	11
3.1.1 Využití topolu.....	11
3.1.1.1 Topol jako energetická plodina.....	11
3.1.1.2 Fytoremediace.....	12
3.1.1.3 Topol jako modelová rostlina.....	13
3.2 Množení.....	14
3.2.1 <i>In vivo</i>	14
3.2.2 <i>In vitro</i>	15
3.2.2.1 Kultivační médium.....	16
3.2.2.2 Vliv genotypu a kultivační podmínky.....	21
3.2.2.3 Faktory ovlivňující efektivitu množení.....	24
4. Materiál a metodika.....	25
4.1 Rostlinný materiál.....	25
4.2 Metodika <i>in vitro</i> množení.....	27
4.2.1 Odběr rostlinného materiálu.....	27
4.2.2 Sterilizace.....	27
4.2.3 Kultivační podmínky.....	28
4.2.4 Kultivační médium.....	28

5. Výsledky.....	31
5.1 Sterilizace.....	31
5.2 Kultivační médium.....	33
5.3 Kultivace <i>Paulownia tomentosa</i> biomass.....	38
6. Diskuze.....	40
7. Závěr.....	42
8. Literatura.....	43
9. Seznam použitých zkratk.....	46

1. Úvod

Topol je rychle rostoucí dřevina z čeledi vrbovítých, rozšířená především v mírném a subtropickém pásu severní polokoule. V České republice se v přírodě vyskytují tři druhy (*Populus nigra* L., *Populus alba* L., *Populus tremula* L.) a jeden hybrid těchto druhů (*Populus alba* × *Populus tremula*). Této dřevině se nejlépe daří ve vlhké půdě v okolí řek. Topol je často vysazován jako zeleň v zalidněných oblastech pro svou toleranci snášet znečištěné ovzduší. Z hospodářského hlediska se topol využívá jako energetická plodina sloužící k produkci biomasy. Pro tento účel se využívá topol japonský (*Populus nigra* × *Populus maximowiczii*), který se pěstuje pro výrobu pelet sloužící jako biopalivo. Topol má vyšší výhřevnost než jiné dřeviny a roste navíc výrazně rychleji. Jeho dřevo je surovinou pro výrobu dřevotřísky, papíru a dřevěných nástrojů (Úřadníček a kol., 1998).

S rozvojem *in vitro* metod lze dlouhodobě studovat vliv *in vitro* podmínek na růst a množení rostlin. Na explantáty, části izolovaných rostlin za účelem množení, nemá vliv jen minerální výživa a přítomné organické látky, tj. kultivační médium, ale i další faktory, které je možno v *in vitro* snadno regulovat. V *in vitro* lze také zachovávat neustále rostlinný materiál v genových bankách. (Procházka a kol., 1998)

Topoly jsou z vědeckého hlediska významné pro svoji malou velikost genomu, krátký životní cyklus a schopnost regenerovat v *in vitro* podmínkách. Topol je řazen mezi modelové systémy molekulární genetiky a fyziologické studie (Biswas a kol., 2012). Do genomu topolu je také možný přenos cizorodé DNA při procesu transformace. Poprvé v *in vitro* podmínkách množil vybrané klony topolu Winton (1970). Mapováním genomu *Populus trichocarpa* se zabýval Tuscan a kol. (2006). Bylo identifikováno více než 45 tisíce genů kódující proteiny. Analýza genomu navíc odhalila genomové zdvojení a 8 tisíc párů duplicitních genů. *Populus trichocarpa* má více genů kódujících proteiny než *Arabidopsis*, nicméně četnost proteinových domén je u obou rostlin podobná.

2. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární rešerši na dané téma. U vybraných klonů topolů ověřit možnost *in vitro* kultivace. Připravit vhodná kultivační média, testovat různé hladiny růstových regulátorů pro indukci organogeneze a regeneraci rostlin. Navrhnout funkční metodiku pro mikropropagaci u vybraných klonů topolů.

3. Současný stav řešené problematiky

3.1 Botanická charakteristika

Topol je dvoudomý listnatý strom z čeledi vrbovítých. Koruna je řídká, kulovitá. Kmen je přímý, se zelenošedou borkou, která ve stáří černá. Listy jsou okrouhlé až vejčité, 3 - 7 cm dlouhé, 3 - 8 cm široké, na bázi zaokrouhlené a na konci špičaté. Květy topolu tvoří květenství. Jednotlivé květy jsou jednopohlavné, tvoří jehnědy. Samčí květy obsahují 8 - 30 tyčinek, samičí květy mají gyneceum srostlé ze dvou plodolistů. Plodem je tobolka. Topol se vyskytuje v mírném a subtropickém pásu severní polokoule, nejčastěji v doubravách, světlých listnatých lesích a pasekách. Vyhovují mu vlhké, na živiny bohaté písčitohlinité půdy. Topol je řazen mezi původní druhy květeny České republiky (Hejný a kol., 1990).

V České republice se o zachování genetické rozmanitosti druhů dřevin zabývají lesní genové banky Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i. Cílem genové banky je postupně nashromáždit a udržovat kolekci vzorků především z populace domácích dřevin včetně topolu, aby tak byla podchycena jejich stávající genetická pestrost. Tato banka osiva a explantátů lesních dřevin je rozdělena na dvě samostatné části, na Výzkumnou stanici Kunovice u Uherského hradiště a Národní banku explantátů lesních dřevin ve Strnadlech.

3.1.1 Využití topolu

3.1.1.1 Topol jako energetická plodina

V současné době je kladen důraz na obnovitelné zdroje energie. Perspektivním obnovitelným zdrojem energie v našich podmínkách je cíleně pěstovaná biomasa. V seznamu rostlin vhodných pro pěstování za účelem využití biomasy pro energetické účely z pohledu minimalizace rizik pro ochranu přírody a krajiny patří i topol. Seznam slouží jako odborný podklad pro rozhodování orgánů ochrany přírody, v souladu s podmínkami zákona o ochraně přírody a krajiny č. 114/1992 Sb. Jedná se o prevenci záměrného rozšíření geograficky nepůvodních druhů rostlin.

Cílem pěstování energetických rostlin na plantážích je efektivní produkce co největšího množství biomasy z co nejmenší plochy v nejkratší době. Výsadba je organizovaná do rovných řad v pravidelných vzdálenostech, které umožňují použití jednoduchých technologií

při zakládání plantáže, výsadbě a sklizni. Topol je pro pěstování v našich podmínkách ideální plodina. Za účelem produkce biomasy se využívá topol japonský (*Populus nigra* × *Populus maximowiczii*). Dřevo ze šlechtěných japonských topolů má kvalitnější mechanické i energetické parametry než dřevo z běžných topolů. Topoly nejsou náchylné na výkyvy počasí, je možné je pěstovat na méně úrodných částí polí a jsou odolné vůči většině známých škůdcům. Díky rychlému nárůstu dřevní hmoty, velmi vysoké výhřevnosti srovnatelné s hnědým uhlím a rychlé době vysychání patří mezi nejlepší energetické plodiny. Sklizeň probíhá nejčastěji po 5–6 letech od výsadby. V té době má japonský topol 15 – 20 m výšky. Nespornou výhodou je, že pařez po uříznutí při sklizni znovu obrůstá (Dočekal, 2004).

Jednou z možných budoucích alternativ energetické plodiny pro cílené pěstování biomasy je paulovnie (genotyp *Paulownia tomentosa* biomass). Paulovnie patří mezi nejrychleji rostoucí stromy na světě a u nás se pěstuje k okrasným účelům. Tato rostlina z čeledi hluchavkovitých, původně z Číny dorůstá výšky 30 m a je schopna několika násobného nárůstu dřevní hmoty oproti topolu (Hui-jun a Ingestad, 1984). V současné době není ale paulovnie na seznamu schválených rostlin vhodných pro pěstování biomasy v ČR pro energetické účely. Řada odborníků se kloní k názoru dát přednost pro pěstování biomasy původním druhům rostlin České republiky.

3.1.1.2 Fytoremediace

Rozvoj vědy a techniky zapříčinil vznik látek, které nemají přirozený původ v přírodě, ale byly syntetizovány člověkem, tzv. xenobiotika. Řada těchto látek (polychlorované bifenyly, chlorované alifatické uhlovodíky) patřila do nedávné doby mezi látky průmyslově významné. Později bylo ale zjištěno, že se jedná o látky perzistentní a toxické, které velmi často pronikají do potravního řetězce a tím ohrožují lidské zdraví. Z důvodu velkého rozšíření těchto látek je v dnešní době kladena celosvětová pozornost možnosti odstranění těchto látek a dekontaminaci zasažených ploch (Kučerková a kol., 1999).

Fytoremediace je definována jako využití zelených rostlin pro odstranění a transformaci kontaminantů z životního prostředí. Jednou z technik fytoremediace je fytodegradace. Proces, při němž dochází k absorpci, přeměně a odbourávání kontaminantů. Za fytoremediaci lze považovat i proces snižování kontaminantů v důsledku uvolňování enzymatických metabolitů rostliny do půdy. Mechanismus fytoremediace může být využit při odstranění těžkých kovů

z půdy. Rostlina transportuje těžké kovy do kořenů, stonků a listů, které jsou následně odstraněny a plocha je opět osázena stejnými rostlinami do doby, než se koncentrace kovů v půdě nesníží na přijatelnou hodnotu. Fytoremediace je značně rychlejší proces přírodní atenuace, je třeba ale zajistit bezpečné ukládání kontaminovaného materiálu, případně jeho řízené spalování (Soudek a kol., 2008).

Remediační kapacita rostlin může být významně zlepšena technologiemi genetické manipulace a transformace rostlin. V současné době je kladen důraz na identifikaci genů, které je schopno využít ke zvýšení fytoremediačních kapacit rostlin pomocí transgenní postupů. Li a kol. (2006) izoloval cDNA fytochelatin synthasy (*CdPCS1*) z trosku prstnatého (*cynodon dactylon*). Tato rostlina je vysoce rezistentní a je schopna akumulovat velké množství kadmia. Gen *CdPCS1* byl následně vložen do transgenního tabáku, u kterého se téměř čtyřnásobně zvýšila remediační schopnost pro tento prvek. Topol, jako transformovatelná rostlina, by mohl díky nově objeveným remediačním genům být v budoucnosti využit pro efektivní fytoremediaci. Tématem fytoremediace u topolu se v České republice zabývala Malá a kol. (2006).

3.1.1.3 Topol jako modelová rostlina

Studia genomu *Populus trichocarpa*, zařadily topol mezi modelové systémy molekulární genetiky a fyziologické studie (Biswas a kol., 2012). V současné době probíhá v Olomouci na Ústavu experimentální botaniky pod vedením prof. Ing. Miroslava Strnada, CSc. studium aromatických cytokininů izolovaných z listů topolu. Izolované cytokininy se následně využívají jako prekurzory k syntetickým analogům a sloužící při fyziologických studiích. Znalosti všech mechanismů působení cytokininů nejsou v dnešní době zcela objasněny.

Ivo Chamrád a kol. (2014) se na pracovišti v Olomouci zabýval studiem aromatických cytokinin-vázajících proteinů u pšenice. Pravděpodobně nejlépe prozkoumaným zástupcem této skupiny je u pšenice cytokinin-binding protein 1 (CBP-1). Předpokládaná úloha CBP-1 spočívá v regulaci hladiny volných aromatických cytokininů při klíčení zrna.

Studiem aromatických cytokininů se také zabýval ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky v Olomouci Stirk a kol. (2011). Cílem studie bylo sledování

endogenní hladiny cytokininů během klíčení kukuřice a vojtěšky. Bylo zjištěno, že endogenní aromatické cytokininy nehrají klíčovou roli v klíčení u těchto rostlin.

3.2 Množení

3.2.1 *In vivo*

Řízkování patří mezi způsob vegetativního rozmnožování rostlin. Nová rostlina vzniklá z řízku je klonem mateřské rostliny, má stejné vlastnosti a shodnou genetickou výbavu. Při řízkování je odstraněna část rostliny, nejčastěji jednoleté výhony. Protože nové řízky nemají vlastní kořenový systém, je nezbytné dodržet metodiku množení. Jako substrát pro množení je využívána lehká zemina, nejčastěji směs písku, rašeliny a perlitu. Prostředí by mělo být udržováno vlhké, ale zároveň provzdušněné. Z tohoto důvodu se řízky obvykle udržují pod fólií v polostínu, aby se zabránilo jejich vyschnutí. Příliš velká vlhkost může způsobit hnilobné a plísňové procesy. Řízky by měly pocházet ze zdravé mateřské rostliny, nesmí být fyzicky oslabeny, napadeny hmyzem a ani houbovými chorobami. Výhony nesmí být nevyzrálé ani přestárlé. U různých druhů rostlin bývá řízkování individuálně specifické (Kawollek a Kawollek, 2010).

Dřevité řízky jsou obecně nejméně náročné na odborné znalosti a pracnost. U topolu se využívají pro řízkování jednoleté mladé prýty. Po odběru z mateční rostliny je nutné skladovat prýty v chladných a vlhkých podmínkách. Optimální teplota pro krátkodobé skladování je 2 – 4 °C. Ideální délka sadby řízků je kolem 20 – 25 cm o průměru 0,8 – 3,5 cm se spodním šikmým řezem. Před vlastní výsadbou je důležité řízky namočit na 24–48 hod. do vody, která může být obohacena o fungicid, který omezí růst houbových chorob v substrátu. Pupeny řízků při sadbě musí směřovat vzhůru. Topoly je vhodné sázet v půli března po prvních jarních mrazících. U podzimní výsadby topol ztrácí při vymrzání kontakt s půdou a na jaře dochází k jeho uschnutí. Řízky se zapichují do substrátu kolmo nebo mírně zešikma. Zatlačovat řízky není vhodné, může dojít jejich k nalomení. Pro úspěšnější zakořenění je možné použít prostředek pro řízkování dřevin (Dočekal, 2004).

3.2.2 *In vitro*

Mikropropagace označuje soubor technik *in vitro*, jejichž cílem je rychlé namnožení rostlinného materiálu. Představuje vhodnou technologii pro konverzaci ohrožených genotypů a rychlé získání dostatečného množství sadebního materiálu pro případné vysazení ohrožených druhů na původní stanoviště (Máchová a Cvrčková, 2012). První zmínky o *in vitro* kulturách u listnatých dřevin se datují do 30. let. Gautheret (1934) dokazuje možnost vypěstovat kompletní rostliny jilmu habrolistého z primárních explantátů. V České republice byl jako první mikropropagován v 70. letech smrk a douglaska (Chalupa a kol., 1973). Většinu listnatých dřevin lze množit pomocí organogeneze.

Mezi výhody mikropropagace patří rychlý růst kultivovaných rostlin. K množení dochází za kontrolovaných podmínek a lze ho provádět po celý rok. Nespornou výhodou je také možnost ozdravit kultivovaný rostlinný materiál a možnost ovlivnit charakter růstu. Mikropropagaci je možno využít pro množení rostlinných druhů, u kterých jsou konvenční metody množení finančně náročnější. Mezi nevýhody patří finanční náročnost na vybavení a znalosti. Dosud také nejsou zavedeny protokoly pro všechny druhy.

Mikropropagace začíná výběrem rostlinného materiálu. Následně je explantát důkladně sterilizován. Pro *in vitro* a produkci budoucích rostlin je vyžadována nepřítomnost bakterií a plísní, které by zapříčinily případnou kontaminaci. Po sterilizaci se explantát asepticky přenese na kultivační médium. Explantátem bývají nejčastěji apikální nebo axilární prýty, které v další fázi mikropropagace proliferyjí axilární pupeny. U některých druhů je jedním z možných postupů regenerace *de novo*. Pomocí poměrové koncentrace auxinů a cytokininů explantát vytvoří nediferencované pletivo. Ze vzniklého kalusu mohou být vytvořeny sekundární prýty nebo sekundární kořeny. Po proliferaci obvykle následuje multiplikace, ve které dochází k odběru explantátů vniklé při fázi proliferace a jejich namnožení. Prostřednictvím opakovaných cyklů je možné z jednoho explantátu získat tisíce rostlin. U každé rostliny následuje fáze zakořeňování. Snižováním koncentrace minerálních solí a působením auxinu dochází k indukci tvorby kořenů. Malé rostliny s kořeny a listy se v posledním fázi přemístí z média do pěstebního substrátu. Aby se zabránilo infekci, je nezbytné odstranit zbytky agarů a desinfikovat substrát. Před touto fází je nutné rostliny aklimatizovat úpravou vlhkosti a srovnáním atmosféry ve skleníku a kultivační nádobě (Ahuja, 1993).

U některých druhů může být jedním z možných problémů při mikropropagaci vitrifikace. Při tomto procesu dochází nežádoucím fyziologickým projevům orgánové kultury. Dochází se k abnormálnímu růstu, tvoří se průhledné zkroucené listy, snižuje se funkce průduchů. Vitrifikace může být způsobena příliš vysokou koncentrací cytokininů, vysokým obsahem vody nebo příliš nízkou koncentrací gelujících látek (Prknová, 2007).

Kromě organogeneze, může být mikropropagace dosaženo cestou somatické embryogeneze. Somatická embryogeneze spočívá ve vývoji embryí z geneticky embryogenních somatických buněk *in vitro*. Na rozdíl od organogeneze, kde k vývoji prýtu a kořenů dochází na různých médiích, somatická embryogeneze je jeden proces, který zahrnuje morfologické změny obdobné při vývoji zygotického embrya (Ahuja, 1993).

3.2.2.1 Kultivační médium

Nutriční požadavky pro optimální růst se mohou lišit v závislosti na druhu rostliny. Dokonce i explantáty z různých částí rostliny mohou mít pro optimální růst rozdílné potřeby. Žádné médium nemůže být navrženo tak, aby vyhovovalo všem typům rostlinných pletiv a orgánů. Při spuštění nového systému je základní prací vypracovat médium, které bude splňovat specifické potřeby dané tkáně. Během posledních let bylo vypracováno mnoho postupů pro kultivaci různých explantátů.

Jako základ pro první připravená média se použil živný roztok, který se dříve používal pro výživu celé rostliny. Zatímco některé explantáty potřebují k růstu jednoduché médium složené jen z anorganických solí a využitelného cukru, mnoho dalších potřebuje nezbytně doplněk vitamínů, aminokyselin a růstových regulátorů v různé koncentraci a kombinaci. Médium, složené pouze z látek o přesně definované koncentraci, se nazývá syntetické. Koncentrace anorganických a organických látek je většinou vztažena na hmotnost média nebo počet molů (Bhojwani a Razdan, 1996).

Minerální složky jsou pro život rostlin nezbytné. Např. hořčík je součástí molekuly chlorofylu, vápník součástí buněčné stěny, dusík součástí aminokyselin, proteinů a nukleových kyselin. Kromě uhlíku, vodíku a kyslíku je známo přes 12 základních prvků. Prvních 6 prvků, označené jako makro-prvky, jsou v rostlinou vyžadovány relativně ve velkém množství. Ostatní prvky, mikro-prvky, jsou nezbytné v mnohem menší

koncentraci. Obecně platí, vyskytuje se-li nezbytný prvek v menších koncentracích, jeho nedostatek má přesto zásadní vliv na růst (Bhojwani a Razdan, 1996).

Mezi organické látky můžeme zařadit, vitamíny, aminokyseliny, fytohormony a zdroje uhlíku. Většina kultivovaných explantátů si je schopna vytvořit nezbytné sloučeniny sama, zřejmě ale ne v optimálním množství. Často pro docílení nejlepšího růstu se do média přidávají více vitamínu a aminokyselin (Trigiano a Gray, 2005).

Fytohormony

Historie objevu růstových regulátorů sahá do přelomu 19. a 20. století. Německý botanik Julius von Sachs (1832 – 1897) vyslovil domněnku o existenci chemických signálů, kterými mohou vzájemně komunikovat jednotlivé orgány rostlin. Toto téma významně rozpracoval brněnský profesor R. Dostál (1885 – 1973), za použití experimentálně morfologických přístupů. Od té doby se na hromadilo mnoho údajů o látkách, regulující růstové a vývojové procesy rostlin. Obecně je nazýváme růstové regulátory. Tento název však neodlišuje látky přirozené od látek připravených synteticky. Přirozené regulátory růstu, do kterých patří především rostlinné hormony (fytohormony), byly ve starší literatuře často děleny na látky růst stimuluje nebo růst inhibující. Látka však v určité koncentraci může mít účinky stimulační a v jiné koncentraci účinky inhibující. Účinek regulačních látek závisí také na konkrétním genotypu, stáří a fyziologickém stavu rostliny (Procházka a kol., 1998).

Regulační aktivita endogenně se vyskytující látky se obvykle testuje jako účinek její aplikace. Ve většině případů, zvyšování hladiny testované látky v rostlině vede ke změně přirozených gradientů koncentrací a může vyvolat stresovou reakci. Testované regulátory často interagují s ostatními růstovými regulátory a testovaná rostlina na zvyšování hladiny hormonů může reagovat jinak nebo vůbec. Je také velmi pravděpodobné, že jiné druhy buněk budou na tutéž látku reagovat odlišně.

Fytohormony jsou organické nízkomolekulární látky, které slouží jako endogenní signální látky. Tyto přirozené metabolity se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až

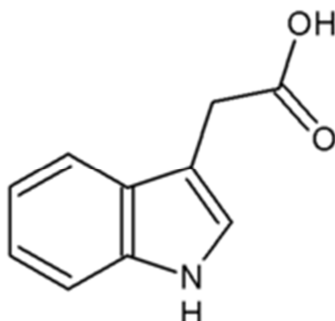
10^{-9} M) a slouží k přenosu informací mezi pletivy a orgány. V rostlině jsou přenášeny vodivými pletivy a mezibuněčným transportem. Fytohormony můžeme rozdělit do pěti skupin na auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou a ethylen. Mimo ně existují v rostlinách látky, které regulují růstovou aktivitu ve vyšších koncentracích a nebo do teď nejsou objasněny přesné účinky a působení. Fytohormony se od hormonů živočišných značně liší. Většina hormonů je syntetizována na rozličných místech v rostlině a jsou výrazně méně specifické. Každý z hormonů ovlivňuje více procesů a jednotlivý proces může být ovlivněn větším počtem různých látek. Mechanismus působení hormonů rostlinných se velmi podobá mechanismům u hormonů živočišných (Procházka a kol., 1998).

Auxin je nejdéle známým fytohormonem. Byl objeven ve 20. letech minulého století na základě jejich schopnosti stimulovat prodlužování buněk. Objev auxinu vyšel ze studia fototropizmu a gravitropizmu, které započal už Charles Darwin. Podstatu tropizmů se podařilo objasnit F. W. Wentovi, kdy ve 30. letech 20. století prokázal, že špičky koleoptilí produkují látku, která difunduje do agaru a stimuluje prodlužovací růst (v řečtině *auxein* znamená růst). Přirozené auxiny jsou si velmi strukturně podobné, patří mezi ně např. kyselina indolyl-3-octová (IAA) (Obr. 1), kyselina indolyl-3-másečná (IBA), kyselina 4-chlorindolyl-3-octová (4-Cl-IAA). IAA se tvoří na mladých rychle se dělících buňkách v apikálním meristému stonku, mladých listech, v emryích a meristémech kořene. Hladinu auxinu často ovlivňují gibereliny. Biosyntéza může probíhat několika cestami. Jedna z nich vychází z tryptofanu a má několik větví, druhá, tzv. cesta nezávislá na tryptofanu, vychází z indolyl-3-glycerofosfátu. Transport auxinů na krátké vzdálenosti probíhá přes membránový a polární transport. Auxin je jediný hormon transportovaný mezi buňkami polárně - ve stonku bazipetálně, v kořeni akropetálně. Ve stonku a v listech je auxin také přepravován parenchymálními buňkami (Procházka a kol., 1998).

IAA je slabá kyselina působí na prodlužování buněk. Vyšší koncentrace IAA v kořeni prodlužování kořene inhibuje. Předpokládá se, že auxin v těchto buňkách stimuluje aktivitu H^+ ATPáz, které působí snížení pH v buněčné stěně a následnou aktivací mechanismů, které započnou změnu buněčné stěny.

Vliv prodlužování buněk významně ovlivňuje pohybové reakce rostliny. Reakcí na fototropizmus, gravitropizmus a thigmotropizmus je auxin laterálním transportem v pletivu nerovnoměrně zastoupen. Auxin také inhibuje vývoj axilárních meristémů v pupenech a postranních stonků. Tento jev se označuje jako apikální dominance. Auxiny dále stimuluji

diferenciaci vodivých pletiv a aktivitu kambia, oddalují opad listů a ovlivňují růst prvního vývoj plodů (Trigiano a Gray, 2005).



Obr. 1. Strukturní vzorec molekuly IAA.

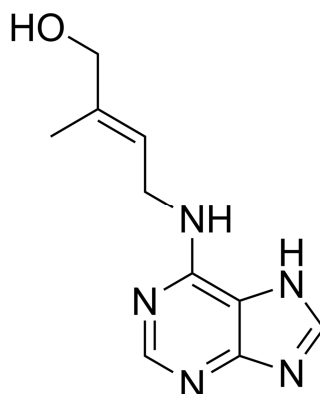
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/41/IAAII.png/175px-IAAII.png>

staženo 2.12.2013

Cytokininy byly objeveny ve 50. letech 20. století díky schopnosti vyvolávat dělení buněk. základním přírodním cytokininem je zeatin, ostatní cytokininy jsou definovány jako látky, které mají podobné účinky jako zeatin (Obr. 2). Většina cytokininů jsou aminopuriny substituované v pozici N⁶ řetězcem pěti atomů C (zeatin) nebo aromatickým jádrem (benzyladenin), které mohou být dále modifikovány. Kinetin, chemicky furfuryladenin, obsahuje pětičlenný kruh s atomem kyslíku. Cytokininy se mohou vyskytovat ve formě *cis*- a *trans*-. Obě formy jsou enzymaticky konvertovatelné, forma *trans* je fyziologicky efektivnější. Mezi další přirozené cytokininy patří dihydrozeatin (DZ) a izopentenyladenin (iP). V současnosti je známo nad 200 látek přirozených a synteticky připravených, které vykazují cytokininovou aktivitu. Cytokininy se tvoří v kořenech, embryích, mladých listech a plodech. Z hlavního místa jejich tvorby, kořenového apikálního meristému, jsou transportovány xylémem do nadzemní části ve formě inaktivních sacharidových konjugátů. Cytokininy mají velmi různé fyziologické účinky. Mají zásadní vliv na dělení buněk. Hladina zeatinu se zvyšuje během mitózy a fáze G1. Snižují apikální dominanci, zvětšují objemový růst buněk a zároveň inhibují prodlužující růst internodií a kořenů. Působí na transportní procesy v rostlině, ovlivňují diferenciaci vodivých pletiv v kořenu a oddalují senescenci. Receptorem cytokininů byl prokázán protein CRE1 a existuje patrně více strukturně si

blízkých receptorů. CRE1 se nachází na plasmatické membráně a po navázání cytokininu je začátkem pro signální dráhu která má za následek změny exprese genů (Trigiano a Gray, 2005).

V praxi se cytokininy využívají jako součást kultivačních médií a při regeneraci rostlin *in vitro*. Synteticky připravené cytokininy jsou testovány pro použití v zemědělství.



Obr. 2. Strukturní vzorec molekuly Zeatinu.

<http://figures.boundless.com/4ff32ba8246b709a9cd7999c/full/zeatin.png>

staženo 7.12.2013

3.2.2.2 Vliv genotypu a kultivační podmínky

Genotyp topolu hraje významnou roli při odvození *in vitro* kultury. Některé genotypy se do *in vitro* podmínek doposud nepodařilo převést. Kultivační podmínky a kultivační médium jsou pro různé genotypy specifické. Univerzální médium pro *in vitro* kultivaci topolu neexistuje.

Úspěšná sterilizace je jedním ze základních předpokladů pro odvození *in vitro* kultury. Ve vědeckých studiích se jednotlivé sterilizace, kultivační podmínky, složení kultivačního média často liší podle genotypu a podle autora dané práce.

Kang a kol. (2009) se ve své práci zabýval odvozením kultury topolu *Populus trichocarpa* Nisqually-1 vybraného pro studium genomu. Pro mikropropagaci byly odebrány 5 cm dlouhé výhonky ze zelených rostlin. Explantáty byly postupně sterilizovány 1% roztokem Tween-20 po dobu 5 min, 70% ethanolem po 1 min a 0,525% chlornanem sodným po dobu 15 min. Explantáty byly poté 3krát propláchnuty sterilní destilovanou H₂O po dobu 5 min. Médium pro odvození primární kultury obsahovalo mikro a makro elementy od Murashige and Skoog (MS), které bylo obohaceno o vitamíny, myo-inositol (100 mg/l), 3% sacharózu, 0.8% agar. pH bylo upraveno na 5,8 a médium autoklávováno při 120 °C a 103,5 Pa po dobu 20 min. Médium pro odvození primární kultury bylo doplněno o BAP a v rámci experimentu byla zjišťována jeho nejvhodnější koncentrace. Podle výsledků bylo nejvhodnější médium bez cytokininů. V práci je dále doporučeno použít Gelrite namísto agaru, který při experimentu pozitivně ovlivnil životnost explantátů. Dále bylo zjištěno, že 10 g/l aktivního uhlí v médiu zvyšuje koncentraci chlorofylu A. Pozitivně také ovlivňuje růst celého explantátu.

Malá a kol. (2006) studovala možnost zvýšení fytořediační schopnosti topolu. Byl vybrán evropský topol (*Populus tremula*) a hybridní topol (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*), které rostou ve znečištěných oblastech. Cílem práce bylo vybrat a namnožit rostlinný materiál metodou *in vitro*. Primární kultura byla odvozena z dormantních pupenů 24 let starého stromu. Explantáty byly odebrány na jaře, sterilizovány roztokem 0,01% HgCl₂ a 1% Sava. Poté byly 3krát promyty destilovanou H₂O. Pro indukci organogeneze bylo použito MS médium, přidána byla sacharóza (30 g/l), glutamin (10 mg/l), BAP (1 mg/l), IBA (0,1 mg/l) a agar (6 g/l). Pro multiplikaci se osvědčilo agarové MS médium s nižší koncentrací BAP (0,2 mg/l) a vyšší koncentrací glutaminu (100 mg/l). Také byl navržen

nejvhodnější konstrukt pro zvýšení efektivity transformace stonkových explantátů u použitých klonů topolu.

Meilan a Ma (2007) navrhli protokol pro multiplikaci několika genotypů topolů určených pro transformaci. Při studii byly použity klony *Populus deltoides*, *Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*, *Populus deltoides* × *Populus nigra*. Primární kultura byla odvozena z 8 – 10 cm dlouhých výhonků 3–6 let starých rostlin ze skleníku. Explantáty byly sterilizovány sterilní destilovanou H₂O, 70% ethanolem po dobu 1–3 min a 5% roztokem chlornanu sodného a Tritonu X-100 podobu 10–12 min. Poté byly explantáty promyty 3krát sterilní destilovanou H₂O a následně skalpelem rozřezány na 5 – 8 mm segmenty, které byly umístěny na médium na Petriho misku. Pro indukci organogeneze bylo zvoleno MS médium s polovičním obsahem makro a mikro elementů. Médium bylo doplněné o glutamin (200 mg/l), myo-inositol (100 mg/l). Pro multiplikaci bylo do média přidán BAP (0,2 mg/l), zakořeňovací médium obsahovalo vyšší koncentraci agaru a IBA (0,1 mg/l). Zakořeňené explantáty byly po 1–2 měsících přeneseny zakořeňovacích jiffů a po dvou až 3 týdnech aklimatizace přesazeny do skleníku.

Thidiazuron (TDZ), potenciální cytokinin pro zvýšení efektivity regenerace u Himalajského topolu (*Populus ciliata* Wall) publikoval Aggarwal a kol. (2012). Efekt TDZ samotného a s kombinací s NAA byl studován na potenciální regeneraci listových explantátů. Primární explantáty byly ponořeny 1,5 hod pod tekoucí vodu, následně byl povrch sterilizován roztokem 0,2% Bavistanu a 0,1% HgCl₂ po dobu 2 min. Poté byly explantáty několikrát promyty sterilní destilovanou H₂O. Jako základní regenerační médium bylo zvoleno MS médium obohacené o vitamíny, 3% sacharózu a 0,8% agar. Ze 13 rozdílných koncentrací a kombinací TDZ se ukázalo jako nejvhodnější základní regenerační médium, obohacené o TDZ (0,024 mg/l) a adenin (79,8 mg/l). Následně pro multiplikaci a elongaci bylo využito médium s BAP (0,5 mg/l) a IAA (0,2 mg/l). Explantáty zakořeňovaly nejlépe na médium s IBA (0,1 mg/l). Po úplném vývoji kořenového systému byly explantáty přeneseny do zeminy a udržovány ve vlhkých podmínkách.

Chaturvedi a kol. (2004) se jako první zabýval mikropropagací klonů *Populus deltoides* pomocí *in vitro* regenerace z listových explantátů. Jako primární rostlinný materiál byl zvolen segment výhonku o 1 – 2 nodech, odebrán na začátku jara z dospělého stromu. Explantáty byly nejprve 30 min ponořeny pod tekoucí filtrovanou H₂O, poté sterilizovány 5% Laboline Solution (neutrální tekutý detergent) po dobu 5 min a následně byl povrch

sterilizován 0,1% HgCl₂ po 15 min. Poté byl povrch explantátu několikrát omyt sterilní destilovanou H₂O. Sterilní explantáty byly přeneseny na modifikované MS médium navržené pro regeneraci, které bylo obohaceno o BAP (0,25 mg/l), IAA (0,25 mg/l) a AdS (15 mg/l). Modifikované MS bylo rozdílné oproti originálnímu MS v koncentraci (NH₄)₂SO₄ a MgSO₄. Z výsledků je patrné, že vysoká koncentrace BAP způsobila indukci kalusu. Po regeneraci byly 3 cm vysoké explantáty přeneseny na zakořeňovací MS médium doplněno o IAA (0,25 mg/l), kde po 20–25 dnech zakořenily. Do *in vivo* podmínek následně přežilo přesun 80 % rostlin.

První *in vitro* kolekce evropských topolů byla založena ve Španělsku v roce 2007. Kolekce obsahovala 32 geneticky zajímavých klonů *Populus tremula* (Martin a kol., 2007). K udržení kolekce bylo navrženo finančně nenáročné univerzální MS médium obohaceno o BAP (0,1 mg/l). U klonů se projevil vysoký stupeň genotypové biodiverzity, který byl doporučen k budoucí analýze.

Marcotrigiano a Stimart (1983) popsali mikropropagaci u *Paulownia tomentosa* Steud. Explantáty byly umístěny na médiu obohaceno o IAA a kinetin. Multiplikovány byly na médiu s BAP (0,1 mg/l) a IBA (1 mg/l). Na bázi výhonků se u některých explantátů objevil při multiplikaci kalus. Mikropropagací a studiem tetraploidních rostlin *Paulownia tomentosa* se zabýval také Tang a kol. (2010). Pro proliferaci navrhl MS médium obohaceno o 2,4-D (2,26 μM) a BAP (8,89 μM), na kterém explantáty vytvořily po 4 týdnech ve tmě kalus. Kalus byl následně přenesen na regenerační médium, které obsahovalo NAA (1,61 μM), BAP (22,19 μM) a aktivní uhlí (0,3 g/l).

3.2.2.3 Faktory ovlivňující efektivitu množení

Kromě složení kultivačního média, kultivačních podmínek, výrazně ovlivňuje efektivitu množení v *in vivo* a *in vitro* zdravotní stav mateční rostliny. Houbové onemocnění rostlin má negativní dopad na efektivní množení a stav budoucích jedinců. Množení řízkováním dochází velmi často k přenosu choroby, řízky poté špatně zakořeňují, je pozorován zpomalený vývoj a morfologické deformace.

Jedním z houbových onemocnění topolu je *Dothichiza populea*. Nejnáchylnější pro tuto chorobu jsou mladé stromy v lesních školkách, stromy přestárlé a stromy vystavené značnému vnějšímu stresu. Důsledkem infekce je odumření, neatraktivní vzhled, možný je i úhyn celého stromu. Vnitřní poškození kmenu často vede k sekundárním infekcím. Kontrola infekce se nejčastěji provádí pomocí pěstebních metod. Stromy je doporučeno sázet ve větších vzdálenostech od sebe, napadené části je třeba odstranit z infikovaných stromů. Prořezávání by mělo být provedeno pouze v průběhu vegetačního období, nikoli v chladných obdobích roku. Moderní fungicidy nejsou proti této chorobě zcela účinné a postřik rostlin by měl být proto aplikován několikrát do roka (Sinclair a kol., 1987).

4. Materiál a metodika

4.1 Rostlinný materiál

Pro bakalářskou práci byly použity genotypy topolů (Tab. 1), které byly získány z genové banky Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti z Výzkumné stanice Kunovice (Obr. 3).

Tab. 1. Přehled použitých genotypů a klonů topolů.

Genotyp	Klon
<i>Populus nigra</i>	P-004
<i>Populus nigra</i>	P-005
<i>Populus nigra</i>	P-009
<i>Populus nigra</i>	P-028
<i>Populus nigra</i>	P-030
<i>Populus nigra</i>	P-031
<i>Populus nigra</i>	P-036
<i>Populus nigra</i>	P-052
<i>Populus nigra</i>	P-055
<i>Populus nigra</i>	P-057
<i>Populus nigra</i>	P-058
<i>Populus nigra</i>	P-059
<i>Populus nigra</i>	P-653
<i>Populus</i> × <i>canadensis</i> Moench., cv. <i>Robusta</i>	-
<i>Populus tremula</i> × <i>Populus tremuloides</i>	-
<i>Populus tremula</i>	-
<i>Populus trichocarpa</i>	-
<i>Populus nigra</i> × <i>Populus maximowiczii</i>	-

Od každého klonu *Populus nigra* bylo kultivováno přes 250 explantátů. Od ostatních genotypů bylo kultivováno přes 50 explantátů. Dohromady bylo během bakalářské práce kultivováno přes 2500 explantátů topolu pro odvození primární kultury.

Dodatečně bylo do bakalářské práce zařazeno odvození *in vitro* kultury paulovnie, která byla odvozena ze semen *Paulownia tomentosa* biomass.



Obr. 3. Odběr topolů ve Výzkumné stanici Kunovice.

4.2 Metodika *in vitro* množení

4.2.1 Odběr rostlinného materiálu

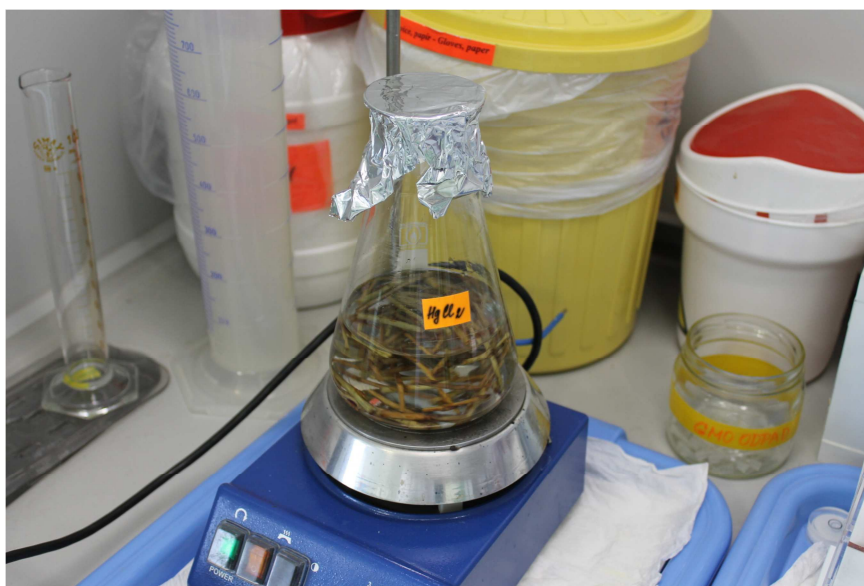
Odběr materiálu proběhl v roce 2013 – 2015 vždy na jaře před vyrašením prvních pupenů. Z víceletých rostlin byly odebírány vrcholové jednoleté prýty o délce 20 – 30 cm (Obr. 4). Prýty byly zbaveny listů a před sterilizací byly ponořeny v destilované vodě 24 hod. V roce 2015 byly prýty před sterilizací ošetřeny 2% roztokem fungicidu Bavistin po dobu 24 hod.



Obr. 4. Odebrané prýty topolů z matečních rostlin.

4.2.2 Sterilizace

Před sterilizací byly prýty nařezány na 3 cm dlouhé segmenty, které obsahovaly adventní pupen. Explantáty byly nejprve promyty 3krát sterilní destilovanou H_2O , následně sterilizovány 70% NaOH po dobu 10 min. Poté se v rámci experimentu testovala účinnost čtyř různých druhů sterilizace. Působení 0,3% $HgCl_2$ po dobu 10 min (Obr. 5), 2,5% Savo po 10 min, 2,5% NaClO po 20 min, 5% PPM (Plant Preservative Mixture) po 24 hod. Po sterilizaci před přenosem na kultivační médium byly od jednotlivých explantátů odstraněny nekrotizované tkáně.



Obr. 5. Sterilizace explantátů chloridem rtuťnatým.

Primární kultura *Paulownia tomentosa* biomass byla odvozena ze semen. Semena byla sterilizována 3% NaClO po dobu 20 min, poté byla promyta 3krát sterilní destilovanou H₂O a asepticky přemístěna na živné médium.

4.2.3 Kultivační podmínky

Pomocí nástrojů sterilizovaných v 70% ethanolu a ožehnutím nad plamenem byly explantáty přeneseny do kultivační nádoby a utěsněny parafilmem, aby nedošlo ke kontaminaci. Takto zabezpečené vzorky byly přemístěny do kultivační komory, ve kterém byly kultivovány při teplotě 22 °C s denním režimem 16/8 hod (den/noc) pod bílým osvětlením 9800 luxů.

4.2.4 Kultivační médium

Pro náš experiment bylo pro odvození kultury použito pevné médium Murashige and Skoog (1962), které bylo připraveno následujícím způsobem: V 0,5 l destilované H₂O bylo za stálého míchání na magnetické míchače rozpuštěno 20 g sacharózy, 4,4 g média MS obohacené o vitamíny (kat. č. M0222.0050). Všechny složky byly naváženy na analytických vahách a po jejich rozpuštění byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 1l v odměrném válci. Poté bylo pomocí 1M hydroxidu sodného pH upraveno na hodnotu 5,8 a roztok byl přelit do lahví Fisherbrand vhodných pro sterilizaci v autoklávu. Do lahví byl následně přidán agar (6 g/l) a

médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po částečném vychladnutí byly do tekutého média za sterilních podmínek v laminárním boxu přidány sterilní regulátory růstu (Tab. 2). Médium bylo následně rozděleno do kultivačních nádob. Jako sterilní kultivační nádoba byly použity plastové misky s filtrem, skleněné baňky o objemu 250 ml a Petriho misky. Po ztuhnutí agarů v kultivačních nádobách byly na médium přeneseny explantáty. V závislosti na druhu experimentu byly explantáty na nová média přeneseny každé 2 – 3 týdny.

Tab. 2. Koncentrace rostlinných hormonů v jednotlivých médiích určených pro mikropropagaci (v mg/l)

Médium	BAP	tZ	IBA	IAA
A	-	-	-	-
B	1,0	-	0,1	-
C	0,3	-	-	0,2
D	0,5	-	0,1	-
E	-	0,5	0,1	-

Vzhledem ke kontaminacím, které se objevily při zakládání sterilních kultur bylo do média přidáváno po autoklávování Plant Preservative Mixture (Plant Cell Technology). PPM je tepelně stabilní konzervační prostředek, který účinně zabraňuje nebo redukuje mikrobiální kontaminaci v rostlinných tkáňových kulturách. Ve vyšších koncentracích, může odstranit endogenní kontaminace explantátů. Bylo prokázáno, že aktivní složky PPM jsou schopné proniknout přes buněčnou stěnu bakterií a hub a inhibují aktivitu klíčových enzymů centrálních metabolických procesů. Při použití vhodné koncentrace v kultivačním médiu PPM nemá vliv na vitalitu a vývoj explantátu (PPM protocol). V našem případě bylo do média přidáváno 5 ml/l PPM po autoklávování média.

Pro odvození *in vitro* kultury *Paulownia tomentosa* biomass byla navržena tato média: Médium pro vyklíčení, proliferaci a indukci organogeneze obsahovalo MS obohacené o vitamíny (4,4 g/l), sacharózu (30 g/l), agar (6 g/l), BAP (3 mg/l). pH média bylo upraveno na hodnotu 5,8. Do média explantátům určenému pro zakořenění nebyly přidány rostlinné hormony.



Obr. 6. Příprava kultivačního média v laboratoři

5. Výsledky

Cílem experimentů v rámci bakalářské práce bylo navrhnout nejvhodnější sterilizaci explantátů pro mikropropagaci vybraných genotypů topolu a navrhnout vhodná média pro jejich mikropropagaci.

Součástí bakalářské práce bylo také navrhnout účinnou metodu sterilizace semen *Paulownia tomentosa* biomass a navrhnout média pro mikropropagaci.

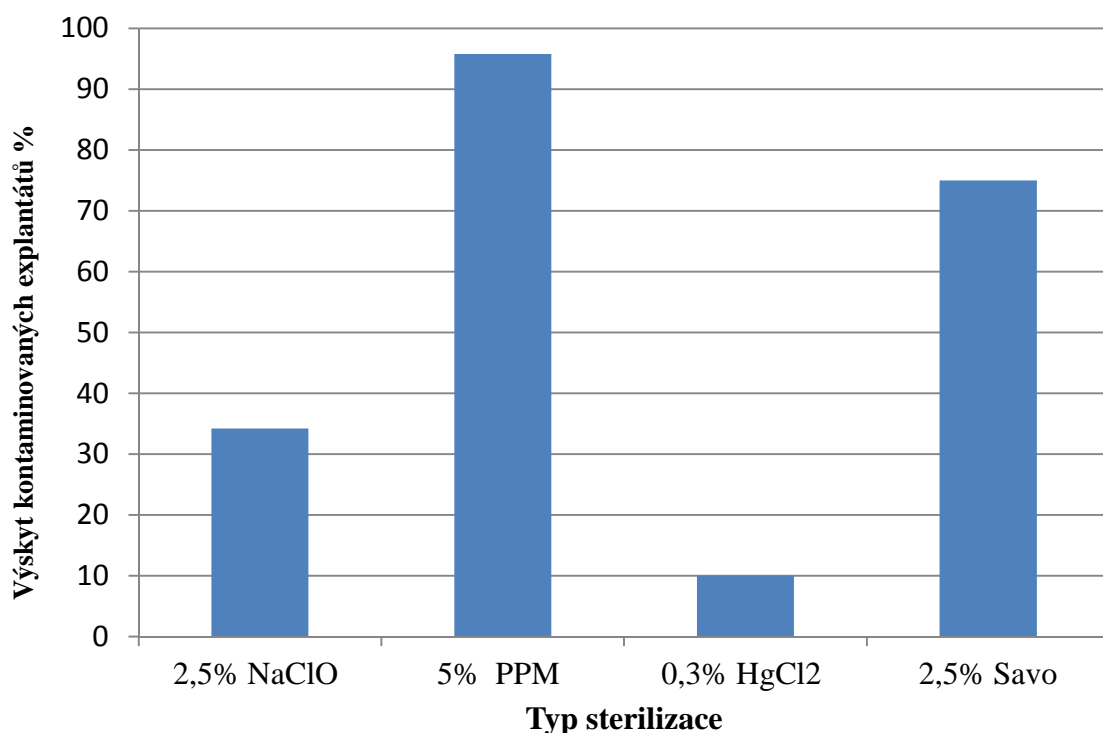
5.1 Sterilizace

Základem funkční metodiky mikropropagace je odvození sterilní kultury. V rámci bakalářské práce byly testovány čtyři různé způsoby povrchové sterilizace. Různé možnosti sterilizace byly testovány na genotypu *Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta* (Tab. 3). Po sterilizaci byly explantáty přeneseny na MS médium, které neobsahovalo růstové hormony. Po 3 týdnech kultivace byla kultura kontrolována.

Tab. 3. Výsledky povrchové sterilizace *Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta*.

Sterilizace doba působení	Počet explantátů	Počet kontaminovaných explantátů	Kontaminace %
2,5% NaClO 20 min	120	41	34,2
5% PPM 24 hod	120	115	95,8
0,3% HgCl ₂ 15 min	120	12	10,0
2,5% Savo, 15 min	120	90	75,0

Graf. 1. Úspěšnost povrchové sterilizace



Jako nejvhodnější pro odvození primární kultury byla vybrána nejúčinnější sterilizace, a to pomocí 0,3% roztoku HgCl_2 po dobu 15 min, při které kontaminovalo pouze 10 % explantátů (Graf. 1). Bylo zjištěno, že při kratší době sterilizace pomocí HgCl_2 všechny explantáty kontaminovaly, při delší době sterilizace docházelo k nekrotizaci explantátů. Ostatní námi testované sterilizace nebyly dostatečně účinné a byly vyhodnoceny jako nevhodné pro odvození primární kultury topolu.

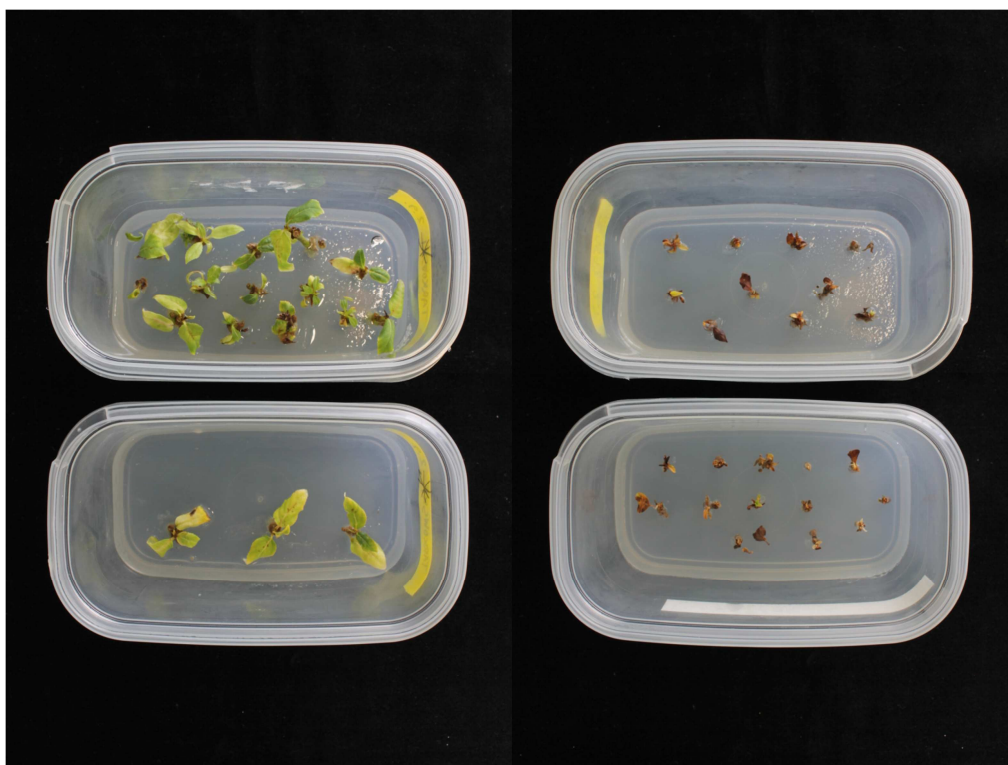
Sterilizace primární kultury topolu pomocí PPM byla navržena dle protokolu výrobce. Na základě našich výsledků se ukázalo, že sterilizace samotným roztokem PPM, u které kontaminovalo 95 % explantátů, je pro odvození primární kultury zcela nedostačující a nevhodná.

Povrchová sterilizace genotypu *Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta* byla úspěšná a podařilo se založit sterilní kulturu. Sterilizace pomocí roztoku HgCl_2 byla následně

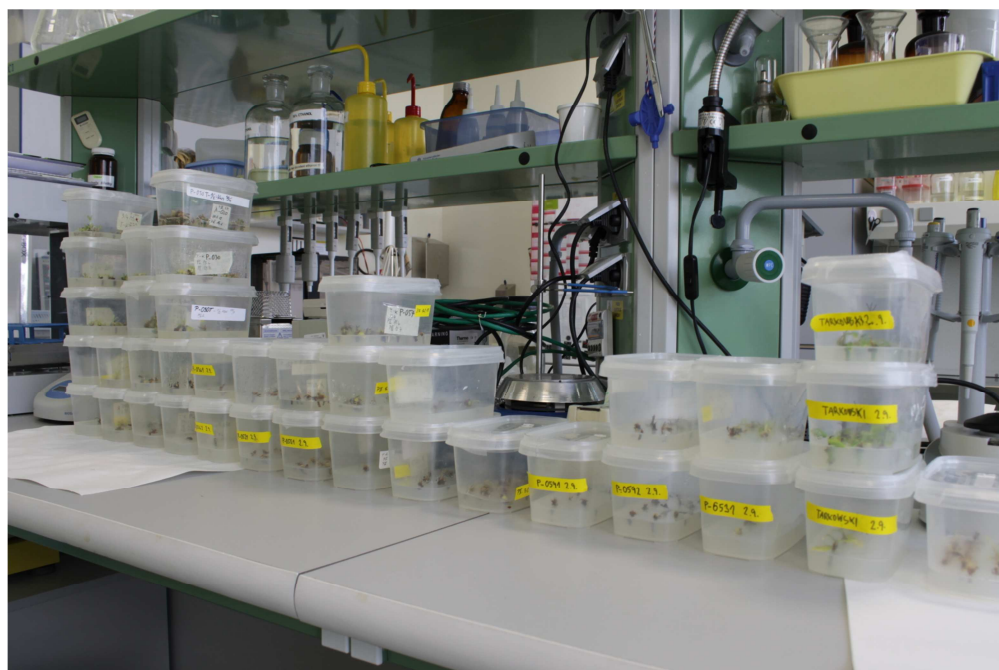
použita u ostatních genotypů pro odvození sterilní kultury. U některých genotypů se i přes nejlépe zvolenou sterilizaci objevilo vysoké procento kontaminovaných explantátů. U některých se dokonce objevoval nový typ kontaminace i po druhém a třetím pasážování. Bylo zjištěno, že zvolená povrchová sterilizace není schopna účinně sterilizovat explantáty a zamezit tak endogenní kontaminaci. Z tohoto důvodu bylo dle návodu výrobcem do všech médií přidáváno 1% PPM, které značně snížilo procento kontaminace.

5.2 Kultivační médium

Sterilizované explantáty genotypů topolu byly pasážovány na média, které byly označeny A, B, C, D, E (Tab. 2). První kultivace adventivních pupenů byly provedeny na médiu B, na kterém byly kultivovány klony *Populus nigra*. Při každém testování bylo použito 50 explantátů od každého klonu. I přes veškerou snahu se od některých klonů nepodařilo odvodit sterilní kulturu a kontaminace se objevovala i během druhého a třetího pasážování. U klonů se během experimentu projevila biologická diverzita. V *in vitro* podmínkách nejlépe rostly klony P-055, P-057 a P-058. Naopak u klonů P-009, P-031 a P-036 nebyl pozorován téměř žádný růst a během prvních dvou týdnů většina explantátů znekrotizovala. Srovnání růstu klonů P-055 a P-009 po 3 týdnech kultivace viz Obr. 7. Po čtyřech týdnech došlo u všech klonů *Populus nigra* ke stagnaci růstu. Experiment byl poté zopakován na médiu C a médiu D s téměř totožnými výsledky. Na obou typech médiích docházelo ke stagnaci růstu, ke žloutnutí listů a žádnému klonu se nepodařilo přežít 8 týdnů. Do média bylo přidáno aktivní uhlí (10 mg/l), aby se předešlo úbytku chlorofylu. Nebyl však pozorován výraznější efekt. Během pokusu byly explantáty vždy po dvou týdnech přepasážovány na nově připravená čerstvá média.



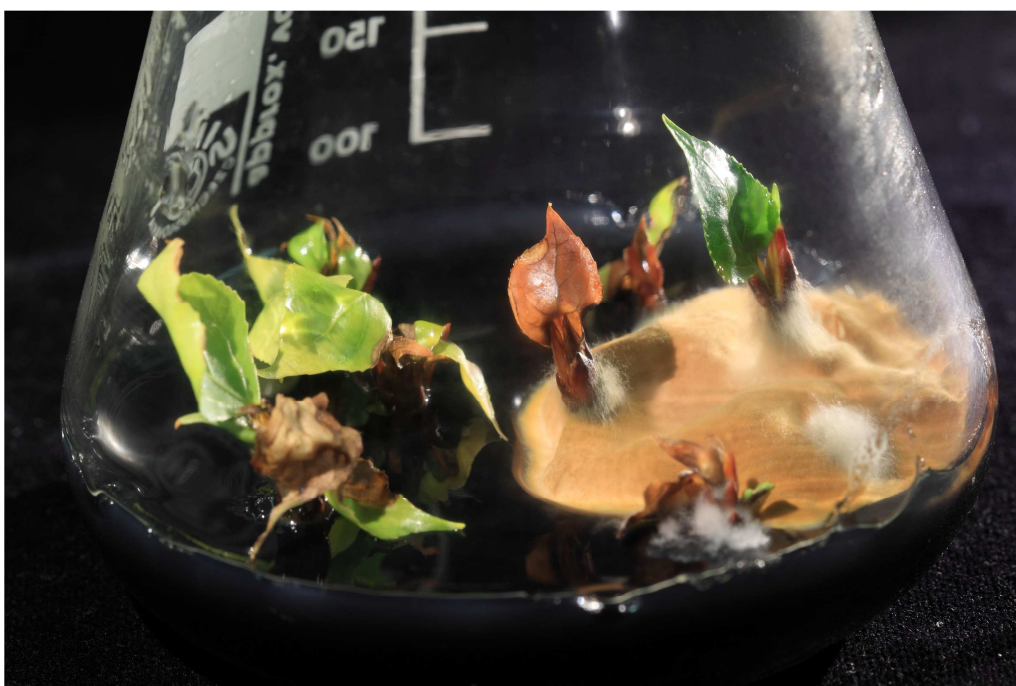
Obr. 7. Srovnání růstu klonů P-055 (na pravo) a P-009 (na levo) po 3 týdnech kultivace



Obr. 8. Kontrola růstu explantátů.



Obr. 9. Kontaminace a růst *Populus nigra* 3 týdny po sterilizaci.

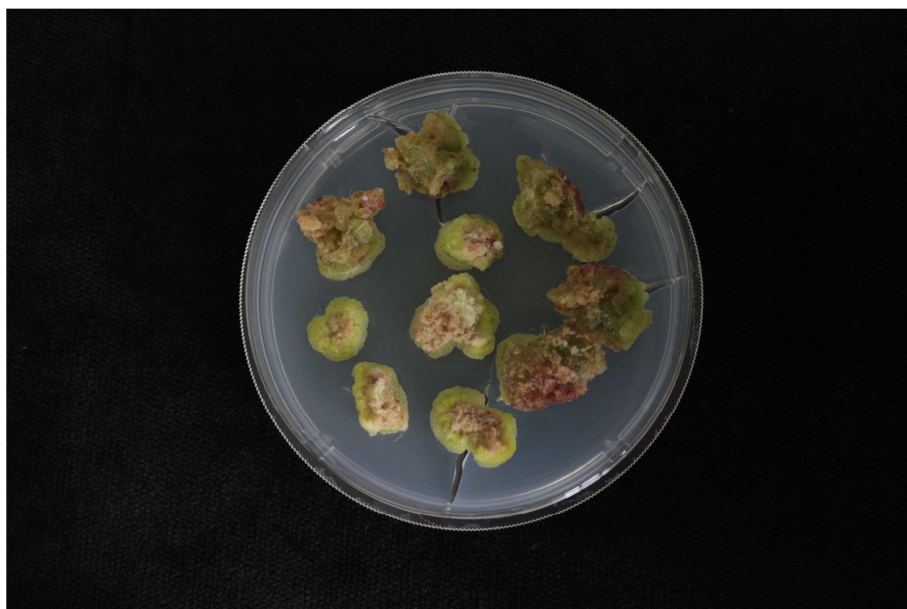


Obr. 10. Kontaminace u explantátů *Populus nigra* u druhého pasážování.

Žloutnutí listů a stagnace růstu byly po konzultaci s Ing. Kyselákovou (VÚLHM) zdůvodňovány napadením stromů houbovou chorobou *Dothichiza populea*. S největší pravděpodobností touto chorobou byly napadeny všechny stromy, ze kterých byly vzorky odebrány. Tato choroba znemožňuje odvození stabilní *in vitro* kultury a není ji schopné zcela

zahubit povrchovou sterilizací. Je ale možné, že *Populus nigra* není vhodný pro *in vitro* kultivaci.

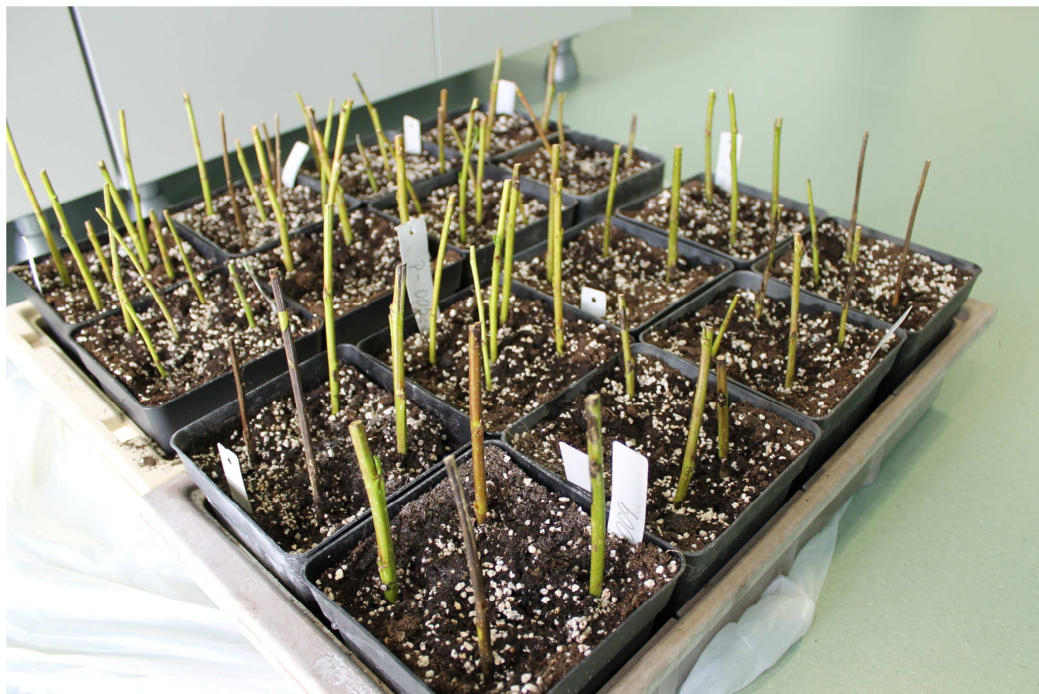
V dalším experimentu byl genotyp *Populus x canadensis* Moench.,cv. *Robusta* testován na médiu E. Trans-Zeatin byl v tomto pokusu vybrán z důvodu studia přirozeně se vyskytujících aromatických cytokininů, které probíhalo pod vedením doc. Tarkowského, Ph.D. Většina explantátů na médiu E ale stagnovala v růstu a u některých explantátů se objevil kalus. Kalus byl následně přemístěn na médium A (Obr. 11) a médium B ale ani po 6 týdnech nedošlo u kalusu k indukci organogeneze.



Obr. 11. Kalus *Populus x canadensis* Moench.,cv. *Robusta* na médiu A

Genotypy *Populus tremula* × *Populus tremuloides*, *Populus tremula*, *Populus trichocarpa* a *Populus nigra* × *Populus maximowiczii* byly testovány na médiu B a médiu D. U *Populus tremula* došlo k výrazné nekrotizaci tkáně explantátů do prvního týdne od sterilizace. U *Populus tremula* × *Populus tremuloides* všechny explantáty do třech týdnů kontaminovaly. Nejlepší růst byl pozorován u genotypů *Populus nigra* × *Populus maximowiczii* a *Populus trichocarpa*. U těchto dvou genotypů, začalo růst 30 % explantátů, u kterých se zdařila sterilizace a nedošlo k nekrotizaci. Všechny explantáty ale stagnovaly po 4 týdnech v růstu a nekrotizovaly po 2 měsících kultivace. U těchto genotypů byla také testována možnost *in vivo* množení řízkováním pomocí prýtů z matečních rostlin. Prýty byly

zasazeny do květináčů směsi perlitu a hlíny v poměru 1:1 (Obr. 12). Květináče byly udržovány vlhké a umístěny ve skleníku. Všechny řízků během 4 týdnů zakořenily a dál pokračovaly v růstu (Obr. 13).



Obr. 12. Zasazené prýty topolů pro množení *in vivo* pomocí řízkování.



Obr. 13. Množení topolů *in vivo* pomocí řízkování po 4 týdnech.

Kontrola růstu explantátů a přemístění na nové médium probíhalo vždy ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Médium pro multiplikaci a pro zakořenění nebylo v našem experimentu navrženo, protože nebyla odvozena stabilní primární kultura u žádného z vybraných genotypů.

5.3 Kultivace *Paulownia tomentosa* biomass

U *Paulownia tomentosa* biomass došlo k úspěšné sterilizaci semen pomocí chlornanu sodného a k jejich vyklíčení. Nebyla pozorována téměř žádná kontaminace a u explantátů se objevil signifikantní růst. Po 3 týdnech by jednotlivé explantáty rozřezány skalpelem na 1 cm velké části se stonkem a listem (Obr. 12), které byly na novém médiu multiplikovány. Multiplikace se zdařila u všech založených explantátů. Došlo k namnožení rostlin během dvou měsíců a kultura byla udržována v *in vitro* po dobu více jak 16 měsíců. Jednotlivé rostliny zakořenily na MS médiu bez rostlinných hormonů. Z experimentu vyplývá, že u *Paulownia tomentosa* biomass je možné odvodit stabilní *in vitro* kulturu.



Obr. 14. *Paulownia tomentosa* biomass po založení explantátů na médiu pro multiplikaci.



Obr. 15. *Paulownia tomentosa* biomass týden po založení explantátů pro multiplikaci.

6. Diskuze

Odvození sterilní kultury – primokultury je i u topolu tou nejdůležitější podmínkou mikropropagace. V rámci bakalářské práce byly při navrhování nejúčinnější sterilizace použity postupy z dostupné literární publikace. V našem experimentu byly testovány všechny sterilizace na genotypu *Populus x canadensis* Moench., cv. *Robust*. Kang a kol. (2009) se zabýval odvozením kultury *Populus trichocarpa* Nisqually-1 určeného pro studium genomu a pro odvození aseptických explantátů doporučil sterilizaci pomocí 0,525% chlornanu sodného po dobu 15 min. Sterilizace pomocí 2,5% chlornanu sodného po dobu 20 min u našeho použitého genotypu nebyla dostatečně účinná, u 34,4 % explantátů se objevila kontaminace. Meilan a Ma (2007), kteří navrhli protokol pro multiplikaci vybraných genotypů topolů určených pro transformaci, použili při sterilizaci primární kultury 5% chlornan sodný s kombinací s Tritonem X-100 po dobu 10–12 min. Tato koncentrace chlornanu se ale u našeho genotypu projevila jako příliš silná, došlo k nekrotizaci rostlinného materiálu. Malá a kol. (2006) použila při studii evropských topolů sterilizaci primární kultury roztok 0,01% chloridu rtuťnatého a 1% Sava. V našem experimentu byla testována sterilizace pomocí 2,5% Sava po dobu 15 min. Sterilizace se projevila jako neúčinná. Chaturvedi a kol. (2004), který se zabýval mikropropagací klonů *Populus deltoides*, použil při sterilizaci 0,1% chlorid rtuťnatý po dobu 15 min. U testovaného genotypu byla tato sterilizace neúčinná. Následně bylo ale zjištěno, že vyšší koncentrace tj. 0,3% chloridu rtuťnatého podobu 15 min je dostatečně účinná a pouze u 10 % explantátů se objevila kontaminace. Tuto sterilizaci jsme vyhodnotili jako nejvhodnější pro zakládání kultury genotypu *Populus x canadensis* Moench., cv. *Robust*. Sterilizaci primární kultury pomocí chloridu rtuťnatého použil také Aggarwal a kol. (2012) při studiu efektivity regenerace *Populus ciliata* Wall v *in vitro* podmínkách. Pro jeho studii ale byla zvolena nižší koncentrace chloridu rtuťnatého a kratší doba sterilizace.

V rámci bakalářské práce byla testována MS média obohacená o různé koncentrace rostlinných regulátorů pro odvození primární kultury vybraných genotypů topolů a jejich klonů. Navržená MS média se lišila obsahem rostlinných hormonů. Malá a kol. (2006) pro odvození primární kultury genotypů *Populus tremula* a *Populus tremula x Populus tremuloides* navrhla použít MS médium obohacené o BAP (1 mg/l) a IBA (0,1 mg/l). V našem experimentu byla testována stejná koncentrace hormonů u stejných genotypů, přesto se nepodařilo odvodit stabilní *in vitro* kulturu. U genotypu *Populus tremula* došlo k výrazné nekrotizaci tkáně explantátů do prvního týdne od sterilizace. U všech explantátů *Populus*

tremula × *Populus tremuloides* se do 3 týdnů objevila kontaminace. V našem experimentu bylo dále testováno vhodné složení média pro odvození primární kultury genotypu *Populus nigra*. Pro odvození *in vitro* kultury je nezbytné použít pletiva zdravé mateční rostliny. Mateční rostliny, ze kterých byly odebírány explantáty, byly nakažené houbovou chorobou *Dothichiza populea*. Žádná z použitých sterilizací nebyla dostatečně účinná proti této chorobě a *Dothichiza populea* tak negativně ovlivňovala růst a stav *in vitro* explantátů. Rovněž použití vyšší koncentrace PPM v médiu nebylo proti této chorobě účinné. Doposud není známá vědecká studie, která by se zabývala problematikou této choroby u *in vitro* mikropropagace topolů. Špatný zdravotní stav a úbytek chlorofylu u explantátů nebyl zvrácen ani obohacením média aktivní uhlí (10 g/l), jak ve své práci doporučuje Kang a kol. (2009). Předpokladem pro využití případné rekombinantní technologie u topolu je *in vitro* kultura (Biswas a kol., 2012). Jednotlivé genotypy a klony topolů využitě při našich experimentech projeví vysokou biodiverzitu v *in vitro* a zaslouží si podrobnější budoucí studie *in vitro* kultivace.

Na rozdíl od mikropropagace topolu odvození primární kultury *Paulownia tomentosa* biomass v *in vitro* podmínkách není natolik náročné. Výhodou *in vitro* kultivace *Paulownia tomentosa* biomass je možnost odvození kultury ze semen a následná multiplikace z částí explantátů. *Paulownia* biomass je navíc schopna růst na MS médiu neobsahující žádné rostlinné hormony. Jeden z možných využití *in vitro* kultivace *Paulownia tomentosa* biomass může být multiplikace rostlin, které lze v podmínkách *in vivo* použít pro produkci biomasy.

7. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo u vybraných klonů topolů ověřit možnost *in vitro* kultivace, navrhnout účinnou metodu sterilizace a vhodná média určená pro mikropropagaci. Na základě dostupné literatury byla navržena a testovány různé druhy sterilizace primárních explantátů. Jako nejúčinnější a nejvhodnější byla vybrána sterilizace pomocí 0,3% roztoku chloridu rtuťnatého po dobu 15 min, při které kontaminovalo pouze 10 % explantátů *Populus x canadensis* Moench., cv. *Robust*. Na základě dostupné literatury byla poté navržena média pro mikropropagaci. Od žádného s genotypů topolů se ale nepodařilo odvodit stabilní primární kulturu, která by přežila 8 týdnů. Možnost mikropropagace klonů genotypu *Populus nigra* byla navíc ztížena houbovou chorobou *Dothichiza populea*. Ani *in vitro* kultivací se nepodařilo rostlinný materiál do této choroby ozdravit. Médium pro multiplikaci a pro zakořenění nebylo v našem experimentu navrženo, protože nebyla odvozena stabilní primární kultura u žádného z vybraných genotypů. Celkově bylo v bakalářské práci založeno 2500 explantátů topolu. U vybraných genotypů topolu bylo úspěšně ověřeno *in vivo* množení pomocí řízkování. Dále bylo odvozena primární kultura *Paulownia tomentosa* biomass v *in vitro* podmínkách, u které byla navržena a otestována MS média pro indukci organogeneze, multiplikaci a zakořenění.

8. Literatura

Aggarwal, G., Sharma, C., Srivasta, D.K.: Thidiazuron: A potent cytokinin for efficient plant regeneration in Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall.) using leaf explants. *Annals of Forest Research*, 55(2), 179–188, 2012

Ahuja, M.R.: Micropropagation of Woody Plants. *Forestry science*: 3–7, 189–196, 1993. ISBN 978-0792318071

Bhojwani, S. S., Razdan, M. K.: *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a revised Edition. Elsevier 80–121, 1996. ISBN 0-444-81623-2

Biswas, K. K., Mohri, T.; Kogawara, S., Hase, Y., Narumi, I., Oono, Y.: An Improved System for Shoot Regeneration from Stem Explants of Lombardy Poplar (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne). *American Journal of Plant Sciences*: 3 (9), 1181–1186, 2012

Chalupa V., Durzan D. J.: Growth and development of resting buds of conifers *in vitro*. *Canadian Journal of Forest Research*, 3: 196–208, 1973

Chamrád, I., Simerský R., Béréšová, L., Strnad, M., Šebela, M., Lenobel, R.: Proteomic Identification of a Candidate Sequence of Wheat Cytokinin-Binding Protein 1. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 33 (4), 896–902, 2014

Chaturvedi, H.C., Sharma, A.K., Agha, B.Q., Jain, M., Sharma, M.: Production of cloned trees of *Populus deltoides* through *in vitro* regeneration of shoots from leaf, stem a root explants and their field cultivation. *Indian Jurnal of Biotechnology* 2, 203–208, 2004

Dočekal, A.: *Japonský topol v praxi, rychlerostoucí dřevina*. Praha: Komora pěstitelů biomasy, o. s., 2004

Gautheret, R.: Culture du tissue cambial. *C.R Hebd. Seanc., Acad. Sci. Paris*, 198, 2195–2196, 1934

Hejný, S. et al.: *Květena České republiky 2*. Praha: Academia, 1990. ISBN 80-200-1089-0

Hui-jun, J., Ingestad, T.: Nutrient requirements and stress response of *Populus simonii* and *Paulownia tomentosa*, *Physiologia Plantarum*, 62: 11–124, 1984

- Kang, B., Osburn, L., Kopsell, D., Tuskan, G.A., Cheng, Z.: Micropropagation of *Populus trichocarpa* Nisqually-1: the genotype deriving the Populus reference genome. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 99: 251–257, 2009
- Kawollek, W., Kawollek M.: Množení rostlin – Metody, praxe a tipy. Knižní klub, 15–35, 2010. ISBN 978-80-242-2719-1
- Kučerková, P., Macková, M., Macek, T.: Perspektivy fytořemediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chemické listy*, 93, 19–26, 1999
- Li, J., Guo, J., Xu, W., Ma, M.: Enhanced cadmium accumulation in transgenic tobacco expressing the phytochelatase synthase gene. *J. Integr. Plant Biol.* 48, 928–937, 2006
- Máchová, P., Cvrčková, H.: Micropropagation of *Betula Nana*. *Zprávy lesnického výzkumu*, 57 (3): 202–206, 2012
- Malá, J., Máchová, P., Cvrčková, H., Čížková, L.: Aspen micropropagation: use for phytoremediation of soils. *Journal of forest science*, 52 (3): 101–107, 2006
- Marcotrigiano, M., Stimart, D. P.: *In vitro* organogenesis and shoot proliferation of *Paulownia tomentosa* Steud. *Plant Science letters*, Vol. 31, 303–310, 1983
- Martin, M.T., Pedranzani, H.E., Sierra de Grado, R.: Behavior and preservation of an *in vitro* collection of European aspen in Spain. *Biocell*, 31(1): 41–49, 2007
- Meilan, R., Ma, C.: Poplar (*Populus* spp.). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 344, 143–151, 2007
- Murashige, T., Skoog, F.: A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, Vol. 15, Issue 3, 473–497, 1962
- Prknová, H.: The use of silica sand in micropropagation of woods. *Journal of forest science*, 53, (2): 88–92, 2007
- Procházka, S. et al.: *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 220–240, 1998. ISBN 80-200-0586-2
- Sinclair, W.A., Lyon, H.H, Johnson, W.T.: *Diseases of trees and shrubs*. Comstock Publishing Associates, 1987. ISBN 978-0801443718

Soudek, P., Petrová, Š., Benešová, D., Vaněk, T.: Fytoremediace a možnost zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy*, 102, 346–352, 2008

Stirk, W.A., Václavíková, K., Novák, O., Gajdošová, S., Kotland O., Motyka, V., Strnad, M., Staden, J.: Involvement of cis-Zeatin, Dihydrozeatin, and Aromatic Cytokinins in Germination and Seedling Establishment of Maize, Oats, and Lucerne. *Journal of Plant Growth Regulation* Vol. 31 (3), 392–405, 2012

Tang, Z., Chen, D., Song, Z., He, Y., Cai, D.: *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, Vol. 102, 213–220, 2010

Trigiano, R. N. and Gray, D.J. (Eds): *Plant development and Biotechnology*. CRC Press LLC., 2005. ISBN 0-8493-1614-6

Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., et al.: The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313, 2006

Úřadník, L. et al.: *Dřeviny České republiky*. Lesnická práce, s.r.o., 2009. ISBN 978-80-8715-462-5

Winton Winton, L.L.: Shoot and tree production from aspen tree cultures. *Am. J. Bot.* 57: 904–909, 1970

Internetové odkazy:

PPM protocol 2015, staženo 21.2.2015, <http://www.plantcelltechnology.com/>

9. Seznam použitých zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
4-Cl-IAA	4-chlorindolyl-3-octová kyselina
BAP	benzylaminopurin
CdPCS1	gen fytochelatin syntasy
DZ	dihydrozeatin
IAA	indolyl-3-octová kyselina
IBA	indolyl-3-másečná kyselina
iP	izopentenyladenin
NAA	naftyloctová kyselina
PPM	Plant preservative mixture
TDZ	thidiazuron
tZ	trans-zeatin
VÚLHM	Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti