



ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA LESNICKÁ A DŘEVAŘSKÁ

KATEDRA DENDROLOGIE A ŠLECHTĚNÍ LESNÍCH DŘEVIN

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Rozmnožování vybraných druhů dřevin in vitro

Ing. HANA PRKNOVÁ

Školitel: Prof. Ing. Jaroslav Koblíha, CSc.

Praha 2008

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci na téma "**Rozmnožování vybraných druhů dřevin in vitro**" napsala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce: školiteli prof. Ing. Jaroslavu Koblihovi, CSc. za vedení práce, pracovníkům laboratoře Šlechtitelské stanice Truba a Arboreta FLD v Kostelci nad Černými lesy za technickou pomoc a za laskavé poskytnutí rostlinného materiálu k experimentům, Botanické zahradě Liberec za možnost použít laboratoř, kultivační zařízení a skleníky k části experimentů a tannímu řediteli RNDr. Miloslavu Studničkovi, CSc., jenž byl konzultantem zejména k problémům ekologie a speciálních fotografických technik. Za přehlédnutí statistických postupů děkuji Ing. Jaroslavu Klápštěmu, Ph.D.

OBSAH

1. Úvod	6
1.1 Reálný a potenciální význam mikropropagace dřevin v lesnictví	6
1.2 Druhy mikropropagace	7
1.3 Zaměření práce	8
2. Přehled problematiky a literatury	9
2.1 Vybrané studie širšího významu k mikropropagaci	9
2.2 Mikropropagace listnáčů	13
2.3 Mikropropagace jehličnanů	19
2.4 Kryoprezervace kultur	26
2.5 Autekologie modelových druhů	27
2.6 Resumé	29
3. Rozdílnost dřevin v kulturách in vitro, její podstata a význam	29
4. Metodika	31
4.1 Materiál – volba modelových druhů	31
4.2 Přehled a detaily metod	32
5. Výsledky	38
5.1 Ekologická konstituce orgánové kultury <i>Sorbus domestica</i>	38
5.1.1 Vztah k aciditě	38
5.1.2 Vztah ke světlu	42
5.1.3 Reakce na nízké teploty	44
5.2 Ekologická konstituce kalusové kultury <i>Ulmus glabra</i>	47
5.2.1 Vztah k aciditě	47
5.2.2 Vztah ke světlu	48
5.2.3 Reakce na nízké teploty	50

5.3 Limity somatické embryogeneze studované u <i>Ulmus glabra</i>	
a <i>Abies</i> – hybridu	51
5.3.1 Troficky a fytohormonálně indukované stavy	51
5.3.2 Reakce kalusového pletiva na mechanickou disturbanci a desikaci	56
5.3.3 Vitalita kalusových kultur jilmu a hybridní jedle	58
5.4 Vitalita a rezistence mikrořízků <i>Sorbus domestica</i>	63
6. Diskuze	67
7. Závěry	75
Literatura	77

1. Úvod

1.1 Reálný a potenciální význam mikropropagace dřevin v lesnictví

Mikropropagace rostlin zahájena z různých inokul, jako je meristém vypreparovaný z pupene, část listu, jehlice, část prýtu, zygotické embryo aj., je historií prověřeným způsobem množení "in vitro", jímž se zabývají stovky komerčních laboratoří. Spočívá v několika principiálně rozdílných postupech, volených podle účelu kultury a druhu rostlinného materiálu. Indukce tvorby pletiva podobného kalusu, poskytujícího časem somatická embryo (tzv. somatická embryogeneze), jindy vytvoření suspenze osamostatněných rostlinných buněk ve složitých kultivačních aparaturách (Ziv 2000; Kärkönen 2001), získávání protoplastů bez buněčných stěn, vypěstování individuů z pouhých květních tyčinek, indukce narůstání shluku miniaturních prýtů aniž dochází k dediferenciaci výchozího mikrořízku jako inokula (tzv. orgánové kultury), všechny tyto způsoby mohou být zmíněny jako příklady těchto principů. Někdy se inokulum pocházející například z dormantních pupenů starého stromu díky kultivaci in vitro fyziologicky omlazuje čili rejuvenilizuje. Zdálo by se, že tedy není již problémů a stačí pouze odzkoušet zavedené metody, aby byl pro každý rostlinný materiál nalezen nejsprávnější postup mikropropagace (Chalupa 2000 etc.).

Tomuto ideálu, jenž jako by vysvítal z řady optimistických referátů, se však u dřevin pouze přibližujeme. Blíže mu je mikropropagace bylin, jež je obecně snadnější. Některé dřeviny se při mikropropagaci chovají slibně, ale přesto nepřešly z laboratoří do lesnické praxe. Problémem je totiž opakovatelnost experimentů, v nichž hrají roli těžko definovatelné faktory a zvláštnosti, jako genetická variabilita druhu, různé fyziologické stáří explantátů z rozdílných partií koruny, neznámé autonomní hladiny fytohormonů v explantátech podléhající sezónnosti, rozhodně také míra juvenililty individua poskytujícího explantáty apod. Další dřeviny lze až dosud množit, zřejmě kvůli geneticky dané celkové konstituci, s chabými výsledky. Zhruba přitom platí, že listnáče představují obvykle o něco menší problém nežli jehličnany.

1.2 Druhy mikropropagace

Pojem mikropropagace se zpravidla vztahuje na tzv. vyšší rostliny čili kormofyta, i když vlastně stejně se množí kultury rostlin stélkatých. Pomocí mikropropagace mohou být množeny rostliny nejrůznějších vývojových stupňů jako jsou kapradiny, rostliny nahosemenné (zejména jehličnany a rostliny cykasotvaré) a rostliny krytosemenné, a sice jak dvojděložné tak jednoděložné.

Nejvíce stromů důležitých v lesnictví, ať již v mírné, subtropické nebo tropické klimazoně, se množí orgánovými kulturami, kde explantát dává vzniknout přímo miniaturním stonkům s listy.* Pro orgánové kultury je (oproti tzv. somatické embryogenezi) charakteristické, že se u nich v žádné fázi postupu nevyvolává dediferenciace pletiv.

Druhým, avšak již ne tak široce použitelným druhem mikropropagace je somatická embryogeneze. Je to tvorba útvarů s vlastnostmi podobnými normálnímu (zygotickým) embryím, avšak vznikajících v kultuře in vitro embryogenního pletiva odvozeného z nepohlavních (somatických) rostlinných buněk. Embryogenní pletivo se získává v tzv. kalusových kulturách.† V nich se pod vlivem exogenních fytohormonů obsažených v živném médiu nejprve rozrůstá pletivo z nediferencovaných buněk podobných hojivému pletivu na poraněních rostlinných orgánů (původně: kalus = svalec, zával). U některých druhů dřevin spontánně nebo ovlivněno kultivačními podmínkami toto pletivo prodělává proměnu v embryogenní pletivo, jež má poněkud jiné buňky než předešlé pletivo neembryogenní. V tomto pletivu začínají vznikat zprvu nepolární, později polární somatická embrya. Mají velikost zachytitelnou na makrofotografiích. V této fázi je kritický bod somatické embryogeneze, neboť embrya často hynou, aniž se podařilo navodit jejich klíčení. Klíčení somatických embryí přitom může probíhat in vitro, anebo někdy je lze i uměle zapouzdit, například do polysacharidu alginátu získávaného z řas jako agar. Osemení a živné pletivo endosperm, jež obklopují normální embrya rostlin, jsou tak somatickým embryím nahrazeny

* V anglické literatuře je proto vedle "organ culture" ustáleno i označení "shoot culture", volně přeložitelné jako kultura výhonků.

† V anglické literatuře je kromě "callus culture" ustálen i obecnější termín "tissue culture", přeložitelný jako kultura pletiva (Kyte et Kleyn 1996).

polysacharidovou vrstvou s živinami a fytohormony, za vzniku "umělých čili syntetických semen" schopných klíčit v nesterilních podmínkách. (Saiprasad 2001).

Od popsané kultury pletiv je odvozena tzv. buněčná suspenzní kultura, probíhající v přístrojích s pohybujícím se tekutým médiem. Tento druh kultury je také v řídkých případech použitelný pro dřeviny, ale používá se ke genetickému a biochemickému bádání (Valle et al. 1997; Kärkönen 2001; Baebler et al. 2005). Nediferencované pletivo, jež nemá buňky příliš pevně spojené, může být mechanicky rozvolněno v buňky schopné samostatného růstu a dělení. Působením enzymů je také lze zbavit celulóznicích stěn a získat protoplasty, čehož se využívá zejména v genovém inženýrství. Z hlediska praktického cíle předložené práce nemají suspenzní kultury význam.

Oba principy mikropropagace, pomocí kultur orgánových a kultur nediferencovaných pletiv, sestávají ze čtyř stadií: stadium explantátu čili iniciální, stadium množování čili multiplikační, stadium organogeneze (např. kořenění u orgánových kultur, anebo vznik primordií děloh a kořene v případě somatické embryogeneze) a stadium otužování a aklimatizace k existenci mimo laboratoř. Poslední dvě stadia se u orgánových kultur při některých praktických postupech překrývají až splývají.

1.3 Cíl práce

Výsledky mají přispět ke znalostem ekologie modelových dřevin, a sice prozkoumáním jejich ekofyziologických reakcí na zcela umělé prostředí v kulturách in vitro. Speciálně jsou podrobeny zkoumání vztah k teplotám pod bodem mrazu a možnosti kryoprezervace kultur bez hlubokého zmražení, s ohledem na praktické aspekty mikropropagace. Součástí práce je modifikovat standardní kultivační metody pro daný modelový rostlinný materiál a účel tohoto výzkumu. Práce je zaměřena rovněž na posouzení rezistence produktu orgánových kultur – mikrořízků – vůči podmínkám mimo sterilní prostředí. Po zkušenosti nabyté při diplomové práci na jeřábu krkonošském (*Sorbus sudetica*) chci totiž zvláště propracovat metodiku orgánových

kultur pro sice v Čechách cizí, ale lesnicky využitelný a cenný jeřáb oskeruši (*Sorbus domestica*). Tento druh se u nás spontánně rozmnožuje minimálně.

V případech embryogeneze jsou na příkladu listnáče a jehličnanu sledovány limity této multiplikační metody. Z následujícího přehledu literatury je zřetelné, že u kultur in vitro existuje obzvláště při embryogenezi častý problém rekalcitrance. Také jím se zabývám.

Kromě uvedených cílů má být zodpovězena ještě otázka, jen zdánlivě jednoduchá, zda modelové druhy mají jen jedinou ekologii, anebo nabývají v kulturách in vitro nějakých zcela zvláštních vlastností oproti předvídatelnému přirozenému ekologickému chování. Například existují takové problémy, jak je to s projevem vloh pro bioperiodicitu nebo ekologickou amplitudu k různým ekologickým faktorům, když světelné, vlhkostní i teplotní mikroklima je umělé a ustálené a ani substrát nemá nic společného s půdním prostředím. Experimentátoři nepochybně mají četné dílčí empirické poznatky k takovým problémům, ale některé vlastnosti rostlinného materiálu in vitro berou jako logické a samozřejmé, takže je mnohdy ve svých studiích nijak zvláště nepopisují. Záměrem této dizertační práce však má být pokus o souhrn a ohraničení "ekologie in vitro" oproti ekologii druhu (čili autekologii), jak je běžně pojímána v botanické literatuře. Na příkladech chci oprávněnost naznačeného vymezení také experimentálně doložit.

2. Přehled problematiky a literatury

2.1 Vybrané studie širšího významu k mikropropagaci

Mikropropagaci v historii a její nynější pozici i perspektivy v lesnictví shrnuli sice populárně vědeckým, ale díky tomu jasným způsobem Malá a Šíma (2004). Její principy podobně vyjádřil Opatrný (2007). Mezi obecnými prameny jsou k dispozici klasické, opakovaně vydávané učebnice, kde jsou popsány laboratorní techniky, nejvíce používaná živná média, a také tam jsou rámcově zmíněny některé zde v úvodu připomenuté problémy (Dodds et Roberts 1995; Kyte et Kleyn 1996). Dále je zde plejáda studií popisujících kultivaci bylinného materiálu, mezi nimiž je další klasická

práce s autorstvím Murashige a Skoog (1962), obsahující mnohokrát osvědčenou recepturu nejpoužívanějšího živného MS-média. Bylo původně vyvinuto pro tabák. V pozdější studii (Linsmaier et Skoog 1965) bylo toto médium zjednodušeno. V této podobě, ač stále pod zkratkou MS-médium, se také zpravidla používá. Zmiňuji se o tomto detailu jen proto, že právě toto médium (1965) má význam i v mé dizertační práci. Články o laboratorním množení bylinného materiálu pro komerční účely, například jahodníku, okrasných rostlin apod., jsou shrnuty ve zmíněné dobře dostupné učebnici (Kyte et Kleyn 1996). Doplnit lze ještě některé citace svědčící o rozmnožování velmi kuriózních druhů jako je australská endemická masožravá rostlina *Cephalotus follicularis* Labill. (Adams, Koenigsberg et Langhans 1979), jihoafrická evolučně velmi izolovaná rostlina *Freatulina regia* (Stephens) Chrtek & Z. Slavíková (Janssens 1986) anebo různých evolučně archaických nahosemenných rostlin z čeledi *Zamiaceae* (Chavez et Litz 2004; Litz, Moon et Chavez Avila 2005). Byla také prozkoumána možnost mikropropagace různých atraktivních mexických endemických sukulentů, kvůli ohrožování jejich populací sběrateli. Zdařilo se to somatickou embryogenezí, přičemž bylo používáno právě MS-média (Rodríguez-Garay et Rubluo 1992; Stuppy et Nagl 1992; Rodríguez-Garay, Gutiérrez-Mora et Acosta-Deñas 1996).

Médium SH má stejně široké použití jako MS-médium (Schenk et Hildebrandt 1972). Je vhodné i k experimentům s kalusovými kulturami jedlí, jež jsou též předmětem mé dizertační práce. Je též použitelné jak pro orgánové kultury (Purohit, Singhvi et Nagori 2004), tak pro somatickou embryogenezi (Trigiano et al. 1989). Za významnou odlišnost SH-média oproti MS-médiu je nutno považovat téměř osmkrát nižší molární koncentraci amonných iontů, přičemž v nitrátové formě dusíku se tato média nijak podstatně nerůzní (obě přibližně 0,02 M KNO_3). Na příjem dusíku přednostně jako kation, nebo anion má přitom vliv permeabilita buněčných membrán, ovlivňovaná aciditou prostředí. MS-médium se velmi často používá v poloviční iontové koncentraci. I tak ovšem zůstává bohatším na amonné ionty nežli SH-médium. Další rozdíl, spočívající v navázce inositolu, pravděpodobně nehraje roli. Ať již je předepsáno 1000 mg (u SH), nebo 100 mg (u MS), jde o množství postačující a nadbytek této organické substance zřejmě nevádí.

V téměř každé receptuře živného média mají zásadní význam fytohormony, speciálně stimulatory ze skupiny auxinů nebo cytokininů, ať již přirozené nebo

syntetické, s různou stabilitou při vystavení vysokým teplotám v autoklávu. Literatury o nich je velmi mnoho a pochopitelně jim je věnována významná část relativně nové knihy "Fyziologie rostlin" (Procházka et al. 2003). Monografii o fytohormonech publikoval Moore (1989). Zhruba lze konstatovat, že na fyziologické koncentrace doporučené v recepturách na média reaguje různý rostlinný materiál nestejnou měrou. Auxiny i cytokininy mají vliv jednak na růst buněk, jednak na organogenezi. Prvé ovlivňují objemový růst buněk a podporují tvorbu kořenů a apikální dominanci prýtu. Druhé podporují buněčné dělení a podporují zakládání adventivních pupenů a množování prýtů. Indukují také dediferenciaci, za vzniku kalusového pletiva. Záleží nejen na absolutních hladinách těchto fytohormonů, ale i na jejich vzájemném poměru.

Pro kultury *in vitro* mají zvláštní význam další růstové regulátory, a sice inhibitory. Z nich velmi pravděpodobně má význam nekontrolovaně se hromadící kyselina abscisová (ABA), produkovaná u rostlin stárnoucími prýty, a také v důsledku jakéhokoli stresu. Protože je velmi dobře rozpustná ve vodě, u stárnoucích orgánových kultur se časem může stávat součástí média. Při somatické embryogenezi, ať již je endogenní nebo dodaná do média čili exogenní, ovlivňuje vypsívání a životaschopnost embryí (Label et Lelu 2000). Mezi bohatou literaturou o tomto všeobecně velmi důležitém fytohormonu podává snad nejkompletnější informaci o jeho vlastnostech Walton (1980). Stejně příčiny jako u ABA vedou též k produkci plynného inhibitoru, a sice etylénu. Aby věc nebyla jednoduchá, samotná ABA, cytokininy a auxiny interagují při biosyntéze etylénu. Mnoho podrobností o tom uvádí Harrison (1997).

Aplikacemi kultur *in vitro* resp. mikropropagace speciálně v lesnictví se zabývala série referátů z konference na toto téma v New Orleansu (Foster et Diner 1994). Zdá se, že naděje se v tyto metody již dlouho skládají jak v Čechách (Chalupa 1983, 1986, 1993; Malá et Chalupa 1986, 1987; Malá et al. 1999), tak na Slovensku (Vooková et Kormuťák 2003), ale i v lesnictví tropickém (Oluwaseun et Erhynmeyoma 2005). Zdůrazňuje se význam klonálního množení jedinců s nedostatečnou produkcí semen, případně hybridů, ale zejména vybraných geneticky kvalitních jedinců ve velkém množství (Park 2002).

Nečekanou dimenzi k využití mikropropagace přineslo nyní velmi dynamicky se rozvíjející tropické lesnictví. Je zaměřeno jednak na problémy zalesňování ("reforestation") obrovských exploatovaných a následně opuštěných ploch s

degradovanou půdou a rychle se zaplevelujících, jednak na intenzivní produkci stromů poskytujících průmyslově využívaná a vzácná tropická dřeva. Mnoho lesnický cenných tropických stromů má ovšem velká vodou bohatá semena nesnášející vysušení. Tato semena mají v přirozených podmínkách velice krátkou klíčivost počítanou na dny, někdy dokonce jen na hodiny od odpadnutí. Slouží stromům k diseminaci, nikoli k přečkávání nepříznivého ročního období, nebo dokonce k vytváření semenné banky. Tato semena, nemající schopnost dormance, nelze ani uměle na delší dobu přechovávat pomocí hlubokého zmrazení. Jejich embrya totiž nejen že nepřežijí k tomu nutnou předběžnou desikaci, ale nesnášejí ani teploty pod nulu, ba v některých případech nachladnou již při teplotách daleko nad nulou. Lze uvést jeden příklad za všechny, vzrůstné a dřevařsky ceněné stromy z čeledi dvoukřídláčovitých (Dipterocarpaceae). U řady druhů z této čeledi je klíčivost semen velmi krátkodobá, někdy dokonce tak, že není proveditelný ani transport v přírodě sebraných semen do vzdálených lesnických školek. Zde, a vždy když nelze semena uchovávat pomocí zchlazení nebo zmrazení (kryoprezervace), se nabízí jako alternativa právě mikropropagace. Sterilizaci semen, vyjmutí embrya a aseptické přenesení do připravených kultivačních baněk je možno uskutečnit i v polní laboratoři, jednoduchými prostředky. Juvenilní rostlinný materiál takto získaný je vitální a může být použit například k následné somatické embryogenezi. Mikropropagace se ovšem považuje vzhledem k nutnosti subkultur (pasážování) za alternativu s časovým omezením, ve srovnání se skutečně dlouhodobou kryoprezervací (Theilade et Petri 2003).

V lesnictví se kultury *in vitro* využívají překvapivě i k řešení některých problémů ochrany lesa před hmyzími škůdci. Přišlo se na to, že kalusové kultury je možné používat ke krmení laboratorně chovaných larev škodlivého hmyzu. Jestliže je již díky genovému inženýrství možné vnášet do genomu lesní dřeviny pěstované *in vitro* nové vlohy vedoucí k vytváření sekundárních metabolitů, někdy se jimi podaří ničit škůdce (Mott, Thomas et Namkoong 1978; Beckwith et Goldfarb 1991). Jde potom jen o to, aby se dařila produkce somatických embryí a z nich alespoň nepatrného počtu rezistentních sazenic. Ty se mohou stát matečnými stromy s žádoucí vlastností pro další množení generativním způsobem (*Pseudotsuga, Pinus*).

Analogický výzkum byl proveden pomocí kultur *in vitro* pocházejících z jilmů, jež byly infikovány spórami patogenní houby *Ophiostoma ulmi*. Jen rezistentní kultury

začaly produkovat skopoletin ze skupiny hydroxykumarinů. Tak byl v laboratorních podmínkách nalezen potenciálně zajímavý fungicid, bránící klíčení spór uvedené houby, původkyně známé grafiózy (Valle et al. 1997).

Z vybraného širšího okruhu literatury je i při vědomí v úvodu naznačených skutečností bránících spolehlivé využitelnosti mikropropagace v obecném měřítku jasné, že další experimentování má smysl. Někdy i experimenty zdánlivě končící ve slepé uličce, jako je dobrý růst kalusové kultury, leč ojedinělá produkce jedinců ze somatických embryí, mohou nečekaně nalézt využití.

2.2 Mikropropagace listnáčů

Jen některé druhy důležité v lesnictví různých kontinentů, lze podle dosavadních poznatků množit orgánovými kulturami. Explantát, a později části oddělované z kultury jako inokulum pro další kultury, dávají vzniknout svazkům miniaturních stonků s listy. Tyto prýty o délce většinou 1,5 až 2 cm, nebo jen o málo větší, představují po odříznutí tzv. mikrořízky. Zakořeňování těchto mikrořízků a jejich adaptace na podmínky ex vitro je kritickým momentem, a proto je zpravidla zvláště zkoumána metodika multiplikace (zmnožování prýtů) a metodika zakořeňování. Kultivace probíhá na světle.

Menší počet druhů se daří množit složitějším způsobem, tzv. kalusovými kulturami. Jde o proces známý jako somatická embryogeneze, kdy se nejprve docílí dediferenciace explantátu, takže narůstá v pletivo bez polarity. Může být nazelenalé, bílé i hnědavé, kultivuje se většinou v temnu, někdy i na světle (Corredoira, Vieitez et Ballester 2003). Určitými změnami média lze většinou navodit tvorbu zakulacených proembryí (globulární stadium embryí), jež se mohou dále vyvíjet v polární, přibližně torpédovité nebo srdčité útvary, a nakonec v somatická embrya se základy děloh na jednom konci a kořene na opačném konci (kotyledonární stadium embrya). Kritickým momentem je následné osamostatnění somatických embryí a jejich konverze v rostlinky. U mnoha druhů se sice daří dosti dobře počáteční fáze somatické embryogeneze, ale konverze v životaschopné rostlinky se podařilo dosáhnout jen sporadicky, anebo vůbec ne. Somatická embryogeneze je mnohem více než orgánové kultury ovlivněna individuálními genetickými rozdíly v rámci variability druhových

populací anebo rozdílností kultivarů téhož druhu. Větší, ba rozhodující měrou její úspěch závisí na stáří jedince, z něhož pochází výchozí explantát. Nejhoršími dárči jsou přitom staré stromy (např. meristém z pupenů), jen u některých druhů lze vyjít z embrya vypreparovaného ze zralého semene, nejlepším materiálem je embryo z ještě ne plně vyvinutého semene. Míra vyvinutosti resp. nevyvinutosti se ovšem velmi těžko stanovuje, což ztěžuje opakovatelnost postupů. Vhodné období odběru nezralých semen v patřičném stadiu bývá krátké, zhruba kolem 2 týdnů, a přitom těžko ohraničitelné nějakými jinými symptomy nežli experimentální kultivací. Vychází-li se ze zygotického embrya, pracuje se ovšem nikoliv s genotypem mateřského stromu, ale s heterozygotem. Zejména u šlechtěných hybridů jde proto o materiál sice třeba očekávaných, nikoli však úplně jistých kvalit. Úsilí o ovládnutí právě tohoto metodického přístupu, i s jeho zmíněnými nevýhodami, pramení podle všeho z poznatku, že by mohl být, a v několika případech skutečně je, velmi efektivní díky vzniku velkého počtu somatických embryí z každé jednotlivé kultury. Dále je zde fakt, že u kalusového pletiva se tu a tam podařilo realizovat genetickou transformaci pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nebo *A. rhizogenes* (Gutiérrez-Pesce et al. 1998; Gartland et al. 2001; Corredoira et al. 2005). Tato zvláštní metoda je zajímavým přínosem při šlechtění cenných lesních dřevin (viz kap. 2.1). Komentovaný utříděný výběr studií důležitých z hlediska vlastní dizertační práce následuje.

Druhy primárního explantátu jsou u listatých dřevin velmi rozličné. Dormantní pupeny vznikající v úžlabí listů (axilární pupeny) jsou používány často, neboť jsou odolné vůči chemikáliím používaným k povrchové sterilizaci, jsou mechanicky odolné a lze z nich po sterilizaci oloupat krycí šupiny. Výhodný je odběr ke konci dormantní periody, před vyrašením (Malá et al. 1999; Tang et al. 2002; Osterc, Luthar et Štampar 2004; Mauleová, Vítámvás et Tušek 2004; Malá et al. 2005; Matt et Jehle 2005). U rodu *Rhododendron* lze používat také pupeny květních, ale vlastním explantátem jsou tyčinky. Nové pletivo se potom tvoří z nitek, nikoli z pylových mateřských buněk v prašnicích, v nichž je před rašením již hotový pyl. I z tohoto explantátu tedy vzniká kultura z buněk somatických (Shevade et Preece 1993). Stejný experiment s *Ulmus glabra* publikovala Krajnáková (1997).

Mnohdy experimentátoři dali před odběrem pupenů přednost odběru vyrašených větviček. Někdy se odebírají na jaře přímo ze stromu (Hammatt et Grant 1997), někdy

se získávají přirychlením během zimy ve skleníku z přinesených větví, jindy jsou vhodné výmladky z kořenových řízků. Používají se buď vrcholové části, anebo tzv. nodální segmenty mající jednu až dvě uzliny (nody). Listy se odstraňují, protože neobstojí při sterilizaci. Prakticky bylinné, ještě nelignifikované stonky se stávají výhodným, již aktivně rostoucím materiálem (Chalupa 1983, 1988; Ndoye, Diallo et Gassamba/Dia 2003). Někdy je použito samých vzrostných vrcholů odebraných ve velikosti jen několika milimetrů z letorostu (Grant et Hammatt 2000; Bhagwat et Lane 2004; Lall, Mandegaran et Roberts 2006).

Listy nebo části listů mají u některých stromů schopnost regenerovat v rostlinky, ale jen zřídka se stávají primárními explantáty, protože jsou snadněji než stonky poškozovány agresivními sterilizačními činidly. Odebírají se tedy až ze sterilních prýtů vzešlých z orgánových kultur (Hammatt et Grant 1998; Tang et al. 2002; Conde, Loureiro et Santos 2004). Jen tuhé listy se silnou kutikulou sterilizovat lze a segmenty z nich mohou být primárním explantátem (Purohit, Singhvi et Nagori 2004). Význam má poranění jejich pletiv, resp. regenerační procesy v místech řezů.

Juvenilním, a proto vhodným primárním inokulem jsou i části semenáčků, jako řezy z děloh nebo hypokotyly (Han et Park, 1999; Singh et Chand 2003). Ani tyto osamostatněné části nejsou však použitelné univerzálně, mnohdy nerostou. Z dozrálého semene může být vyjmuto embryo nebo jeho část, což je též vhodný primární explantát (David et al. 1992; Vieitez, Ferro et Ballester 1993). Případná dormance je extirpcí zrušena (Arrillaga, Marzo et Segura 1992).

Speciálně pro somatickou embryogenezi (u listnáčů i jehličnanů) jsou nejčastěji používaným výchozím materiálem embrya z nezralých semen. V určitém krátkém zhruba dvoutýdenním období, které je nutno u každého druhu zjistit, jsou po extirpci vitální a brzy poskytují neuspořádané pletivo – kalus. Vzniká obvykle na straně zavěšovací (suspensoru), a proto se někdy v angličtině označuje ESM (embryonal-suspensor mass). Vynikající vlastností ESM je juvenilita, což se projeví na případech, kdy se daří generovat jak ESM, tak kalus z axilárních pupenů letitých stromů. První se po všech potřebných procedurách stává alespoň sporadicky zdrojem sazenic, druhý poskytuje jen somatická embrya charakteristická obtížnou konverzí až rekalcitrancí (Corredoira, Vieitez et Ballester 2002, 2003; Biroščíková et al. 2004). Použití ne plně vyvinutých zygotických embryí pro následnou somatickou embryogenezi se nejspíše

postupně ukáže jako univerzální, neboť rejstřík takto již odzkoušených druhů je nesmírně různorodý, od různých exotických listnáčů po stromy domácí (Garin, Grenier et Grenier-De March 1997; Han et Park 1999; Bhattacharya et al. 2002; Abdullah et al. 2005).

Vliv věku je u kultur in vitro velký, v tom panuje mezi autory shoda. Věk má ovšem dva významy. Pro životaschopnost a vývin rostlinného materiálu je důležité jednak stáří dárce primárního explantátu, jednak historie samotné kultury, jejíž celkové stáří se vyčísľuje buď v týdnech, měsících až rocích, anebo počtem po sobě následujících kultur čili subkultur. Příklady týkající se chování jilmu *Ulmus glabra*, jenž je jedním z modelů využitých ve vlastní dizertační práci, jsou obzvláště pozoruhodné. Corredoira, Vieitez a Ballester (2003) navodili somatickou embryogenezi, při níž pracovali s kulturami pocházejícími z nedospělých zygotických embryí. Přestože použili tak juvenilní materiál, v závěru své precizní studie konstatují (o. c., p. 401): "V současnosti je užití somatické embryogeneze pro masové rozmnožování nebo pro potřeby genetického inženýrství pořád limitováno nízkým počtem produkovaných rostlinek." Autoři ve své předešlé studii (Corredoira, Vieitez et Ballester 2002: 642) zmínili, že u materiálu pocházejícího z dospělého jilmu se somatická embrya nedařilo získat vůbec. Biroščíková et al. (2004) konstatovali pro materiál pocházející z dormantních pupenů odebraných ze dvou jedinců přes 70 let starých, že pokud u kalusu vůbec došlo k diferenciaci v rostlinku, vitalita byla nedostatečná a mortalita nakonec úplná. Pokud však šlo o materiál pocházející z pupenů mladých stromů do 15 let věku, dařilo se z jednoho explantátu získat až 6 životaschopných jedinců. V příkrém rozporu jsou výsledky, jež publikovali Malá et al. (2005). Autoři sice pracovali s prakticky stejným médiem jako Corredoira, Vieitez a Ballester (2002, 2003), ale po tom, co odebrali dormantní pupeny z 80 let starých jilmů a dosáhli "meristemoidů ve formě kalusů", začaly vznikat "adventivní výhony" schopné zakořenění. Jejich počet byl v průměru zhruba 6 na jednu kulturu.

Samotný kalus jilmu je zřejmě schopný růst po dlouhou dobu, neboť Corredoira, Vieitez a Ballester (2002) jej při pasážování každé 4 týdny pěstovali již přes 3 roky. K otázce, zda je kalus u jilmu či jiného listnáče schopen dalším vývinem dospívat přes somatická embrya až k rostlinkám ještě po takové době, jsem v literatuře exaktní stanovení nenalezla. Možná však právě ve změně vlastností kalusu s časem tkví určitý

problém. Zde odbočuji k literatuře o jehličnanech, neboť tam bylo prokázáno, že kalus vzniklý přímo z nedospělého zygotického embrya později, s dalšími subkulturami, ztrácí své schopnosti pro somatickou embryogenezi (Roth, Ebert et Schmidt 1997). Autoři bohužel v metodice málokdy tuto kvalitu užitého materiálu zmiňují, anebo snad pokládají za samozřejmé, že mezi primárním explantátem a experimenty jsoucími předmětem publikované práce nebylo prováděno pomnožování materiálu pomocí subkultur. Tím je otázka srovnatelnosti výsledků sumarizovaných v předešlém odstavci nejasná.

Genetická variabilita je v populační biologii, taxonomii a ve šlechtění lesních dřevin běžně uvažovaným jevem. V případě kultur *in vitro*, v nichž dřeviny rostou relativně obtížně, se ale na genetické predispozice různých klonů narazilo jako na bariéru rozhodující o úspěchu či neúspěchu kultivace. Příkladem může být třešeň ptačí (*Prunus avium*), jež je též u nás v posledních letech v ohnisku zájmu (Kobliha et Janeček 2001a, 2001b; Kobliha 2002; Podrázský, Remeš et Karnet 2002; Podrázský et al. 2002). Z anglických laboratoří vzešel pesimistický názor, že pokud se týká speciálně somatické embryogeneze, nedaří se ne snad kvůli vyspělosti explantátů, ale kvůli genetické konsituci *P. avium* (Mandegaran, Roberts et Hammatt 1999). Zhruba v téže době vsadili jiní badatelé na metodu organogeneze vycházející ze sterilizovaných vzrostných vrcholů větviček (Grant et Hammatt 2000). V subkulturách z oddělených listů umístěných na médium známé jako WPM s určitým obsahem axinu kyseliny naftalenoctové a thidiazuronu (s aktivitou podobnou jako cytokininy) vznikaly adventivní pupeny a z nich výhony. Na základě exaktní statistické anlyzy tito autoři konstatovali, že schopnost tvořit výhony se významně lišila u různých genotypů. Tomuto závěru se později dostalo potvrzení ve studii o vlivu různých médií na orgánové kultury několika šlechtěných odrůd *P. avium*, kde se mimo jiné uvádí, že genotypová variabilita je při vzniku adventivních pupenů evidentní (Matt et Jehle 2005). Pro jilm horský (*Ulmus glabra*) a jeřáb oskeruši (*Sorbus domestica*), modely zvolené také pro vlastní dizertační práci, lze v literatuře nalézt stejné závěry (Biroščíková et al. 2004; Miko, Gažo et Biroščíková 2004).

Somatická embryogeneze, anebo orgánová kultura? To je otázka stojící zpravidla na počátku každého programu využívajícího mikropropagace lesních dřevin. Zmínila jsem příklad *Prunus avium*, kde je genetická konstituce považována za

překážku somatické embryogeneze. Orgánová kultura je přitom proveditelná. Také u jilmu (*Ulmus glabra*) se různí autoři snažili o obojí typ kultur (Corredoira, Vieitez et Ballester 2002; Biroščíková et al. 2004). Je-li splněna podmínka juvenililty, tvoří se rostlinky i z axiálních pupenů a jsou považovány za výsledek přímé organogeneze. Poněvadž moje dosavadní vlastní experimenty s kulturami iniciovanými taktéž z pupenů *U. glabra* prozrazují silnou vlohu k tvorbě kalusu u tohoto druhu, hledala jsem podrobnosti speciálně k orgánovým kulturám. Ukázalo se, jak důležité je neupínat se při dokumentování jen na kvantitativní stránku experimentů, ale zaznamenat i ukazatele kvalitativní. Objektivním materiálem k tomu jsou fotografie kultur (Biroščíková et al. 2004: fig. 1b, 1c). U "orgánové" kultury je na fotografiích v citované studii vidět, že diferencované výhony vyrašily z kalusu, tedy dediferencovaného pletivu. Nelze mít tedy za prokázané, že byla uskutečněna orgánová kultura (přímý vývin výhonu z adventivního pupene založeného v diferencovaném pletivu) a kalus byl jen akcesorickým novotvarem. Stejně tak vývin prýtu mohl být nepřímý, jako výsledek přehlédnuté, ale proběhlé somatické embryogeneze. Úplně stejnou situaci dokládají také fotografie u jiného druhu jilmu, *Ulmus procera* (Gartland et al. 2001: fig. 1). Vznik jednoho nebo druhého typu kultury lze ovlivnit volbou druhu primárního explantátu (nezralé zygotické embryo nebo orgány stromu), kombinací a poměrem exogenních fytohormonů i podmínkami při kultivaci (Chalupa 2003), ale nelze úplně obejít konstituci druhu. Vyplývá to přímo nebo nepřímo z literatury citované v této kapitole. Naprosto jednoznačně obrovský význam přirozených vloh vyjádřil Opatrný (2007), když konstatoval, že mnohé rostliny dávají ve zkumavce přednost nikoli organogenezi, ale embryogenezi; neumíme vyvolat organogenezi u většiny jehličnů a naproti tomu nikdo nedokázal navodit tvorbu somatických embryí např. u tabáku nebo bramboru.

2.3 Mikropropagace jehličnanů

Z jehličnanů je z hlediska lesnického významná jen část třídy Pinopsida, neboť v našich lesích jsou jako stromy zastoupeny pouze čeledi Pinaceae a Taxaceae (Novák 1961: obr. 30). Čeleď Taxaceae je přitom reprezentována pouze tisem červeným (*Taxus*

baccata). Klasické řízkování i generativní rozmnožování jsou u tohoto druhu metody efektivní a mikropropagace pro lesnické účely není potřeba. Pořizují se většinou spíše kalusové kultury nebo z nich odvozené suspenzní buněčné kultury příbuzných exotických druhů, jejichž účelem je produkce paclitaxelu neboli taxolu, což je fytotoxin s protirakovinným účinkem (Chee 1996; Gajdošová, Múčková et Šturdík 2003; Baebler et al. 2005). Mikropropagace jehličnanů čeledi Pinaceae je obtížná, i když přesto v nejednom případě přešla z pracovišť experimentálních do laboratoří produkčních. Přehled jsem uspořádala po rodech.

Rod *Larix*.- Modřín opadavý, jeho hybridy a některé exotické druhy se množí na různých, živinami spíše chudších médiích pomocí somatické embryogeneze počínající od nezralých zygotických embryí, nebo i z pupenů dospělého jedince (Thompson et Aderkas 1992; Aderkas, Label et Lelu 2000; Bonga 2004). Pro vývin somatických embryí, aby byla schopná konverze v rostlinky, je nutné použít jako regulátor kyseliny abscisovou (Gutmann et al. 1996; Kim et al. 1998; Aderkas et al. 2002). Avšak Chalupa (1993) publikoval sdělení o orgánových kulturách, u nichž na známém WPM a ještě jednom méně známém QL médiu docházelo pod vlivem cytokininu k přímé organogenezi, přičemž jako iniciálního inokula bylo použito špiček i nodálních segmentů z prýtů mladého jedince, děloh semenáčků, pupenů a jehlic. Tak všeobecný úspěch s různými explantáty je pozoruhodný proto, že orgánové kultury u jehličnanů se pokládají za výjimečné, neboť Pinaceae mají sklon k tvorbě kalusových kultur (Opatrný 2007).

Rod *Pseudotsuga*.- Severoamerická *Pseudotsuga menziesii* byla spolu s dalšími lesnický významnými jehličnany rozmnožována orgánovými kulturami, kdežto kalusové kultury byly označeny za problémové. Výsledným produktem byly mikrořízky, které sice nechtěly kořenit in vitro, ale po předpůsobení auxinem zakořenily ex vitro (Chalupa 1986). Ve stejné době publikovali Malá a Chalupa (1986) zprávu o množení douglasky ze zygotických embryí in vitro, kdy z nich podle množství fytohormonů a koncentrace MS média vyrůstaly přímo "adventivní pupeny", anebo kalus. Ten sice stěží, ale přece jen později také produkoval dceřiné rostlinky. Pokud lze soudit z fotografie (o. c.: obr. 3, 4), kalus značných rozměrů byl přítomen. Pokud rostlinky vznikly diferenciací z nediferencovaného kalusu, šlo o somatickou embryogenezi. Pravděpodobně tytéž experimenty byly připomenuty ještě v

samostatném pojednání o douglasce (Malá et Chalupa 1987). Doplněn byl důležitý detail, že pro zakořenění mikrořízků ex vitro byl jako substrát užit agroperlit. Obvyklý postup somatické embryogeneze, s navozením fáze vyspívání pomocí kyseliny abscisové, popsali Taber, Zhang a Hu (1998). Pozoruhodným momentem je, že bylo užito výhradně tekutých médií, nezpevněných agarem nebo jiným gelem.

Rod *Picea*.- Smrk ztepilý je jehličnanem úspěšně množným pro lesnické účely, daří se jeho masové kultury pomocí somatické embryogeneze. Stejně tak je úspěšná kultura dalších druhů smrků. Literatura je proto četná, vybírám jen práce zvláště pozoruhodné. Jako první chci zmínit práci o využití somatické embryogeneze i tehdy, když u smrku nelze docílit velké produktivity. V kultuře pro somatickou embryogenezi se uchovává v laboratorních podmínkách řada klonů, které poskytují jen rostlinky v nevelkém počtu, k testování ex vitro v polních podmínkách. Díky velké rezistenci embryogenních kultur je lze dlouhodobě přechovávat i bez pasážování, a sice za extrémně nízkých teplot metodou tzv. kryoprezervace. Jakmile se některý klon v polních podmínkách osvědčí výbornými vlastnostmi, z uchovávaného embryogenního pletiva se může kdykoli aktivovat další menší produkce rostlinek. Na příkladu *Picea glauca* bylo stanovením ve velkém, provozním měřítku zjištěno, že právě takto vyprodukovaní naklonovaní jedinci jsou po dobu 5 let díky juvenilitě zdrojem výborně zakořeňujících klasických řízků. Cena sazenic s definovanými kvalitami je pouze 2x vyšší než u semenáčků (Park 2002). U *P. abies*, *P. pungens* nebo *P. rubens* se nemusí kalusové embryogenní kultury zahajovat z nezralých embryí, kde by bylo třeba hledat vhodné období odběru, ale lze použít zygotických embryí ze zralých semen (Harry et Thorpe 1991; Mo et Arnold 1991; Afele et al. 1992; Minocha et al. 1993; Ramarosandratana et Staden 2003). Podle článku o *P. omorica* se u tohoto druhu zdařilo zahájit jak somatickou embryogenezi, tak organogenezi (tvorbu adventivních pupenů, a z nich výhonků), v obou případech z výhonků. Zajímavé je, že v obou případech byl induktorem cytokininu benzylaminopurin (BAP), při organogenezi 4,5 μM (tj. 1 mg/l), při embryogenezi 5x vyšší. Kalus se ovšem tvořil až po dvojím přenosu, na médium bez fytohormonů a na médium s auxinem, kyselinou dichlorfenoxyoctovou (4,5 μM). Vyžráná somatických embryí proběhlo na médiu s 12 μM kyseliny abscisové. Po přenosu opět na médium bez fytohormonů vznikly životaschopné rostlinky s kořínky (Budimir et Vujičić 1992). Další autoři zkoumali, zda na embryogenezi *Picea mariana*

má vliv glutamin, zdroj dusíku v organické formě, uplatněný jako přídatný, anebo alternativní zdroj. Glutamin sice kladně ovlivňoval množství vznikajících somatických embryí, ale byl prakticky bez vlivu na další jejich vývin v rostlinky (Khlifi et Tremblay 1995). Na embryogenezi u sedmi porovnávaných klonů se spíše projevovaly genetické rozdíly. (Použití glutaminu má nevýhodu v jeho nestabilitě při autoklávování.) Velmi zajímavý je poznatek dalších autorů, že pro vznik somatických embryí *Picea abies* je příznivý přenos z iniciální kultury na zpevněném médiu do média tekutého. Vyspívání embryí též probíhalo v tekutém prostředí, pod vlivem přidaných 16 μM kyseliny abscisové a 7,5% polyetylglykolu. Jestliže vyspělá somatická embrya byla na 3 týdny vystavena postupnému vysychání v prostředí s relativní vzdušnou vlhkostí asi 30%, vyvíjela se morfologicky lépe nežli embrya nevysušená (Gorbatenko et Hakman 2001). Poznatek o výhodách tekutého média jen potvrzuje dřívější zjištění, jež publikovali Dunstan a Bethune (1996). Zmiňují se, že somatická embrya produkovaly i 3 roky udržované kalusové kultury, pěstované po celou dobu v tekutém médiu. Tekutá média jsou ostatně zavedena i v případě suspenzních kultur (Dyachok et al. 2000; Kärkönen 2001).

Rod *Pinus*.- Podle četné literatury se v malém měřítku zdařilo přimět k pomnožení in vitro přes 30 druhů borovic, ale problémem je zakořeňování. Neexistuje shoda v tom, jaké koncentrace exogenních auxinů fungují a zda obvyklá zpevněná média jsou pro zakořeňování nutná, anebo naopak nevhodná. Mikropropagace se nejčastěji prováděla na médiích označovaných DCR, SH a WPM (Mathur 2001: Tab. 2.2). Bylo vyzkoumáno, že pokud se jako primární explantát použije dospělé zygotické embryo, jeho oddělená děloha nebo část semenáčku vyklíčeného ve sterilních podmínkách, lze vyvolat jednorázovou organogenezi – vyrašení výhonků (Mathur 2001). Pro somatickou embryogenezi je potřeba použít nezralé zygotické embryo ve vhodném stupni vývinu, jež vytváří kalus na straně suspenzoru (Jones, Vanstaden et Bayley 1993; Arya, Kalia et Arya 2000; Percy, Klimaszewska et Cyr 2000; Klimaszewska et al. 2001). Také u borovic se projevuje celkem obecný problém, že somatická embrya v raném stadiu sice vznikají, ale dále nevyspívají. U borovice kadidlové (*Pinus taeda*), teplomilného tříjehličného druhu z atlantického pobřeží USA, se dospění somatických embryí dosahuje přidáním 40 mg kyseliny abscisové, 740 mg KCl a 75 ml polyetylglykolu do litru média (Li, Huang et Gbur 1997). U borovice

černé (*Pinus nigra*) k témuž efektu vedla pouhá aplikace vysokých koncentrací jednoho ze syntetických auxinů – kyseliny dichlorfenoxyoctové, nebo kyseliny alfa-naftalenoctové (Salajová et Salaj 2005). Vysoké dávky auxinů zpravidla mění jejich účinek v inhibici růstu, stávají se tedy v tomto smyslu vlastně obdobou obligátně používané kyseliny abscisové. Relativně nová studie o ESM (embryonal-suspensor mass) *Pinus pinaster* je důležitá popisem procesu stárnutí, patrným již u 6 měsíců pasážovaných kultur, spočívajícím jak ve zpomalení růstu, tak v poklesu tendence k diferenciaci v embrya (Breton et al. 2005). Z tohoto stavu se kultury podařilo vymanit zvýšením frekvence subkultur na týdenní interval, přičemž do média nebyly dány fytohormony a sacharóza byla nahrazena maltózou.

Rod *Abies*. - Ústup, a potom „comeback“ jedle bělokoré (*Abies alba*) do českých lesů vedl ke zvýšenému zájmu o pozůstatky lesů s její účastí a o její autekologii. Plejáda vědeckých geobotanických studií by jistě významně prodloužila tuto rešerši, kladu však důraz na otázky mikropropagace, zmiňuji tedy jen povšechné shrnutí (Skořepa 2006a, 2006b). Somatickou embryogenezi jedle bělokoré a jejích mezidruhových hybridů se podstatnou měrou zabýval tým ze Slovenské akademie věd. O tyto hybridy je zájem, neboť u šesti z nich byly v lesních školkách zjištěny větší přírůstky nežli u jedle bělokoré (Kormuťák et Vooková 2001a). Zdrojem embryonálního pletiva (ESM) je zpravidla nezralé semeno (vyjmutý megagametofyt s nezralými embryi), s menším úspěchem i embryo vyjmuté ze zralého semene (Salajová et al. 1996). Pro vytvoření embryonálního pletiva na SH médiu s 1mg/l BAP (6-benzylaminopurinu) bylo docíleno vývinu somatických embryí pomocí média s obsahem osmotika (polyetylen glykol) a inhibitoru (k. abscisová), a po tom parciální desikací. Nicméně, embrya, ač morfologicky vyvinutá, nebyla schopna klíčení v rostlinky (Vooková, Gajdošová et Matušová 1998). Překvapivé je pozdější zjištění, že do médií pro somatickou embryogenezi ve fázi vyzrávání embryí *Abies numidica* nepatří myo-inositol, obvyklá složka nejen SH média (Vooková, Kormuťák et Hrib 2001). Sdělení o skutečném získání rostlinek jedlí prostřednictvím somatické embryogeneze, a sice hybridů s jedlí bělokorou, publikovali Salajová a Salaj (2001). Vznik rostlinek byl ovšem sporadický. Přesto výzkum přinesl možná velmi důležitý fakt: Somatická embrya pocházela z oddělených děloh zygotických embryí, a dokonce semenáčků. Naproti tomu Vooková a Kormuťák (2001), kteří proces zahájili na SH médiu od nezralého zygotického

embrya, popisují úspěch u *Abies numidica*. Údajně 75% ze vzniklých embryí dospělo v rostlinky zakořeněné ex vitro. Poslední fáze in vitro přitom probíhala stejně dobře na poloviční koncentraci SH i MS média (zpevněného), výrazný kladný efekt mělo aktivní uhlí a IBA (kyselina indolylmásečná). Vooková a Kormuťák (2003), dále experimentovali s *Abies cilicica* a *A. cilicica* x *A. nordmanniana*, kde též docílili vzniku rostlinek. Iniciální fáze probíhala na modifikovaném SH médiu s hydrolyzátem kaseinu a L-glutaminem, z fytohormonů pouze BAP (cytokinin). Kromě obvyklých vlivů podporujících vyžrávání somatických embryí (polyetylglykol, k. abscisová, desikace) uplatnili 4% maltózy místo sacharózy (cf. Breton et al. 2005). Klíčení nakonec probíhalo na světle, po přenesení na pevné SH médium o poloviční koncentraci, s 1% sacharózy a přísadkou aktivního uhlí. Média vždy obsahovala i myo-inositol (!) (cf. Vooková, Kormuťák et Hrib 2001). Výborným přínosem z hlediska praktické proveditelnosti somatické embryogeneze přispěla studie o hybridních embryích *Abies alba* x *A. cephalonica* (Salaj, T. et Salaj, J. 2004). Autoři zahajovali kultury z dospělých zygotických embryí vyjmutých ze semen skladovaných 6 i 12 měsíců (4letá byla již nepoužitelná). Podstatným jevem byl způsob vzniku somatických embryí, která se netvořila z embryogenního pletiva v místě suspensoru (ESM z nedospělých embryí), ale jako protuberance na hypokotylu. Po oddělení těchto embryogenních protuberancí byly z nich napěstovány linie embryogenních kultur. Pro iniciaci kultur bylo užito SH média s obsahem BAP 1mg/l, hydrolyzátu kaseinu 1000 mg/l a glutaminu 500 mg/l. Dospívání embryí probíhalo na médiu zpravidla označovaném CDR (Gupta et Durzan 1985), obohaceném o 10 mg ABA (k. abscisové) a 7,5% PEG (polyetylglykolu) po dobu 6-8 týdnů. Embrya po tom vyklíčila v rostlinky až na témž médiu bez ABA a PEG. Byly-li rostlinky dostatečně vitální k přenosu na přirozený substrát ex vitro zmínka není. Další studie o *Abies cilicica*, *A. concolor* a *A. numidica*, které publikovali Vooková a Kormuťák (2004, 2006), již přinášejí jen sdělení o podpoře vyžrávání somatických embryí částečnou desikací a o nestejně predispozici geneticky různých klonů k somatické embryogenezi.

Nebyla to ovšem slovenská pracoviště, kde byly principiální zvláštnosti somatické embryogeneze jedlí objeveny. Například Norgaard a Krogstrup (1991) již na příkladu *Abies nordmanniana* celkem jasně popsali vše základní. Podle nich je při indukci vzniku embryogenního pletiva (ESM) z nezralých prekotyledonárních zárodků

důležitý pouze benzylaminopurin (BAP) v koncentracích kolem 5 μM . Auxiny v této fázi působí inhibičně. Stačí jakékoli jednoduché médium, nezáleží ani na koncentraci dusičnanů, ani koncentrace BAP nemusí být přesná. Následující růst embryí lze podle citovaných autorů podpořit buď L-glutaminem, anebo hydrolyzátem kaseinu, tj. organickou formou dusíku. Popsali i další dva kroky celého postupu, a sice čtyřtýdenní kultivaci na médiu s obsahem 10 μM kyseliny abscisové (ABA) pro vyžránání somatických embryí a následný přenos na médium bez jakýchkoli růstových regulátorů pro vyklíčení. Také princip podpory vývinu somatických embryí až do pokročilého torpédovitého tvaru pomocí změny cukru je znám dlouho. Například Schuller a Reuther (1993) použili pro *Abies alba*, jestliže chtěli primitivní globulární embrya podpořit k dalšímu vývinu, místo původní sacharózy laktózu. Podle dalších výzkumů lze u jedlí specificky podpořit i rozrůstání již jednou získaného embryogenního pletiva tím, že působnost 5 μM BAP (cytokininu) je na následujícím médiu doplněna 10 μM kyseliny 1-naftyloctové (auxinu), případně 0,2 μM kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (též auxinu) (Guevin, Micah et Kirby 1994; Hristoforoglu, Schnidt et Bolharnordenkampff 1995). Neméně důležitá byla otevřenost dalších autorů, když po četných experimentech s *Abies fraseri* poctivě konstatovali malou úspěšnost somatické embryogeneze, velký vliv genetické variability a nemožnost skladovat sklizené nezralé šišky (k získávání embryí) v chladu (Rajbhandari et Stomp 1997). Tato omezení, přes všechna drobná vylepšení metod, existují dodnes. Zaznamenala jsem článek, podle něhož Norgaard (1997) již před lety pomocí 3% maltózy jako jediného cukru v médiu pro dozrávání somatických embryí *Abies nordmanniana* a přidavkem polyetylglykolu přiměl embrya k dokonalému vývinu. Na základním médiu bez fytohormonů dala vzniknout rostlinkám, které byly skutečně schopny růstu ex vitro. S tímto druhem experimentovali též Guevin a Kirby (1997) a podařilo se jim zahájit somatickou embryogenezi od zygotického embrya ze zralého semene a získat nakonec somatická embrya zcela pokročilého kotyledonárního stavu. Tím byly definovány principy a popsána úskalí při somatické embryogenezi jedlí. Od té doby lze v literatuře sledovat již jen potvrzování poznaného a drobná vylepšení (Schuller, Kirchner-Neß et Reuther 2000; Find, Grace et Krogstrup 2002; Kvaalen et al. 2005; Tang et Newton 2005).

Mezi velkým počtem studií o somatické embryogenezi různých jedlí by mohla být přehlédnuta jedna starší, ale nesmírně zajímavá, o orgánových kulturách *Abies*

fraseri (Bergmann, Sun et Stomp 1997). K jejich zahájení bylo použito vrcholových pupenů odebraných z dvouletých semenáčků v dubnu, tj. právě před rašením. Dřívější, zimní odběry byly méně úspěšné až zcela neúspěšné. Pro přežití explantátu se ukázalo podstatným, jak zabránit hnědnutí poraněných pletiv. Děje se to kvůli relativně vysokému množství fenolických sloučenin, následkem působení endoenzymu polyfenolázy. Čtyři způsoby, jak se obvykle omezuje aktivita polyfenolázy, uvádějí Dodds a Roberts (1995: 130), ale podle pokusů s *A. fraseri* měl velký podpůrný vliv pro přežití explantátu způsob pátý. Jako rozhodující se ukázal dostatek zdrojů dusíku v médiu, který byl jak v anorganické oxidované formě, tak v organické redukované formě – 10 mM nitrátu a 10 mM glutaminu. Přeživší kultury produkovaly shluky až 1,6 cm dlouhých výhonů a za 100 dnů zvětšily svou váhu v průměru na 0,21 g.

Hlavní úsilí při mikropropagaci jedle se však, podle počtu publikovaných parcí, soustřeďuje na somatickou embryogenezi. Její nespolehlivost přitom vyvolává potřebu výzkumu i v oblasti biochemie a cytologie. Již se podařilo prokázat, že lze definovat kalus neembryogenní (vatovitý, z nápadně vakuolizovaných buněk) a kalus embryogenní (kompaktní, tvarohovitý), a sice nejen na základě histologické charakteristiky. Liší se i biochemickými vlastnostmi, resp. aktivitami (Hrib, Vooková et Kormuťák 1997; Kormuťák, Vooková et Salajová 1997; Kormuťák et Vooková 2001b).

Malá vitalita a morfologické abnormality klíčících somatických embryí vyvolaly otázku, zda somatická embryogeneze nemá za následek karyologické změny – velké mutace. Polyploidizace sice v malé míře nastává, ale abnormální buňky se stávají bezvýznamnými, abortují a rostlinky ze somatické embryogeneze lze považovat za geneticky stabilní (Gajdošová et Vooková 1991; Libiaková et Gajdošová 1993; Gajdošová et al. 1995; Libiaková et al. 1995). Nicméně, Roth, Ebert a Schmidt (1997) doložili, že to platí jen při relativně krátkodobé kultuře. Jestliže se používá obvyklých médií s hydrolyzátem kaseinu a L-glutaminem, po 3 letech subkultur jsou skoro všechny buňky postiženy aneuploidií (mají některé chromozomy navíc). To je provázáno neschopností kalusu tvořit vitální somatická embrya. Při kultivaci bez uvedených organických zdrojů dusíku zůstával normální diploidní počet $2n=24$. Citovaní autoři logicky doporučují, aby se při somatické embryogenezi jedle bělokoré nevyužívaly k udržování kalusových kultur stále opakované subkultury, ale kryoprezervace.

2.4 Kryoprezervace kultur

Již vžitý termín v nadpisu této kapitoly pronikl do češtiny jako anglicismus, znamenající konzervaci chladem. Původně však jde o latinismus, znamenající uchovávání za nízkých (mrazivých) teplot. V humánní i nehumánní medicíně, stejně jako při šlechtění rostlin nebo záchraně fytofenofonu, se jím většinou rozumí dlouhodobé přechovávání geneticky významného materiálu (pohlavní buňky, zárodky, dělivá pletiva, semena) za hlubokého zmrazení pomocí tekutého dusíku (Corredoira et al. 2004, San José et al. 2005 etc). V případě rostlinného materiálu je přenos do ultranízkých teplot vždy spojen s nutností jisté dehydratace pomocí určitých činidel. Některý rostlinný materiál však dehydrataci ani zmrazení nemůže přežít (viz kap. 2.1). Naproti tomu aktivně rostoucí kultury in vitro jsou často i přes normální frekvenci pasážování dosti brzy postihovány stárnutím, projevujícím se poklesem vitality (viz kap. 2.2), takže nemohou být považovány za dlouhodobě konzervovaný materiál. Kryoprezervaci a aktivní kultury in vitro proto lze spatřovat jako paralelní a vzájemně se zastupující nebo doplňující postupy, jimiž lze operovat při rozmnožování geneticky cenných rostlin (Park 2002). Pochopitelně, to platí nejen obecně, ale i u lesnicky cenných dřevin.

Kryoprezervace desikovaných semen je předmětem rutinní činnosti genetických bank. Vycházím však z úvahy, že by bylo škoda zúžit si problematiku kryoprezervace na konzervaci za extrémně nízkých teplot. Jako velmi zajímavé se zdají méně četné poznatky týkající se teplot bližších k 0 °C, působících na orgánové nebo kalusové kultury. Poměr mezi počtem běžněji dostupných studií o kryoprezervaci za extrémně nízkých teplot a za chladu či slabého zmrazení naznačuje, že každá nově poznaná podrobnost v chování rostlinného materiálu za nepřiliš nízkých teplot je žádoucí. Například pro jednoho zástupce rodu *Prunus* bylo prozkoumáno, jak se krátkodobé dvoutýdenní působení chladu 4 °C (při udržování ve tmě) projevovalo jako promotor tvorby somatických embryí a nepůsobilo na schopnost klíčení (Gutiérrez et Rugini 2004). Dalo by se však také zjistit, jak působí mnohem delší aplikace chladu na životnost embryogenního pletiva, případně přímo somatických embryí. Jiní badatelé (Vidal et al. 2005) podrobovali části z orgánové kultury *Castanea sativa* kryoprezervaci za extrémně nízkých teplot, a přitom ve své metodice popsali také velmi zajímavou fázi

přípravy kultur pomocí dvoutýdenní chladové periody při 4 °C. Zřejmě předpokládali, že existuje dosti rychlá fyziologická adaptace na chlad, která potom zvyšuje rezistenci vůči dalším činitelům a hlubokému zmrazení (užívají výrazu "cold hardened"). Rezistence ovšem je zpravidla u rostlinného materiálu spojena s regulací růstu vlivem inhibitoru. Znovu je možno položit otázku, zda právě inhibice růstu in vitro a vzrůstu rezistence by nebylo možné využít ke konzervaci chladem, jistému nenáročnému druhu kryoprezervace.

Biochemickou odpověď orgánové kultury *Populus tremula* na působení chladu 10 °C zjistil Hausman (2000), když ji porovnával s kontrolními kulturami při 23 °C. Zakonzervování chladem bylo tak dokonalé, že mikrořízky získané z kultur vystavených chladu byly ještě po roce zcela vitální. V obecném smyslu připomněli možnosti chladové konzervace kalusových kultur lesních dřevin v bezmrazých podmínkách (0-10 °C) již před tím Vicient a Martínez (1998). Zmínili i to, že tato metoda dlouhodobé konzervace může fungovat i v případech, kdy u určitých druhů nelze použít standardní kryoprezervaci semen v tekutém dusíku (viz kap. 2.1).

2.5 Autekologie modelových druhů

Jako model pro iniciaci kalusové kultury jsem použila umělého hybridu *Abies cilicica* x *A. cephalonica*, jenž byl doporučen školitelem. Jakkoli se může zdát, že hybrid exotických druhů nemá v lesnické produkci do budoucna význam, opak je pravdou. Je-li do lesnické praxe započítáván i ekonomický přínos z produkce vánočních stromků, potom využití hybridu druhů považovaných dle citované literatury za krásné, brání jen problém snadného množení v jednotné kvalitě. Studium možností kultur in vitro má proto logické opodstatnění. Oba exotické druhy *A. cephalonica* Loud. (jedle řecká) a *A. cilicica* (Ant. et Kotschy) Carr. (jedle cilicijská) pocházejí z velmi teplých území položených jižněji nežli areál *A. alba* (Krüssmann 1983: 24). Obě rostou vysoko, 800-1700 m n. m. a 1300-2000 m n. m., avšak přesto jsou vůči pozdním mrazům citlivější než *A. alba*. Jedle řecká je odolnější než jedle cilicijská, jež však je zase pokládána za rychle rostoucí druh. U hybridu dochází ke zdařilé kombinaci vloh, avšak

jeho hodnocení mi nepřísluší a je v současnosti předmětem exaktního studia v rámci jiného projektu.

Jilm horský (*Ulmus glabra* Hudson) je evropským endemitem. Jeho autekologie je shrnuta například v Květeně 1 (Hejný et Slavík 1988)[‡], podrobně popsána Svobodou (Svoboda 1953). Tento strom vyniká širokou ekologickou amplitudou vůči světlu, teplotám, půdní vlhkosti i chemismu půd. Z hlediska kultur in vitro je důležité vědět, že do jeho ekologické konstituce patří i silná regenerační schopnost, spočívající nejen v pařezové výmladnosti, ale i ve tvorbě kořenových výmladků. Je rychle rostoucí. Jeho druhová populace, jak je notoricky známo, prošla v recentu přirozeným výběrem podle odolnosti vůči grafióze.

Jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.) je v aktuální Květeně 3 (Hejný et Slavík 1992) považován za strom z teplých částí Evropy, severní Afriky, Turecka a Iránu. Jižní Slovensko je považováno za místo nejsevernějšího přirozeného výskytu. Jako ovocná dřevina však byl šířen již ve starověku (Větvicka 1999). V Čechách rozhodně není dřevinou původní. Výskyt starých jedinců je znám prakticky jen z Českého středohoří (Kubát 2007) a přilehlého dolního Poohří (u Libochovic, z autopsie). Výskyty na jižní Moravě jsou předmětem dosavadního studia výzkumné stanice Uherské Hradiště VÚLHM (Ing. Z. Prudič, CSc. a kol.). Panuje shoda v tom, že jeřáb oskeruše se v ČR velmi málo rozmnožuje generativně. Je schopný tvořit kořenové výmladky, ale na tuto strategii běžně nepřechází. Jestliže došlo k teplejší výchylce klimatu, stává se jeřáb oskeruše zajímavým i pro naše lesnictví. Kdyby se podařilo odstranit slabý článek v jeho autekologii, chabou schopnost spontánního rozmnožování i množení klasickými způsoby, bylo by to přínosem. Tím se otvírá možnost využívat kultury in vitro, na něž se ve své dizertační práci rovněž orientuji.

2.6 Resumé

Literatura o mikropropagaci je četná a jeví se jako popis velmi členité, až nepřehledné problematiky. Některá udávaná experimentální data jsou přesvědčivá, ale i

[‡] Odtud jsem převzala příslušné české jméno. V jiných pramenech se uvádí i "jilm drsný".

když svědčí o zdaru mikropropagace v malých laboratorních sériích, je jen málo sdělení o jejich pozdějším využití v lesnické praxi a velkém měřítku. V tom se liší mikropropagace dřevin od množení bylin, protože u těch má mikropropagace komerční význam pro velmi mnoho okrasných i užitkových druhů.

Souhrn uvedené literatury o experimentech s dřevinami naznačuje, že z mnoha receptur na živná média lze některé označit jako nejčastěji používané. Jsou to především média všeobecně známá pod zkratkami MS a SH. Tato média jsou modifikována různými organickými přísadami a změnou celkové koncentrace tak, aby zkoumaný materiál na nich co nejlépe rostl. Pro zvláště choulostivé lesní dřeviny bývá pravidlem ředění těchto médií oproti původní receptuře.

Z důležitých problémů vytčených v uvedené literatuře vysvítá role genetické variability, přirozené konstituce a momentální kondice (např. fyziologické stáří donora explantátu). Celý postup mikropropagace se dále potýká s fenomény známými jako rejuvenilizace, senescence, a rekalcitrance.

Velmi lapidárně lze uvést tři obecná, a také nejvíce řešená a diskutovaná úskalí:

1. U určitého druhu dřeviny není předem jasné, do jaké míry je u ní možná orgánová kultura, anebo somatická embryogeneze.
2. Podaří-li se multiplikace v orgánové kultuře, jak docílit zakořenění do přirozené půdy.
3. Podaří-li se navodit vznik somatických embryí, jak navodit jejich další vývin, překonat nízkou vitalitu a snížit vysokou mortalitu.

3. Rozdílnost dřevin v kulturách in vitro, její podstata a význam

S odkazem na přehled literatury lze poukázat na malou prediktibilitu vlastností různých druhů dřevin pokud jde o vhodný typ explantátu a jeho chování v iniciálním stádiu kultur. Například vypreparované zygotické embryo může u jednoho druhu poskytnout dediferencované pletivo bující ze suspenzoru (ESM), u jiného žádné takové pletivo nevzniká a jen se zruší dormance a probíhá víceméně normální klíčení. V prvním případě je možno uskutečnit somatickou embryogenezi, kdežto v druhém lze založit orgánovou kulturu. Z literatury lze málokdy vyčíst, zda autor provedl experimenty buď

jen s embryogenezí, anebo jen s orgánovou kulturou právě proto, že funguje jen jedna z těchto alternativ. Práce porovnávající tyto různé cesty mikropropagace u téhož druhu podle efektivity resp. koeficientu množivosti mi nejsou známy. Z toho lze usoudit, že rozdílně řízenými podmínkami a manipulacemi lze sotva indukovat jeden i druhý způsob rozmnožování in vitro. Pokud ano, pak jeden z těchto způsobů má jen sporadické úspěchy. Z toho plyne významné konstatování, že iniciální stadium mikropropagace vychází zpravidla z empirie.

V přirozených poměrech jsou reakce na poranění a regenerační schopnost, případně i schopnost vegetativního rozrůstání pomocí kořenových výmladků, závislé na geneticky podmíněné konstituci druhu. Tato charakteristická a známá konstituce je zakódována i v buňkách explantátů, avšak realizace těchto vloh v podmínkách in vitro je málo předvídatelná. Některé primární explantáty, jako jsou nodální segmenty, pupeny nebo meristém, mohou velmi negativně reagovat již na poškození buněk na řezných plochách a projevit vysokou mortalitu, kdežto během multiplikačního stadia řezání těmž druhu již nevádí. Tento projev jakéhosi "ochočení" je vysvětlován jako rejuvenilizace čili omlazení. Rozdíly mezi druhy jsou však také ve stárnutí kultur, byť často pasážovaných. Po několika týdnech (často u kalusových kultur), častěji však měsících, někdy až rocích (u orgánových kultur) rostlinný materiál podle druhu ztrácí svou počáteční vitalitu a schopnost multiplikace. Ani dlouhověkost druhu v přirozených podmínkách neznamena, že je relativně dlouhověký i v kulturách in vitro.

Strategii výzkumu ve světle těchto skutečností nelze cílit na zdokonalení metod tak, aby byly co nejuniverzálnější, použitelné pro nejrůznější druhy. Východiskem k úspěchu může být spíše co nejširší poznávání specifického chování každého druhu dřeviny v nepřirozených podmínkách in vitro a podřizování laboratorních technik jeho predispozicím. V tomto poznávání mají význam i zprávy o experimentech s omezeným úspěchem a popisy negativních reakcí kultur na různé vlivy.

4. Metodika

4.1 Materiál – volba modelových druhů

V práci jsou použity druhy jilm horský (*Ulmus glabra* Hudson), jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.) a hybridní jedle *Abies cilicica* (Ant. et Kotschy) Carr. x *A. cephalonica* Loud. Byly zvoleny s předpokladem, že umožní-li alespoň u některého z nich nové poznatky z laboratorních experimentů také jejich převod do podmínek provozních, mohla by práce mít jasný význam. V případě jilmu horského, jenž je vůči grafióze nejodolnějším naším druhem, by mikropropagace umožnila klonování vybraných geneticky hodnotných jedinců. V případě jeřábu oskeruše by šlo o překlenutí chabé schopnosti rozmnožovat se v podmínkách našeho území. Je to druh atraktivní pro kvalitní tvrdé dřevo, krásný vzhled, vhodný pro xerothermní podmínky, ale se širokou ekologickou amplitudou. Je-li to pro Čechy exotický druh, je výbornou vlastností, že se spontánně nerozmnožuje v přírodních podmínkách. Při jeho uplatnění v lesnictví by nehrozila expanze a případné výhrady z hlediska ochrany přírody a krajiny nelze vznášet. Jeřáb oskeruše, čekající na docenění, není ovšem v českém lesnictví druhem nevyzkoušeným, což ilustruji fotografickým dokumentem odhadem 120 let starého zcela vitálního stromu, pořízeným v dubo-habrovém lese Šebín u Libochovic v severních Čechách (foto 1 a 2). Využití případně úspěšné metody mikropropagace hybridní jedle by bylo zajímavé z důvodu uvedeného v kap. 2.5.

Primárním explantátem jilmu byly pupeny z asi 20 let starého plodného spontánně uchyceného jedince v lesoparku "Lidové sady" v Liberci. Jejich odběr právě před rašením 30. března 2006 byl původně proveden se záměrem zahájit orgánovou kulturu. Z důvodů shrnutých v kap. 3 se však staly zdrojem kalusového pletiva, použitého k několika experimentům a pozorováním.

Primárním explantátem jeřábu oskeruše bylo zygotické embryo vyjmuté ze zralého semene. Malvice byly sbírány 26.10.2006 v Arboretu FLD v Kostelci nad Černými lesy a laboratorně zpracovány 1. 11. 2006. Z vyvíjejícího se embrya byl použit epikotyl, z něžž byly odvozeny orgánové kultury.

Primárním explantátem hybridní jedle bylo zygotické embryo z nezralého semene. Zelená šiška byla odebrána v "semenném sadu č. 1" (Kobliha 2000) ve Šlechtitelské

stanici Truba v Kostelci nad Černými lesy dne 26.7.2006, semena byla vyjmuta z dolní části a ihned zpracována. Tato semena byla generací F2



Foto 1 a 2.- Starý jeřáb oskeruše v lese u Libochovic svědčí o historickém použití tohoto druhu v lesnictví.

4.2 Přehled a detaily metod

Semena jeřábu a jedle byla mechanicky očištěna, potom 10 minut omývána tekoucí vodou, dále na 3 minuty umístěna do čistého lihu pro lékárnické účely, a nakonec sterilizována po dobu 30 minut v nasyceném roztoku chloraminu. Jednoleté větvičky jilmu byly omývány v roztoku saponátu, a potom sterilizovány 30 minut nasyceným roztokem chloraminu. Vypreparování embryí ze semen a oddělení pupenů jsem provedla ve sterilním prostředí v boxu s laminárním prouděním filtrovaného

vzduchu. Pupeny byly nakonec před umístěním do skleniček zbaveny i povrchových šupin. Načasování odběrů viz předešlá kapitola.

Pro iniciální i následné multiplikační kultury jilmu horského a jeřábu oskeruše bylo použito modifikované médium ½ MS (revidovaná verze podle Linsmamaier et Skoog 1965) v tomto složení: poloviční obsah minerálních solí, tj.

dihydrofosforečnan draselný	85 mg/l
dusičnan amonný	825 mg/l
dusičnan draselný.....	950 mg/l
chelaton 2	18,6 mg/l
chlorid kobaltnatý krystalický.....	0,01 mg/l
chlorid vápenatý sušený (dihydrát)	220 mg/l
jodid draselný.....	0,4 mg/l
kyselina boritá.....	3,1 mg/l
molybdenan sodný krystalický.....	0,1 mg/l
síran hořečnatý krystalický.....	185 mg/l
síran manganatý krystalický	11,2 mg/l
síran měďnatý krystalický.....	0,01mg/l
síran zinečnatý krystalický	4,3 mg/l
síran železnatý krystalický	13,9 mg/l

organické substance:

BAP (6-benzylaminopurin).....	1 mg/l
hydrolyzát kaseinu	1 g/l
myo-inositol.....	100 mg/l
sacharóza	20 g/l
thiamin	0,4 mg/l

Hotový roztok byl zpravidla nastaven přibližně na pH 5,7 dle originální receptury, anebo na jinou aciditu ke stanovením uvedeným v kap. 5.1.1 a 5.2.1 (tab. 2 a 3). V podrobnostech laboratorní přípravy, jako je způsob přípravy zásobních roztoků a směšování chemikálií, rozpouštění fytohormonů a thiaminu aj. odkazují na příručku

"Plants from test tubes" (Kyte et Kleyn 1992). Jen pro počáteční fázi výzkumu (kap. 5.1.1) bylo médium použito standardním způsobem, zpevněné 6 g agaru na litr. Tento způsob byl nadále opuštěn a agar byl nahrazen pískovým nosičem. Tekutá media byla při tom používána tak, že v lahvičce o objemu 200 cm³ a průměru 6 cm bylo 25 cm³ sklářského písku[§] a 20 ml roztoku.

Modifikace s maltózou obsahovala 40 g tohoto cukru místo sacharózy a neobsahovala fytohormony. Modifikace s kyselinou indolyl-máselnou (IBA) obsahovala v litru 1 mg tohoto fytohormonu, kdežto cytokinin (BAP) nebyl obsažen (ad kap. 5.3.1).

Pro iniciální kulturu hybridní jedle jsem použila médium SH (Schenk et Hildebrandt 1972, sec. Kyte et Kleyn 1992) v tomto složení:

dihydrofosforečnan amonný	300 mg/l
dusičnan draselný	2,5 g/l
chelaton 2	20 mg/l
chlorid kobaltnatý.....	0,1 mg/l
chlorid vápenatý sušený (dihydrát)	200 mg/l
jodid draselný.....	1 mg/l
kyselina boritá	5 mg/l
molybdenan sodný krystalický.....	0,1 mg/l
síran hořečnatý krystalický	400 mg/l
síran manganatý krystalický.....	10 mg/l
síran měďnatý krystalický.....	0,2 mg/l
síran zinečnatý krystalický	1 mg/l
síran železnatý krystalický	15 mg/l

organické substance:

BAP (6-benzylaminopurin).....	1 mg/l
glutamin	200 mg/l

[§] Technické údaje dle producenta (<http://www.pisky.cz>) jsou: bílý křemenný písek, těžený a tříděný pro sklářské účely v pískovně Provodín na Českolipsku; značka písku PR 21, zrnitost 0,1 až 1 mm, praný, tříděný.

hydrolyzát kaseinu	5g/l
kyselina nikotinová	0,5 mg/l
myo-inositol	1g/l
pyridoxin-hydrochlorid.....	0,5 mg/l
sacharóza.....	30 g/l
thiamin	5 mg/l

Acidita byla nastavena na pH 5,7 a roztok byl zpevněn 6 g agaru. Pro následné subkultury byl používán tekutý roztok stejného složení s pískovým nosičem, jako v předešlém případě. Modifikace s maltózou obsahovala 30 g tohoto cukru místo sacharózy a neobsahovala fytohormony. Modifikace s kyselinou indolyl-máselnou (IBA) obsahovala v litru 1 mg tohoto fytohormonu, kdežto cytokinin (BAP) nebyl obsažen (ad kap. 5.3.1).

Sterilizace inkubačních skleniček probíhala ve všech případech běžným způsobem v autoklávu. Trvala 30 min za zvýšeného tlaku při 115 °C. Pro kultury se osvědčily skleničky o objemu 200 ml rozšířené v potravinářství (např. na dětskou výživu), k nimž lze samostatně dokupovat kovová víčka s těsněním. (Skleničky mají při opakované sterilizaci delší životnost nežli víčka.)

Inkubace probíhala za pokojových teplot při přirozeném rozptýleném světle, avšak s celoročně nastaveným přisvětlováním na režim 16 hodin světla a 8 hodin temna. Některé experimenty probíhaly v temnu, další kultury byly vystavovány chladu kolem 4 °C, anebo mrazu -10 až -15 °C. K tomu byla používána běžná chladnička.

Z orgánových kultur jeřábu oskeruše byly odebírány mikrořízky o délce 2 až 3 cm a používány buď k pasážování do dalších subkultur, anebo k dalšímu zpracování zahradnickými metodami. Mikrořízky byly vyjmuty z lahviček a omyty vodou. Byly zakořeňovány v nesterilních podmínkách za použití komerčně dodávaného práškovitého stimulatoru AS-1 (výrobce: firma Hü-Ben Čerčany, ČR), jehož aktivní složkou je stabilní syntetický auxin kyselina α -naftyl-octová a jako synergicky působící látka je přidávána kyselina nikotinová (foto 3). Substrát k řízkování byl složen z přeseť rašeliny a expandovaného vermikulitu 3:1. Nebyl žádným způsobem sterilizován. Zpočátku řízky potřebují vzduch nasycený vlhkostí, a proto se substrát plní ve vrstvě 3 cm do uzavíratelných průsvitných nádob o rozměrech 18 x 18 x 6 cm (foto 4). Fungicidy byly

uplatněny způsobem běžným v zahradnické praxi, tj. po nařízkování byla provedena zálivka přípravkem Previcur 607 SL v koncentraci 0,1% a po týdnu byl ještě aplikován Topsin M 70 WP v koncentraci 0,1% jako postřik na listy (Přehled 2008). Od třetího týdne probíhalo pozvolné otužování vůči nižší vzdušné vlhkosti pootvíráním nádoby.

Po zakořenění a otužení rostlinek vůči nižší vzdušné vlhkosti jsem je přesazovala do květníků, do substrátu složeného z 1,25 l jemně přeseť kompostní zeminy + 0,25 l bílého písku zrnitosti cca 1 mm a 0,1 l moučky z dolomitického vápence pro zahradnické účely. Pro zakořeňování, pokud se provádí ve skleníku při přirozené délce dne, je vhodné období od února do srpna. V této době je vhodný běžný tzv. poloteplý skleník.

Sazenice v květnících se dále pěstují běžnými zahradnickými a školkařskými metodami, avšak přes první zimu, než zdřevnatí, musí být umístěny ve studeném skleníku s nastaveným minimem 4 °C.

Pro výpočty intervalu spolehlivosti a pro statistické testování byly použity funkce v programu Microsoft Office Excell 2003. V podrobnostech odkazují na použitou literaturu (Cyhelský 1967; Kubíková 1971, Meloun et Militký 2004).



Foto 3.- Ošetření mikrořízků stimulantem pro zakořeňování. Skutečná velikost mikrořízků 2-3 cm.



Foto 4.- Organové kultury – zdroj mikrořízků, potřebné nástroje a doporučená nádoba se substrátem pro řízkování.

5. Výsledky

5.1 Ekologická konstituce orgánové kultury *Sorbus domestica*

5.1.1 Vztah k aciditě

Podmínkou průkaznosti stanovení, jak orgánové kultury započaté z mikrořízku rostou na více či méně kyselém médiu, je ideální kontakt s médiem bez případných rušivých vlivů agaru. Prozkoumala jsem proto nejdříve, zda podle zkušenosti s jiným druhem jeřábu se i pro zde užitý modelový druh *Sorbus domestica* může používat tekuté médium s pískovým nosičem (Prknová 2007).

Porovnání produkce kultur na agaru a písku při použití téhož ½ MS – média v modifikaci uvedené v kap. 4.2 je provedeno na základě tabulky 1. Každý druh média byl použit pro 100 kultur.

Tab. 1.- Frekvenční tabulka charakterizující produkci mikrořízků *Sorbus domestica* na agarovém médiu a na tekutém médiu s pískovým nosičem po 9 týdnů trvající kultivaci.

Počet mikrořízků v lahvičce	agar (počet lahviček)	písek (počet lahviček)
1	16	12
2	11	8
3	12	13
4	13	16
5	14	11
6	15	10
7	10	9
8	5	10
9	4	6
10	0	3
11	0	2

Stanovila jsem nulovou hypotézu, že jde o výběrové soubory se stejným průměrem. Uvádím dvouvýběrový t-test této hypotézy, provedený pro údaje z tab. 1:

	agar	písek
Výběrový průměr	4,32	4,95
Rozptyl	5,391515	7,179293
Pozorování	100	100
t stat.	-1,77688	
t krit.	1,972017	

Protože absolutní hodnota vypočteného testovacího kritéria (t stat.) nepřesahuje kritickou hodnotu (t krit.), platí s pravděpodobností 95% nulová hypotéza. Produktivita kultur vyjádřená počtem získaných mikrořízků se tudíž u agarového a tekutého média s pískovým nosičem významně neliší. Tekuté médium s pískovým nosičem proto mohlo být použito pro navazující experiment, a to tím spíše, že podle kvalitativního kritéria se jeví jako lepší než agarové. Po 9 týdnech byl pozorován rozdíl spočívající v nápadných příznacích senescence čili stárnutí, které se ovšem projevovaly výhradně a u všech kultur na agarovém médiu (foto 5 a 6).

Prokázání velmi dobrého růstu jeřábu při použití pískového nosiče, jenž je chemicky inertní a stálý při každém pH, umožnilo přípravu sérií s odlišně a přesně nastavenou aciditou. Další experiment jsem připravila tak, abych zjistila, zda standardně používané pH 5,7 pro MS-médium je nejlepší. Porovnála jsem série kultur na kyseljším médiu (pH 4,5) a na slabě alkalickém, skoro neutrálním médiu (pH 7,2). Výsledné hodnoty jsou v tab. 2.

Tab. 2.- Frekvenční tabulka udávající produkci mikrořízků po 6 týdňů trvající kultivaci na médiích s rozdílnou aciditou.

Počet mikrořízků v lahvičce	pH 4,5 (počet lahviček)	pH 5,7 (počet lahviček)	pH 7,2 (počet lahviček)
0	0	1	0
1	14	2	3
2	10	4	2
3	3	2	3
4	3	3	7
5	0	6	8
6	0	4	1
7	0	5	2
8	0	2	3
9	0	0	1
10	0	1	0



Foto 5.- Vlevo typický stav kultur na tekutém médiu s pískovým nosičem. Vpravo, na médiu zpevněném agarem, jsou patrné příznaky senescence - útlum růstu a žloutnutí.



Foto 6.- Vybrané kultury se zvláště nápadnými příznaky senescence po kultivaci na agarovém médiu. Žádná z kultur s pískovým nosičem přitom takové příznaky neměla.

Stanovila jsem nulovou hypotézu, že průměrná produkce na kyseljším médiu se významně neliší od produkce na standardním médiu, a tu jsem otestovala t-testem:

	pH 4,5	pH 5,7
Výběrový průměr	1,833333	4,766667
Rozptyl	0,971264	5,84023
Pozorování	30	30
t stat.	-6,15603	
t krit.	2,001717	

Protože absolutní hodnota vypočteného testovacího kritéria (t stat.) přesahuje kritickou hodnotu (t krit.), zamítám nulovou hypotézu. Konstatuji, že produkce mikrořízků na kyseljším médiu byla významně nižší.

Stejným způsobem jsem otestovala nulovou hypotézu, že průměrná produkce na zásaditějším médiu se významně neliší od produkce na standardním médiu:

	pH 7,2	pH 5,7
Výběrový průměr	4,566667	4,766667
Rozptyl	4,529885	5,84023
Pozorování	30	30
t stat.	-0,34017	
t krit.	2,002465	

Protože absolutní hodnota vypočteného testovacího kritéria (t stat.) nepřesahuje kritickou hodnotu (t krit.), přijala jsem nulovou hypotézu. Konstatuji, že produkce mikrořízků na zásaditějším médiu se významně (na hladině pravděpodobnosti 95%) neliší od produkce na standardním médiu.

Lze mít za dostatečně prokázané, že inokulum jeřábu oskeruše, jež je bezkořenné a přijímá roztok svým povrchem, není vysloveně acidofilní. Má dosti širokou ekologickou amplitudu ve vztahu k pH živného roztoku, od slabě kyselého po slabě alkalický. Pro převedení laboratorních poznatků do praxe má tato tolerance význam, neboť poměrně obtížné nastavování přesného pH při mikropropagaci tohoto druhu orgánovou kulturou není nutné. Stačí překontrolovat, zda je připravené živné médium v intervalu od pH 5,7 až po reakci přibližně neutrální, aby kultury rostly výborně.

Tento výborný růst lze charakterizovat číselně, neboť sloučením sloupců pro pH 5,7 a 7,2 vzniká velký, tudíž dosti reprezentativní soubor 60 kultur. Z něho lze vypočítat průměrnou produkci mikrořízků na jednu šestitýdenní subkulturu. Výběrový průměr je $x = 4,66$. Interval spolehlivosti při hladině pravděpodobnosti 95% je $5,23 \geq x \geq 4,09$. Zjednodušeně vyjádřeno, při správné kultuře in vitro lze spolehlivě počítat se získáváním asi 4 až 5 mikrořízků z jednoho výchozího mikrořízku během každých 6 týdnů. Teoreticky, kdyby produkce nebyla omezoována kapacitními možnostmi laboratoře, lze z jediného mikrořízku získat za rok (tj. během 8,69 šestitýdenních subkultur) nejméně $4,09^{8,69} = 206\,955$ mikrořízků. Mohu tedy konstatovat, že multiplikační orgánové kultury jeřábu oskeruše dle uvedené metody (kap. 4.2) nejsou limitující při praktickém využití mikropropagace.

5.1.2 Vztah ke světlu

Obecně kultury in vitro nejsou závislé na světle jako zdroji energie, neboť jejím zdrojem je cukr v médiu. Z účinků světla tedy zůstává vliv na morfologii a bioperiodicitu. V přirozených podmínkách je v tomto směru známo a ve fyziologických učebnicích popsáno vše, ale předurčit chování jeřábu oskeruše v kulturách in vitro podle toho nelze.

Z dobře rostoucích čtyřtýdenních kultur byla vytvořena kontrolní skupina 50 lahvíček, jež byly inkubovány nadále normálně, na světle. Stejná skupina zkusná byla na rozdíl od kontroly nadále inkubována v temnu. Reakce, vyhodnocená po 8 týdnech, byla rázu kvalitativního: Ve všech případech zkusné skupiny nastala nápadná senescence – stonky zůstaly živé, ale olistění odumřelo. Kultury tedy nerostly, ač měly zdroj energie (cukr) v médiu, neboť nedošlo k etiolizaci, jak by se dalo očekávat. Popsanou reakci na stres z nedostatku světla přisuzuji hypoteticky kyselině abscisové, kterou rostliny vylučují jako stresor. Tato substance je inhibitorem růstu a vyvolává právě odlučování listů.

Kontrolní série v téže době byla živě olistěná a jevila jen nepatrné známky senescence, odpovídající uvedenému celkovému trvání kultivace v týchž lahvíčkách (foto 7).

Jeřáb oskeruše má známou fenologii. Přirozené roční biorytmy, ať již jsou řízeny fotoperiodicky nebo termoperiodicky, mívají dokonce určitou setrvačnost, fungují dosti dlouho i bez určujících vnějších podnětů. Orgánové kultury in vitro jsou ovšem pod stálým vlivem exogenního stimulantu růstu a rostou celoročně. Navíc jsou inkubovány pod umělým osvětlením, zpravidla se stálým cirkadiánním rytmem 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Zjistila jsem pozorováním velké série 100 kultur, že i při přirozeném osvětlení ve 100% případech vegetují a normálně rostou i přes zimu. Exogenní inhibitor a nejspíše i dostatek zdrojů dusíku v médiu tedy stačí na to, aby orgánové kultury nebyly fotoperiodické (foto 8).

Shrnuji tedy, že orgánové kultury sice nezbytně potřebují světlo, ale nejsou fotoperiodické. Toto konstatování je důležité v kontextu a kap. 5.4 a 6.

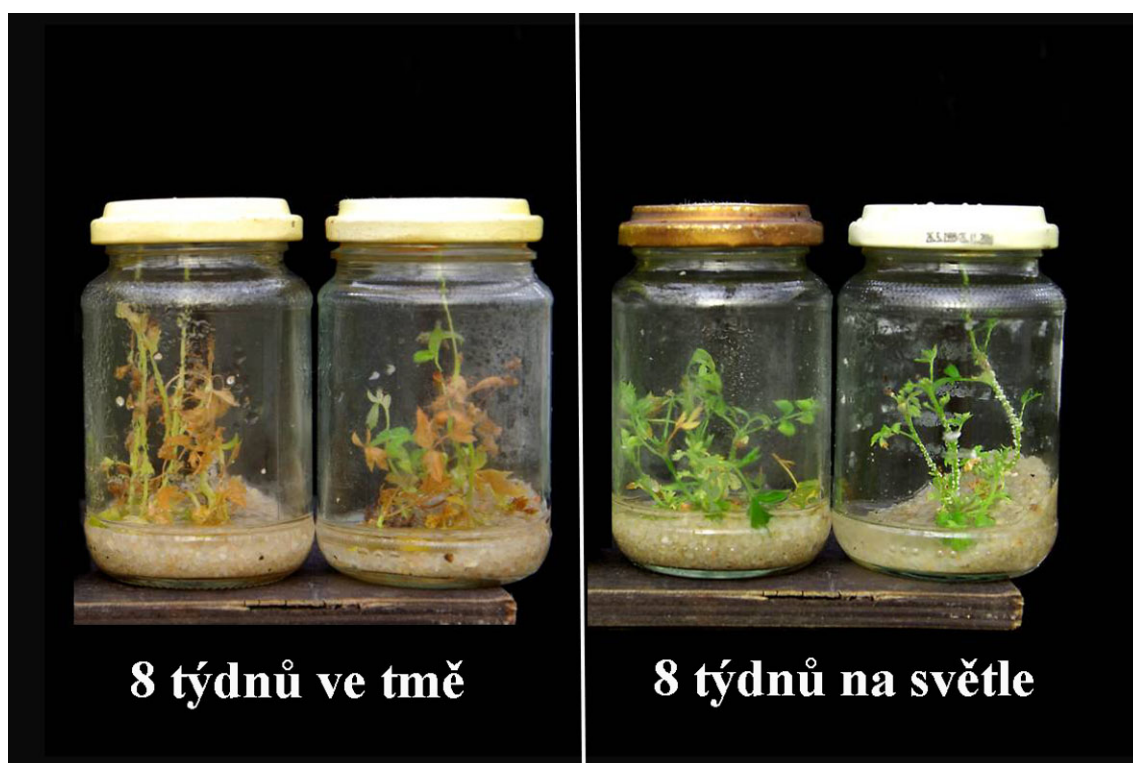


Foto 7.- Typické případy zkusných kultur *Sorbus domestica* inkubovaných 8 týdnů v temnu a kontrolních kultur inkubovaných v téže době na světle.



Foto 8.- Příklady kultur *Sorbus domestica* udržovaných již od léta na přirozeném světle, dokumentované dne 11. prosince 2006.

5.1.3 Reakce na nízké teploty

Nízkými jsou míněny teploty bránící růstu a pro účely této práce jsou zkoumány dva jejich intervaly: chlad 1 až 4 °C a mráz -12 až -15 °C. V přirozených podmínkách je chlad faktorem přispívajícím k přechodu jeřábu do dormantního stavu a tento stav je potom spojen s rezistencí vůči mrazům. Abnormální vlastnosti orgánových kultur byly experimentálně demonstrovány již ve vztahu ke světlu, a proto dalším logickým postupem je prozkoumání fenoménů způsobených chladem a mrazem.

Série 100 lahviček s dobře rostoucími kulturami jeřábu oskeruše byla z inkubačního prostoru přemístěna do bezmrazého prostředí chladničky, kde byla tma. V tomto prostředí byly kultury ponechány celých 5 měsíců. Bylo zjištěno, že všechny kultury bez rozdílu jsou i přes absenci světla zelené, olistěné (foto 9). Jejich růst byl úplně zastaven, čímž vysvětlují markantní rozdíl oproti stresujícímu vlivu temna na kultury inkubované v teple (kap. 5.1.2). Chlad tedy způsobil zástavu životních projevů, ale bylo ještě třeba zjistit vliv na vitalitu. Jinak vyjádřeno, ověřit, zda tak dlouhodobě

přechovávaný nerostoucí materiál je skutečně schopný obnovit růst a tvořit další mikrořízky.

Další pokusné kultury byly proto zahájeny každá z jednoho mikrořízku pocházejícího z předešlých kultur, podrobených chladu. Inkubace probíhala normálním způsobem v teple a na světle a po 6 týdnech byl pokus vyhodnocen: 71 kultur se rozrostlo a v nejlépe se množících vzniklo až 9 mikrořízků (foto 10). Zbýlých 29 kultur se nerozrostlo, anebo byly odumřelé. Může-li být 71% dále rostoucích kultur považováno za uspokojivý počet, lze z toho vyvodit i vhodnou lhůtu, po kterou je možné kultury bez pasážování skladovat v chladničce pro pozdější využití. Ta činí 5 měsíců. Kultury skladované v chladu, protože jsou zelené a olistěné a jsou schopny ihned po vystavení tepla a světlu pokračovat v růstu, nelze označit za dormantní. Předpokládala jsem, že nemají ani navozenou rezistenci vůči mrazu. Ověřila jsem to tak, že jsem sérii 100 kultur předpůsobených po dobu 2 měsíců chladem přemístila do trvale mrazivého prostoru v ledničce. Po 3 měsících jsem zjistila 100% mrtvých kultur, přičemž ovšem zjevně nedošlo k mechanickému působení vody v buňkách, tj. k roztrhání pletiv. Kultury pouze ztratily zeď živých pletiv a zjevně odumřely (foto 11).



Foto 9.- Orgánové kultury *Sorbus domestica* po absolvování 5 měsíců trvajících skladování v chladu a temnu.



Foto 10.- Polykormon vypěstovaný in vitro z jediného mikrořízku *Sorbus domestica* pocházejícího z kultury skladované 5 měsíců v chladu a temnu.



Foto 11.- Nekróza kultur *Sorbus domestica* po absolvování 2 měsíců chladu v živém stavu a následně 3 měsíců mrazu s letálním účinkem.

Z popsaných pokusů lze mít za prokázané, že orgánové kultury jeřábu oskeruše jsou rezistentní vůči chladu, ale chladem se u nich nenavozuje dormantní stav spojený s rezistencí vůči mrazu. Při skladování v chladu se v rostlinách nesyntetizuje takové množství růstového inhibitoru, aby zabránilo dalšímu růstu po přenesení do normálních inkubačních podmínek. Jmenovitě kyselina abscisová, jež je takovým obligátním inhibitorem, se podle životních projevů mikrořízků zřejmě nenahromadila ani jako důsledek stresu z nedostatečné teploty natolik, aby nepřevládal exogenní cytokinin v médiu jako promotor růstu.

5.2 Ekologická konstituce kalusové kultury *Ulmus glabra*

5.2.1 Vztah k aciditě

Kalusová kultura modelového druhu *Ulmus glabra* roste rovněž velmi dobře v tekutém médiu s pískovým nosičem. Díky tomu bylo možné připravit média o trojí různé aciditě, stejně jak je uvedeno u orgánových kultur *Sorbus domestica*. Každá kultura byla připravena v sérii 30 lahvíček a zahájena inokulem 5-8 mm velkého kusu pletiva. Kvantitativní vyjádření růstu se však u vznikajících nepravidelně hrudkovitých, a přitom rozpadavých útvarů hledá stěží. Vyjádřila jsem proto vitalitu každé kultury, a sice pomocí následující odhadové stupnice: odumírající či stagnující, anebo rostoucí, anebo rapidně rostoucí. Kultury hodnocené jako rostoucí se za dobu své existence 6 týdnů zvětšily nejvýše zhruba na dvojnásobek, rapidně rostoucí kultury svou velikost zhruba ztrojnásobily nebo přirostly ještě více. Složení média a inkubační podmínky jsou uvedeny v kap. 4.2.

Tab. 3.- Počty lahvíček s kalusovými kulturami *Ulmus glabra* vykazujícími určitý stupeň vitality (levý sloupec) na médiích s rozdílnou aciditou.

	pH 4,5	pH 5,8	pH 7,4
stagnující	1	2	2
rostoucí	2	3	26
rapidně rostoucí	27	25	2

Tabulka obsahuje odhadnutý parametr (stupeň vitality) vyjádřený jen hrubou stupnicí. Statistické hodnocení frekvenční tabulky jsem neprovedla, nicméně kalusové pletivo je zjevně acidofilní. Při slabě alkalickém médiu se rapidně rostoucí kultury takřka nevyskytují. Optimum přitom zřejmě není úzce ohraničeno, neboť první a druhý sloupec se opravdu málo liší.

5.2.2 Vztah ke světlu

Kultury ovlivněné pouhou dobou kultivace bez pasážování, anebo biochemicky pomocí média speciálního složení, přecházejí do stavu embryogenního pletiva (kap. 5.3.1). Zatímco zprvu bylo pletivo "vatovité", nabývá vzhledu "tvarohovitého". Logickým krokem v této fázi vývinu je vystavení kultur světlu, aby se projevilo případné zelenání somatických embryí. Právě tento postup poskytl překvapivý výsledek. K jeho vyjádření je použita táž stupnice jako v předešlé kapitole 5.2.1. Porovnála jsem kultury inkubované v temnu (kontrola) s pokusnou skupinou kultur inkubovaných na světle (tab. 4, foto 12).

Tab. 4.- Frekvenční tabulka vyjadřující rozdíl kultur inkubovaných po dobu 6 týdnů se světelným režimem od kontrolních kultur inkubovaných v temnu.

	temno	světlo
stagnující (s)	6	4
rostoucí (r)	40	16
rapidně rostoucí (rr)	4	30



Foto12.- Příklad na světle vyrostlé kultury *Ulmus glabra*, hodnocené jako rapidně rostoucí.

Údaje z tab. 4 lze hodnotit statisticky, neboť každá kultura vznikla z náhodně oddělené části pocházející z předešlé generace temnostních kultur. Kontrolní i pokusnou skupinu kultur vznikajících z takto pořízených inokul lze proto považovat za náhodný výběr. Údaje o prostředí i o rostlinách jsou kvalitativní, a proto se hodí χ^2 -test. Pro ten účel jsem tabulku transformovala sloučením prvních dvou řádků (stagnující + pouze rostoucí) a tyto kultury jsem souborně označila jako "neúspěšné", kdežto rapidně rostoucí jako "úspěšné" (tab. 5).

Tab. 5.- Transformace tab. 4 na čtyřpolní tabulku k hodnocení χ^2 -testem.

	úspěšné (rr)	neúspěšné (s+r)	
temno	(a) 4	(b) 46	(a+b) 50
světlo	(c) 30	(d) 20	(c+d) 50
	(a+c)34	(b+d) 66	(n) 100

Podle nulové hypotézy je frekvence "úspěšných" kultur v obou výběrech (temnostních a osvětlených kulturách) stejná. Výpočet testovacího kritéria je proveden takto:

$$\chi^2 = n \cdot \frac{(ad - bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Podle toho se vypočtené $\chi^2 = 30,12$. Nalezená tabulková kritická hodnota pro jeden stupeň volnosti a hladinu pravděpodobnosti 95% je 3,84 (Josífků 1971). Vypočtená hodnota je vyšší, což znamená, že nulová hypotéza nebyla potvrzena. Lze proto tvrdit, že kalusová kultura, je-li vystavena světlu, roste lépe než v temnu. Překvapivost tohoto zjištění tkví v tom, že pletivo na světle vůbec nezelená. Jediným logickým vysvětlením popsaného jevu potom je pozitivní vliv světelné periody přes biorytmus pletiva, jenž je nejspíše i přes dediferenciaci zachován.

5.2.3 Reakce na nízké teploty

Lze si klást otázku, zda se kalusová kultura liší od orgánové kultury, která obstála v chladu a nesnesla mráz. Oba listnáče, *Sorbus domestica* (v orgánové kultuře) i *Ulmus glabra* (v kalusové kultuře), totiž vyrostly ve stejných inkubačních podmínkách. Pozorování cílené na zodpovězení této otázky bylo provedeno na sérii 50 lahvíček s aktivně rostoucími kulturami embryonálního pletiva, založenými dle metody uvedené v kap. 4.2. Bez jakéhokoli předpůsobení chladem byly lahvičky umístěny do mrazicího prostoru obyčejné ledničky a vystaveny mrazu po dobu 7 týdnů. Rozmrazení bylo pozvolné, neboť po dobu 4 dnů byly kultury ponechány ještě v chladu kolem 4 °C. Po přenesení na čerstvé médium byly kultury inkubovány normálním způsobem na světle a byl sledován jejich růst. Tak jsem stanovila, že náhlé zmrazení přežilo 84% kultur. Pozoruhodná byla přitom proměna jejich fyziologicko-histologického stavu; nové,

přirůstající části měly vzhled pletiva neembryogenního (foto 13). Teprve následně se pletivo spontánně navrátilo k výchozí podobě pletiva embryogenního.

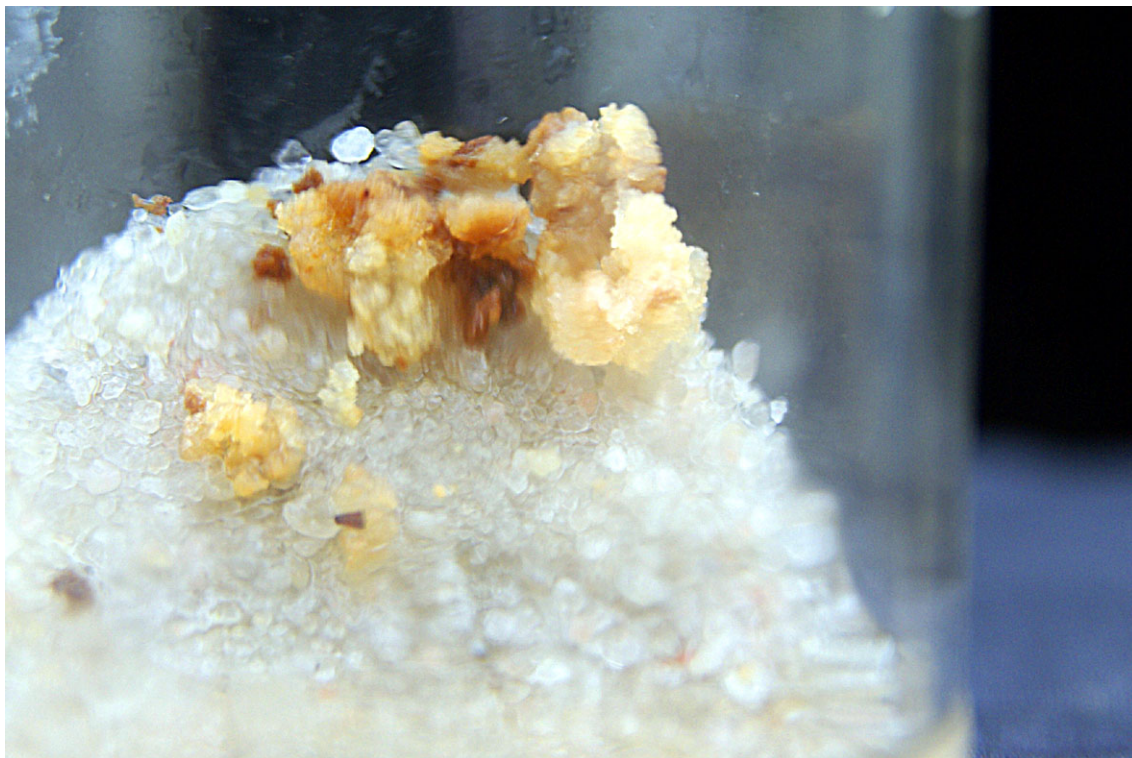


Foto 13.- Pletivo *Ulmus glabra* obnovilo po absolvování údobí mrazu růst. Z původního okrově zbarveného embryogenního pletiva vyrůstá bílé vatovité pletivo neembryogenní.

Po zjištění rezistence vůči mrazu jistě není překvapením i opakovaně ověřená odolnost vůči chladu. Chlad má inhibiční účinek na růst, ale neprojevoval se ani po šestitýdenním působení jako činitel navozující vývin globulárních somatických embryí do pokročilejšího stadia polárních embryí torpédovitého tvaru.

5.3 Limity somatické embryogeneze studované u *Ulmus glabra* a *Abies* – hybridu

5.3.1. Troficky a fytohormonálně indukované stavy

Tato kapitola je zaměřena na modelové kultury listnáče a jehličnanu, v prvním případě pocházející z pupene dospělého stromu, v druhém ze zygotického embrya

vypreparovaného z nezralého semene. Tak rozdílné kultury jsou zvoleny proto, aby se dalo usuzovat, jak specifickou, či nespecifickou platnost mohou získané poznatky mít.

Při embryogenezi je potřeba neembryogenní pletivo získané z iniciální fáze převést v pletivo embryogenní, produkující globulární somatická embrya. Tato embrya se potom mohou vyvíjet dále, což je patrné na změně tvaru a pod mikroskopem i v anatomii. Embryo případně způsobilé k vývinu skutečných rostlinek je polární a má anatomicky zjevná primordia kořene a děloh. Vývin kalusové kultury je zpravidla ovlivňován exogenními fytohormony, ale i troficky, když je do média přidán jiný cukr než obvyklá sacharóza. Používá se laktózy a ještě spolehlivěji maltózy.

Pozorovala jsem, že iniciální kalusová kultura jilmu horského se nedá dlouhodobě udržet jako neembryogenní pletivo. Chová se, jako by došlo k produkci nějakého endogenního fytohormonu. Do médií je někdy přidávána k navození vývinu a vyzrávání somatických embryí ABA čili kyselina abscisová (Vooková et Kormuťák 2003). Tato substance je u rostlin obecně rozšířena a je produkována v souvislosti se stárnutím orgánů, se stresem, anebo s biorytmy. Z úvahy, že možná kultury samy produkují právě ABA, jsem vyšla, když jsem připravila tři série kultur po 50 lahvičkách, s médii rozdílných vlastností. Každá kultura byla započata z 5-8 mm velkého oddělků embryogenního pletiva, pasážovaného a dobře se rozrůstajícího již jeden rok. Prvá, kontrolní série měla médium základní, tj. obsahující cytokinin BAP, známý jako stimulátor antagonistický vůči kyselině abscisové. Druhá série neobsahovala žádný cytokinin, ale auxin IBA. Třetí série neobsahovala žádný exogenní fytohormon, ale zdrojem energie byla maltóza (viz kap. 4.2). Maltóza se právě někdy používá v kombinaci s ABA. Vliv těchto médií na rostoucí pletivo měl být kvalitativní. Dle předpokladu, pod vlivem IBA mohlo pletivo pokračovat v růstu jako obyčejný neembryogenní kalus, kdežto pod vlivem maltózy mohla být embryogeneze oproti kontrole pokročilejší. Ani uvedené dosti velké série však nic takového neukázaly, neboť kvalitu pletiva po 7 týdnech inkubace (na světle) bylo možno označit jen jako všude stejnou. V každé lahvičce vznikalo embryogenní pletivo, s charakteristickou "tvarohovitou" (nikoli vatovitou) morfologií i patrnými globulárními somatickými embryi (foto 14 – 17).

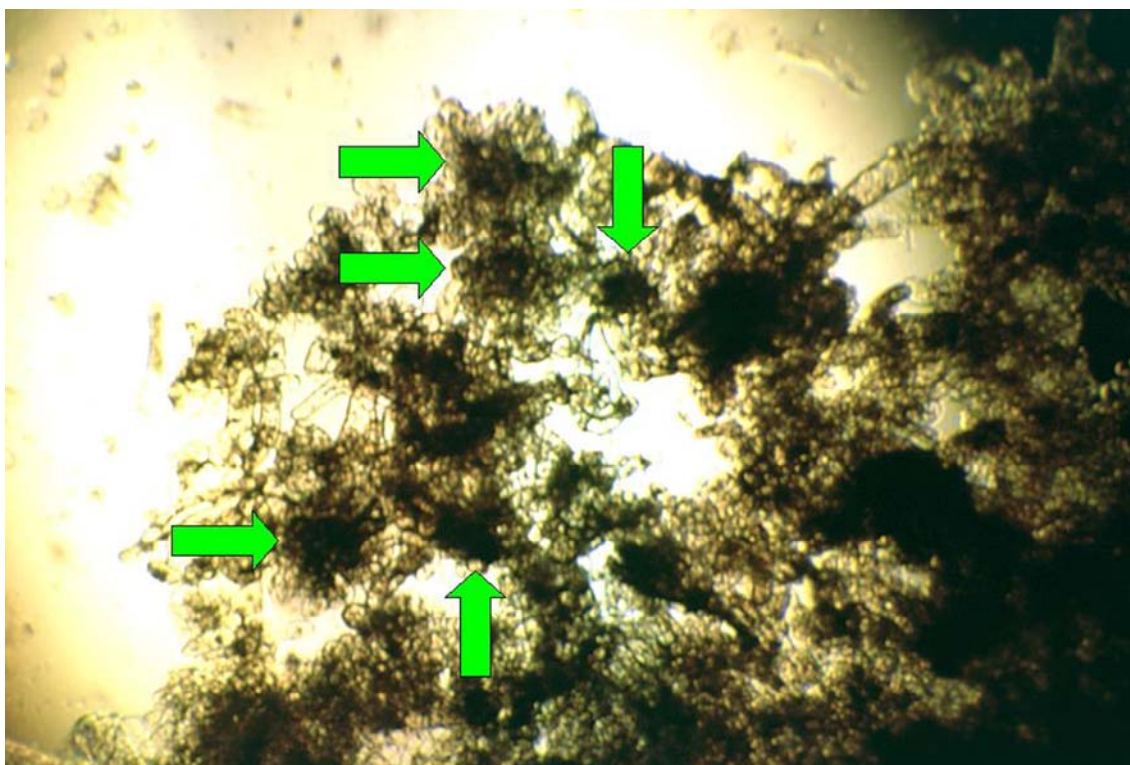


Foto 14.- Embryogenní pletivo *Ulmus glabra* pod mikroskopem. Šipkami jsou označena vznikající somatická embrya.



Foto 15.- Kultura jilmu inkubovaná na modifikovaném médiu $\frac{1}{2}$ MS s cytokininem BAP. Pletivo je embryogenní.



Foto 16.- Kultura jilmu inkubovaná na modifikovaném médiu $\frac{1}{2}$ MS s auxinem IBA. Pletivo je embryogenní.



Foto 17.- Kultura jilmu inkubovaná na modifikovaném médiu $\frac{1}{2}$ MS bez fytohormonů, ale s cukrem maltózou místo sacharózy. Pletivo je embryogenní.

Hybridní jedle byla inkubována ve tmě jednak na SH médiu pro iniciální fázi somatické embryogeneze, jednak na modifikaci s maltózou místo sacharózy, určené pro "vyspívání" somatických embryí. Obě série sestávaly z 30 lahvíček, naočkovaných pletivem udržovaným v růstu již 13 měsíců. Růst pletiva byl zdlouhavý a po 5 měsících (bez pasážování) jsem pozorovala u prvních kultur hlavně neembryogenní pletivo, u druhých vesměs embryogenní. Za tohoto stavu jsem všechny kultury vystavila světelnému režimu, aby případná dobře diferencovaná embrya zezelenala. Za dalších 5 měsíců (bez pasážování) se sice žádné zelenání neprojevovalo, ale morfologie pletiv se během uplynulého času u obou sérií sjednotila, byla to pletiva embryogenní (foto 18).



Foto 18.- Pletiva hybridní jedle získaná v kulturách se sacharózou (S) a s maltózou (M) jsou v obou případech embryogenní, ve stadiu tvorby globulárních somatických embryí.

Zestárnutí kultur vedlo i zde ke smazání rozdílných vlivů média a pletiva spontánně přešla do fáze tvorby globulárních embryí. Z toho lze usoudit, že byla podřízena endogenním fyziologickým působkům. Pozorovaný jev je stejný u jilmu i jedle.

5.3.2 Reakce kalusového pletiva na mechanickou disturbance a desikaci

Při pasážování kalusových kultur se provádí také jejich dělení, tedy vlastně mechanické rozrušení. Když pletivo roste v tekutém médiu na pískovém nosiči, je možnost rozptýlení živých i odpadních látek do daleko většího objemu než na ploše gelovitěho média. Uvedené dvě skutečnosti mne vedly k úvaze, že prozkoumání reakce kalusového pletiva na disturbance by mohlo být nejen zajímavé, ale i prakticky využitelné. Empiricky bylo předem zřejmé, že kultury jilmu i hybridní jedle jsou na tento ekologický vliv značně odolné. Pro přesnější prokázání této zkušenosti jsem použila embryogenní pletivo hybridní jedle. Experimentálně měla být potvrzena hypotéza, že disturbance lze docílit zlepšeného využití média a prostoru *in vitro*. Pro kvalitativní posudek jsem založila 40 kultur (kap. 4.2). Po 4 týdnech od naočkování jsem je rozdělila na kontrolní skupinu a zkušební skupinu. Kontrolní skupina byla pouze v celistvém stavu přenesena na čerstvé médium, kdežto zkušební skupina byla bez pasážování mechanicky disturbance; pletivo bylo razantním protřepáním s pískem rozlámáno na kousky menší než 3 mm. Písek a pletivo mají rozdílnou specifickou váhu, a proto po tomto zásahu je možné znovu vytvořit z písku šikmou plochu, s fragmenty pletiva na povrchu. Vyhodnocení bylo provedeno po 5 měsících, kdy kontrolní skupina právě projevila příznaky stárnutí (foto 19).

Skupiny se od sebe vesměs nelišily kvalitou pletiva, neboť to bylo v obou případech embryogenní. Rozdíl byl ovšem v tom, že kontrolní kultury měly tvar hrudkovitý, kdežto zkušební skupina vesměs vytvořila souvislé porosty po šikmé ploše nosiče. Žádné známky strárnutí ještě ani po uvedené dlouhé době od naočkování nejevily (foto 20). Pozorované chování po disturbance lze proto interpretovat také jako prodloužení životnosti jednotlivých subkultur.

Jestliže disperse pletiva v pokusných kulturách znamenala výhodnější distribuci než shluky v kontrolních kulturách, pak mezi volně spojenými buňkami nejspíše dochází k soutěži o přístup ke zdrojům. Některé části shloučeného nedisturbovaného kalusu nejpravděpodobněji právě proto časem odumíraly.

Bylo také vyzkoušeno, že písek je jako nosič výhodný tím, že při disturbance funguje jako mechanické agens. Doporučená zrnitost (kap. 4.2) je při tom důležitá.



Foto 19.- První příznaky stárnutí kultury hybridní jedle, spočívající v počínající nekróze, hnědnutí nejstarších buněk. V tomto stadiu byly takovéto kultury neovlivněné disturbancí porovnány s kulturami disturbovanými.

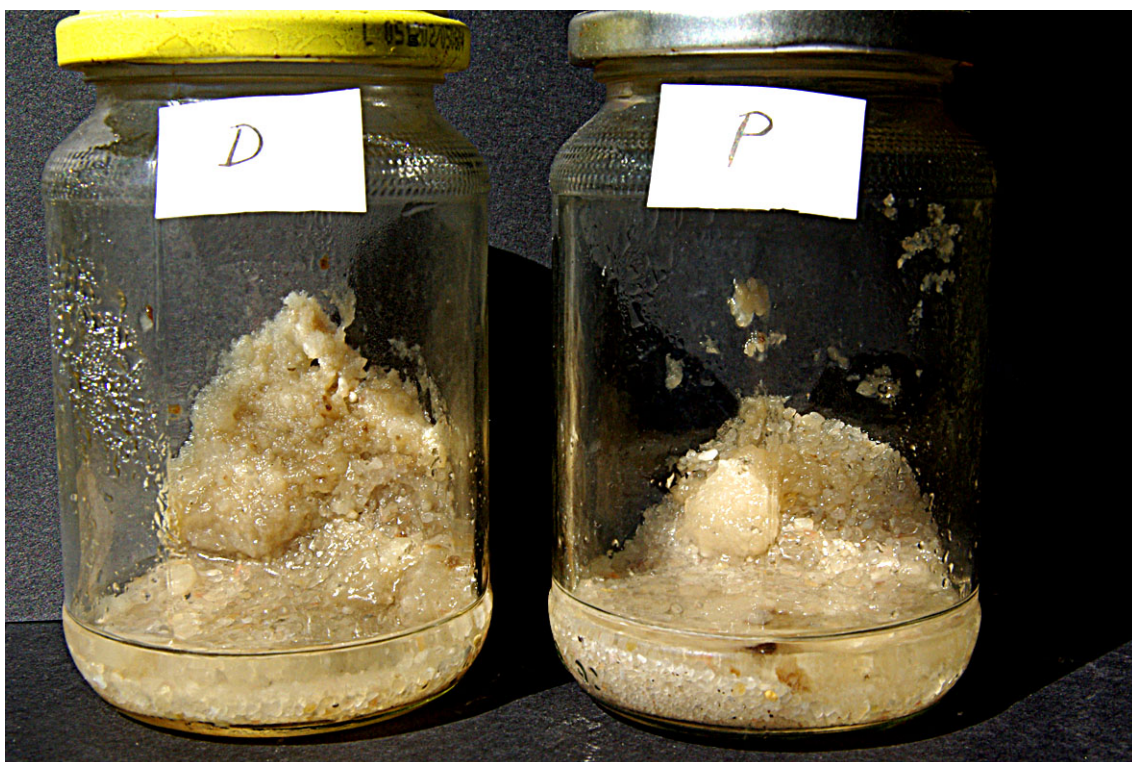


Foto 20.- Každá z disturbovaných kultur (D) měla výhodnější, rozsáhlejší disperzi než kontrolní kultury neovlivněné disturbancí (P).

Experimentátoři však užívají ještě jiný způsob disturbance, a sice osycháním embryogenního pletiva ve sterilních podmínkách, aby došlo k vyspívání somatických embryí založených v embryogenním pletivu. Toto narušení rostlinného pletiva jsoucího bez jakékoli ochrany pokožkou lze také vysvětlit jako drastický stres z nedostatku vody. Vysychání proto musí být pozvolné a mírné. Jestliže však bylo byt' jen mírné desikaci na vlhkém písku v lahvičce vystaveno pletivo jilmu anebo hybridní jedle, reagovalo ve 100% případů rekalcitrancí.** Zůstalo dlouho živé, avšak nikdy nebylo schopné obnovit po opětném přenesení do média růst nebo nějak dále vyvíjet somatická embrya.

5.3.3 Vitalita kalusových kultur jilmu a hybridní jedle

U matečných stromů, hybridní jedle a jilmu, je dána přirozená životnost, omezená délka života. Jak je to však u neustále dělených a v orgány nediferencovaných kalusových kultur? V literatuře (viz kap. 2) jsou zmínky o tom, že ve skutečnosti se celková délka života takových kultur počítá jen na měsíce, nanejvýše na roky. Jak vypadá smrt stromu se všeobecně ví. Smrt kalusové kultury je ovšem také po všech stránkách zajímavým fenoménem, neboť omezuje potenciální využitelnost kultur in vitro.

Podle mých četných pozorování vztahujících se k experimentům různého typu se s každým, byt' i včasným pasážováním snižuje schopnost specializace buněk. Je to jev známý i z literatury, kdy somatická embrya diferencovaná natolik, aby z nich mohly vznikat alespoň v malém počtu rostlinky, jsou tvořena jen v iniciální nebo první následné generaci kultur. Dokumentuji zajímavou proměnu v časných generacích jilmu, když z iniciální temnostní kultury očkované explantovaným pupenem dne 30.3.2006 na

** **Rekalcitrance [angl. recalcitrance]:** Nežádoucí a většinou ireverzibilní stav nastávající u kultur in vitro, kdy buňky, pletiva nebo orgány ustnou ve vývinu i růstu a ač jsou živé, nereagují ani na změněné kultivační podmínky (*recalcitro* = přístup odpírám, vyhazuji – o koni). Příčiny jsou spatřovány v ekologické konstituci rostlinného materiálu (donora), manipulacích in vitro a stresorech in vitro. Vážný problém v biotechnologii. Příklad užití termínu: Benson 2000.

½ MS médium byl materiál pasážován a nadále udržován v temnu, a přesto se kromě kalusu vytvořil zelený útvar podobný základu stonku (foto 21).

Když byl v další generaci jilm inkubován při světelném režimu, byl sice pozorovatelný rapidní růst dediferencovaného pletiva, ale diferencovaná pletiva abortovala. Nově vznikal jen tu a tam v dediferencovaném pletivu i malý zelený sektor ze specializovaných asimilujících buněk (foto 22). Morfologicky ovšem vůbec nešlo ani o somatické embryo, ani o počínající organogenezi. V průběhu celého dalšího života tohoto histologického materiálu se již tato schopnost specializace buněk nikdy neprojevovala.

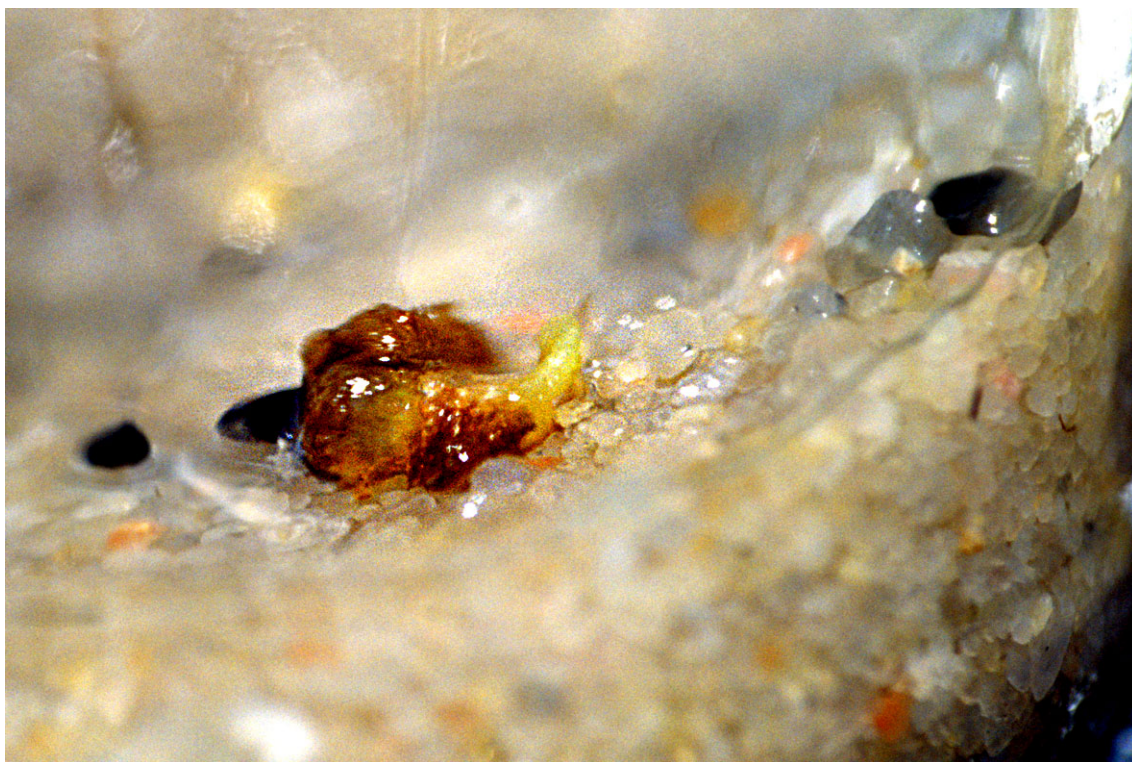


Foto 21.- Zelený diferencovaný útvar vzniklý v pouhé 4 týdny trvající kalusové kultuře *Ulmus glabra*.

Kalus přešel v embryogenní pletivo a byl v dalších generacích kultur udržován na ½ MS médiu s obsahem hydrolyzátu kaseinu a cytokininu BAP (kap. 4.2). Ve stavu dokumentovaném dne 7. 8. 2008, tedy po 28 měsících, již toto pletivo stagnovalo, téměř nepřirůstalo a nereagovalo na uvedený exogenní stimulátor. Tento stav lze označit jako rekalcitranci, způsobující nepoužitelnost materiálu k dalším experimentům, přestože pletivo nelze prohlásit za mrtvé (foto 23).



Foto 22. U sedmiměsíčních pasážovaných kultur *Ulmus glabra* inkubovaných při světelném režimu se naposledy objevovaly zelené specializované buňky.



Foto 23.- Konečné stadium kultury *Ulmus glabra* po 28 měsících od iničiálního stadia. Hrudky embryogenního pletiva, velké 2-3 cm, jsou živé a nerostou (rekalcitance).

Hybridní jedle rostla z vypreparovaných ještě se vyvíjejících bílých zygotických embryí v iniciální kultuře na pevném SH médiu tak, že po měsíci inkubace v temnu začala tvořit tzv. embryonální suspensorovou masu (ESM).^{††} Pasážování jsem prováděla s odstupem 7 týdnů a zjistila jsem, že po přenesení na modifikaci média s maltózou mohou některé povrchové "ostrůvky" pletiva na světle během této sedmítýdenní subkultury zezelenat (foto 24). Nejsem si však jista, zda tato specializace buněk byla průvodním jevem při vývinu somatických embryí. Stejně jako v případě jilmu, ze zelených částí se nic nevyvinulo a tato schopnost zelenat se později u embryogenního pletiva vytrácí, ač pletivo i nadále dobře roste i tvoří globulární somatická embrya (kap. 5.3.1, foto 18).

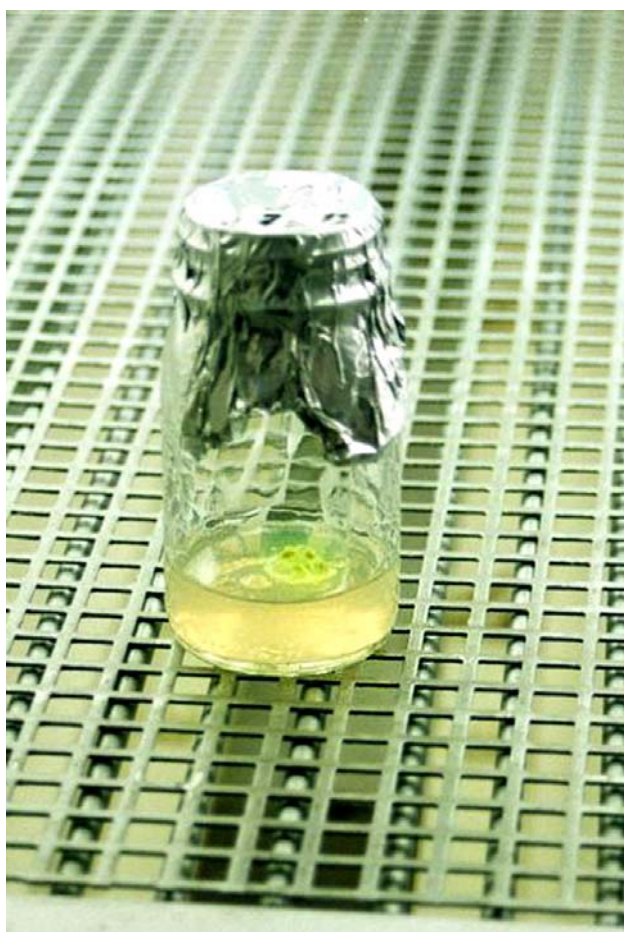
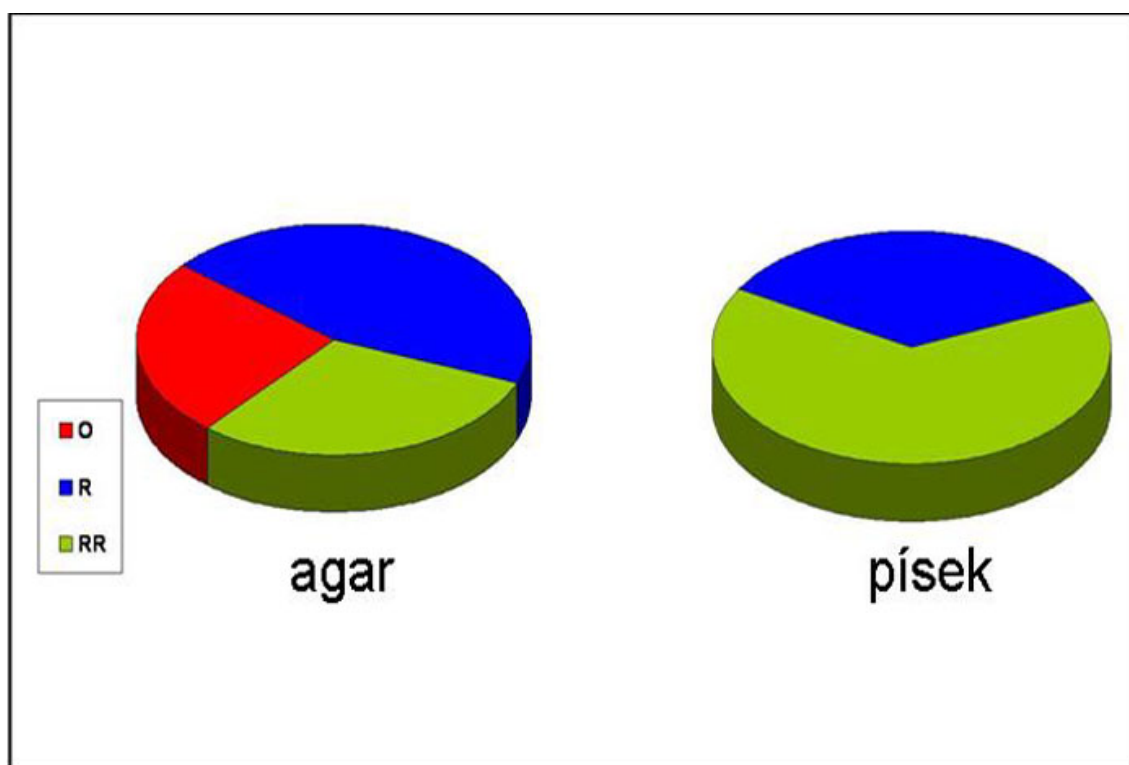


Foto 24.- Povrchové buňky tohoto kalusového pletiva hybridní jedle na světle zezelenaly.

^{††} Ze zygoty vzniká buněčným dělením jednak zárodek (*embryo*), jednak zavěšovací (suspensor), jímž je zárodek spojen s mateřským organismem. Po extirpaci embrya a inokulaci se zpravidla na straně suspensoru začne tvořit embryogenní pletivo využitelné při somatické embryogenezi. Tomuto pletivu patří uvedené označení. Příklad užití termínu: Mathur 2001.

Z přehledu literatury (kap. 2) je ovšem zřejmé, že pro kultury in vitro se leckdy časem nalezne jiné využití než k produkci sazenic. Životnost kalusových kultur zůstává proto zajímavým aspektem. Pod vlivem předešlých poznatků, že tekuté médium s pískovým nosičem může přinášet markantní zlepšení životních podmínek a vést k vitálnějším kulturám než je běžné, jsem připravila srovnávací experiment. Získané kalusové pletivo jsem naočkovala na původní modifikaci SH média (Vooková et Kormuťák 2003) zpevněného 6% agaru a tím jsem vytvořila kontrolní soubor 20 kultur. Totéž médium v tekutém stavu jsem u stejně velkého souboru pokusného použila s pískovým nosičem (kap. 4.2). Protože inokulum bylo všude přibližně stejně velké, bylo možné po uplynutí 8 týdnů inkubace již odhadovat, zda inokulum rapidně rostlo (značeno RR), tj. zvětšilo objem zjevně více než alespoň dvojnásobně. Případy, kdy inokulum sice rostlo, ale nanejvýše se zdvojnásobilo, byly označeny R. Pokud inokulum odumřelo, bylo označeno O. Tak hrubým odhadům sice není adekvátní statistické testování, nicméně viditelný fenomén lze znázornit diagramy (obr. 1).



Obr. 1.- Pozitivní vliv tekutého média s pískovým nosičem ve srovnání s pevným agarovým médiem podle experimentu s kalusovými kulturami hybridní jedle. (O = odumřelé, R = rostoucí, RR = rapidně rostoucí)

Přesvědčivý kvalitativní rozdíl, ilustrující vliv zpevněného a tekutého média, je i na fotodokumentech (foto 25 a 26). Každá z těchto fotografií reprezentuje "typické", tj. podle obr. 1 relativně nejvíce zastoupené případy kultur.

Kultury jilmu a hybridní jedle projevily velmi podobné vlastnosti. Jejich schopnost tvořit buňky s chlorofylem se časem vytrácí, mezi ranými a pozdějšími subkulturami je tudíž rozdíl ve fyziologické konstituci. Vitalita, posuzovaná podle schopnosti rozrůstat se, klesá po delším čase v řádu měsíců. Lze ji však kladně ovlivňovat a jako účinné byly prokázány dvě jednoduché metody, spočívající v užití pískového nosiče s tekutým médiem a v uplatnění mechanické disturbance.

5.4 Vitalita a rezistence mikrořízků *Sorbus domestica*

Mikrořízek pocházející z orgánové kultury (kap. 5.1) je subtilní rostlinná část, menší oproti obyčejnému bylinnému řízku, a také zchoulostivělá nanoklimatem uvnitř kultivační skleníčky. Také jeho fyziologická konstituce je zvláštní, neboť je i po vyjmutí z kultury in vitro ovlivněn přijatým exogenním cytokininem, fungujícím při mikropropagaci jako promotor proliferace. Účinek cytokininu je, pokud se týká potřeby zakořenit mikrořízek, antagonistický auxinům. Zakořeňování mikrořízků je všeobecně nejslabším článkem mikropropagace. Obvyklou praxí je převedení kultur in vitro na sterilní zakořeňovací kultury. Ty obsahují některý z auxinů (ponejvíce IBA) a někdy i další substance, jako je aktivní uhlí rozptýlené v agarovém médiu aj. Vyčkává se na vytvoření kořenů, a teprve potom dochází k přenosu extra vitrum a aklimatizaci.

Subkulturu na médiu s obsahem auxinu v případě zkoumaného druhu *S. domestica* používali Arrillaga, Marzo et Segura (1991). Místo opakování jimi prověřeného postupu jsem začala experimentovat se zpracováním mikrořízků zahradnickým způsobem.

Výhonky přímo z rostoucích orgánových kultur mají v paždí listů úžlabní pupeny, a proto z nich lze udělat nejen vrcholové, ale i osově řízky. Zahradnická práce s mikrořízkem se v ničem neliší od běžné práce s bylinnými (měkkými) řízkem dřevin. První kořeny se objevují u obou typů řízků skoro synchronně za 2 týdny a od té doby

mají být rostlinky již otužovány. Neuvádím statistické vyhodnocení, protože při použití kvalitních, nikoli zcela slabých a příliš krátkých (méně než 2 cm) mikrořízků a opatrném otužování mírným větráním, snižujícím více a více vzdušnou vlhkost, se zakořenělé řízky musí přečkat v bezmrazém chladném skleníku, neboť mají nezdřevnatělá pletiva a jsou ještě pod vlivem cytokininu z kultur in vitro. Proto jim neopadávají listy, anebo opadávají jen částečně, přestože přirozené osvětlení při zimní fotoperiodě je přirozeným induktorem dormance. Výsadba do venkovní školky byla kvůli nebezpečí pozdních mrazíků pro olistěné sazenice provedena až v polovině května (foto 27 až 30).

Zkoušela jsem dále, zda mikrořízky pocházející z kultur podrobených chladnému období (kap. 5.1.3) jsou také připraveny k rychlému růstu, a proto i dobrému zakořenění. Opak se projevil, když bylo již několik hodin po nařízkování pozorována rychle postupující hniloba, navzdory chemickému ošetření proti množárenským mykózám (kap. 4.2). Podíl přeživších kořenicích rostlinek byl bezvýznamný a tento způsob řízkování označuji za nevhodný. Po působení chladu, zpravidla kvůli zakonzervování kultur, je nutno pokračovat inkubací na multiplikačním médiu in vitro. Až když je obnoveno přirůstání výhonků, lze získat mikrořízky vhodné k zakořeňování. Ačkoli tedy orgánové kultury podrobené chladovému období vypadají vitálně (foto 9), jejich fyziologická kondice způsobuje minimální rezistenci k vnějším vlivům po vyjmutí z lahviček, speciálně vůči patogenním houbám.

Je patrné, že dokumentované experimentování se zakořeňováním mikrořízků v nesterilních podmínkách je slibné pro použití ve školkařské praxi. Vzniká ovšem logická otázka, zda kořenový systém ze samých adventivních kořenů, a tedy odlišný od semenáčků s primárním kořenem, je způsobilý k vývinu vitální sazenice. Kvalita sazenic zhruba za rok od vyjmutí z lahviček, provedeného dne 10. srpna 2007, je doložena fotografií pořízenou na pozemku Botanické zahrady Liberec dne 13. září 2008. K tomuto datu byl již ukončen růst stonku v první vegetační sezóně a u fotografovaných exemplářů dosáhl 70 a 72 cm. Vitalita je zjevně a u všech sazenic výborná (foto 31). Podzimní opad listů proběhl normálně.



Foto 25.- Převažující stav kultur hybridní jedle při obvykle používaném způsobu inkubace na agarem zpevněném médiu.



Foto 26.- Rapidně rostoucí kultury hybridní jedle při použití tekutého média s pískovým nosičem, inkubované souběžně s kulturami z foto 25.



10. července 2007



9. srpna 2007



14. dubna 2008



31. července 2008

Foto 27 až 30.- Ontogeneze jeřábu oskeruše počínající od jedinců právě vyjmutých z orgánové kultury.



Foto 31.- Za pouhých 14 měsíců od vyjmutí z orgánové kultury dosáhly tyto exempláře jeřábu oskeruše délky kmínku 70 a 72 cm.

6. Diskuze

S mikropropagací jeřábu oskeruše se experimentuje zejména v zahraničí a počet nalezených studií na toto téma je nevelký. Při diskuzi lze přihlížet také k poznatkům o blízkce příbuzném jeřábu ptačím (*Sorbus aucuparia* L.), s nímž se častěji pracovalo také v českých laboratořích. Optimalizace médií a kultivačních podmínek je společným předmětem všech takto vzniklých studií, nicméně můj zájem se soustřeďuje na celkové (i při experimentech nevíтанé) ekofyziologické chování rostlinného materiálu. Leckdy je jako vedlejší nežádoucí efekt zmiňováno jen letmo a není dokumentováno, nicméně

ve světle poznatků z kap. 5.1 a 5.4 předložené dizertační práce jsou i takové zmínky použitelné k diskusi.

Na Slovensku se po 2 roky zkoumaly vlastnosti různých klonů jeřábu oskeruše a při tom bylo, stejně jako při mých experimentech, použito iniciálních kultur z embryí vyjmutých ze zralých semen. Iniciální i multiplikační orgánové kultury byly též udržovány na ½ MS médiu. Je zajímavé, že zatímco iniciální kultura probíhala na médiu obsahujícím z fytohormonů pouze cytokinin BAP, multiplikační subkultury potřebovaly podle autorů ještě přídavek 0,04 mg/l auxinu IBA čili kyseliny indolylmásečné (Miko, Gažo et Biroščiková 2004).^{‡‡} Podle mých poznatků je tento exogenní fytohormon zcela zbytečný, neboť i bez něj za určitých podmínek kultury dobře rostou a zjevně mají dostatek endogenního auxinu. Postačuje tudíž nechat působit pouze zmíněný cytokinin, promotor multiplikace výhonků. Je to důležité proto, že auxiny při organogenezi působí vždy podle poměru vůči cytokininům: Podporují apikální dominanci, kdežto při dominanci cytokininů je apikální dominance potlačována a z adventivních pupenů zakládáných uvnitř pletiv vzniká více stejně disponovaných výhonků. Právě to je cílem multiplikačních subkultur pro produkci mikrořízků. Zde je nutno při diskusi nad naznačeným rozparem poukázat na rozdíl mezi užitím v podstatě téhož média citovanými autory a v experimentech prezentovaných v předložené práci. Na základě předešlých stanovení provedených s jiným druhem jeřábu jsem využila předností kombinace média v tekutém stavu s pískovým nosičem (Prknová 2007). Jestliže předešle citovaní autoři potřebovali k dosažení dobrého přirůstání kultur jako stimulator růstu dodávat auxin, lze to nejpravděpodobněji vysvětlit nutností překonávat důsledky brzy se zhoršujícího zásobování zvětšujících se orgánů spočívajících na malé styčné plošce s pevným povrchem živného média. Na modelu *Sorbus domestica* jsem rozdíl mezi oběma metodami použití ½ MS média prokázala statisticky významnými soubory dat (tab. 1). Po ekologické stránce lze konstatovat, že u rostlinného materiálu bez možnosti přijímat živiny normálně pomocí kořenů, a tedy využívajícího mimokořenové výživy, je nutno jako podstatný faktor brát v úvahu rozsah a způsob styku s médiem. Mnozí experimentátoři, když užívali vžitých laboratorních postupů, tento vlastně velmi logický a nabízející se fakt zcela opominuli (Chalupa 1988,

^{‡‡} V případě *S aucuparia* L. totéž publikovali Lall, Mandegaran et Roberts (2006).

Arrillaga, Marzo et Segura 1991, Mauleová, Vítámvás et Tušek 2004, Lall, Mandegaran et Roberts 2006, etc.). Agarem zpevněné médium sice vypadá jako "čistý" laboratorní prostředek připravovaný ve standardní kvalitě přesně opakovatelným postupem, avšak jaký je to omyl jsem popsala a zdůraznila již dříve (Prknová 2004, 2007). V tom však nejsem jediná a ani nemám primát, neboť s tekutými médii v kombinaci s jinými než gelovými nosiči experimentovali i jiní autoři a přímo pískový nosič byl s úspěchem použit již pro orgánové kultury bylinných druhů (Studnička 1989, Tanimoto et Kagi 1994). Další alternativy nosičů vhodných při použití tekutých médií, zkoušených na různých pracovištích, jsem uvedla ve své dřívější práci (Prknová 2007). Kdyby se vztah k substrátu týkal normální ekologie a nikoli kultur in vitro, bylo by možné vyjádřit jej termínem "hygrofyt" (druh vlhkomilný). Jeřáb oskeruše ovšem v normálních podmínkách hygrofytem naprosto není a je naopak považován za druh odolný vůči suchu (Prudič 1998, Kubát 2005-2007, Paganová 2008). V daném případě se ovšem nesnažím o hříčky se slovy, ale je to první příležitost poukázat na hluboký rozdíl v manifestaci téže genetické výbavy v rozdílných situacích. Jinak vyjádřeno, poznané a doložené chování orgánových kultur jeřábu oskeruše je prokázaným signálem, že při mikropropagaci bude třeba počítat s ekologií druhu specifickou pro kultury in vitro.

Na předešlé první zjištění jsem navázala prozkoumáním vztahu týchž kultur ke světlu (kap. 5.1.2). Je všeobecně známo, že jestliže jsou orgánové kultury inkubovány při umělé konstantní fotoperiodě a stimulovány cytokininem obsaženým v médiu, nejeví roční bioperiodicitu. Jako v listopadu se však začnou prýty *Sorbus domestica* v těchto kulturách chovat, jestliže se zruší světelný požitok, tj. začnou být inkubovány v temnu. Nestane se to však, když se přidá působení chladu (kap. 5.1.3). Po pročtení zevrubné monografické studie o kyselině abscisové (Addicott et Lyon 1969) považují právě tento rostlinný inhibitor za nejpravděpodobnější příčinu pozorovaných fenoménů, ač bez biochemické erudice a příslušného vybavení jsem se nemohla pokusit ji přímo prokázat. Tato látka je totiž dosti univerzální při reakcích rostlin na stresy a při přechodu do dormantního stavu. Pozorovaná senescence způsobená stresem z nedostatku světla při inkubaci v teplotě vhodné k růstu nenastane v chladu, když jsou právě chladem biosyntetické pochody zpomaleny či zastaveny. Je-li tato úvaha správná, potom při kulturách in vitro je nutno počítat s produkcí kyseliny abscisové nejstaršími listy, a protože odumřelé buňky podléhají autolýze, tato ve vodě rozpustná látka se může

octnout v médiu a v uzavřeném prostoru může zpětně působit jako exogenní fytohormon. Exogenní působení kyseliny abscisové bylo skutečně experimentálně prokázáno, i když na jiném rostlinném materiálu (Studnička 1989). Podruhé tedy konstatuji, že ekofyziologie in vitro je zcela svérázná a porozumíme-li jí více, mohou nabýt zvláštního významu takové jevy, jako je lepší či horší difúze látek v gelovitých a tekutých médiích (Prknová 2007).

Působením chladu na orgánové kultury se podařilo na celé měsíce pozastavit růst a zase jej inkubací in vitro teplem a světlem navodit. Tím jsem potvrdila poznatky autorů citovaných v přehledné kapitole 2.4, získané u jiných listnáčů. Praktický význam je velký, neboť možnost zakonzervovat zásobu mikrořízků ve formě zchlazených orgánových kultur in vitro činí mikropropagaci v provozních podmínkách flexibilnější i levnější (materiál lze skladovat; odpadá nutnost častého pasážování). Je ovšem nutné nepřehlédnout další moje zjištění, že takto ošetřené mikrořízky nelze použít přímo k zakořeňování, ale je nutná subkultura na obnovení růstu prýtů (kap. 5.4).

Fáze multiplikační byla tedy uspokojivým způsobem dořešena a odzkoušena. Po ní však nastává fáze zakořeňování mikrořízků, představující samostatný problém. Zajímavě se experimentovalo se zakořeňováním mikrořízků komerčně významných dřevin, například různých odrůd jableň. Tvorba kořenů byla navozena in vitro značně komplikovaným způsobem: Před pasážováním na speciální zakořeňovací médium byly mikrořízky infikovány čistou kulturou *Agrobacterium rhizogenes*. Tato bakterie indukuje zakořeňování tím, že malou část svého genomu s informací pro rhizogenní účinek včlení do genomu napadených buněk rostliny. Po vytvoření kořenů bylo potřeba další médium, obsahující antibiotikum usmrcující tuto bakterii. Teprve potom byly mikrořízky použitelné k převedení na přirozený substrát (Damiano et Monticelli 1998). S odstupem 10 let lze konstatovat, že tato metoda se neprosadila.

Již v kap. 5.4 jsem zmínila nejčastější způsob, při němž se navozuje tvorba kořenů in vitro pomocí některého auxinu, případně dalších aditiv (aktivní uhlí aj.). Podrobnosti k zakořeňování in vitro tímto způsobem byly v literatuře popsány také v souvislosti s tendencí podpořit lesnické i jiné využití třešně ptačí (*Prunus avium* L.) díky klonování pomocí orgánových kultur (Hammatt et Grant 1997, Muna et al. 1999, Malá et al. 2002). V případě *S. domestica* se také dosud postupovalo tímto komplikovaným způsobem (Arrillaga, Marzo et Segura 1991, Miko, Gažo et

Miroščíková 2004). Prokázala jsem však, že mikrořízky jsou díky vysoké vitalitě a rezistenci vůči změně všech vnějších podmínek kromě teploty a osvětlení disponovány k zakořeňování přímo v nesterilních podmínkách do zahradnického substrátu. Také při tomto postupu je uplatněn auxin, a sice kyselina naftyloctová v kombinaci se podpůrně působící kyselinou nikotinovou. Po určitou dobu také ještě působí "historický faktor", spočívající v již zmiňovaném zrušení přirozeného biorytmu. Osvědčilo se mi tedy první přezimování řízkovanců v chladném skleníku. V literatuře jsem našla zprávu o zakořeňování několika druhů jeřábů včetně jeřábu oskeruše tím způsobem, že mikrořízky byly předpůsobeny auxinem pomocí subkultury in vitro a ve stavu, kdy některé vyháněly kořeny a některé nikoli, byly vyjmuty ze skla a nasázeny do půdy (Piagnani et Bassi 2000). Kořenily potom všechny. Tuto přechodnou subkulturu in vitro lze ovšem na základě mých poznatků považovat za zbytečnou. Zaujala mne ještě možnost zlepšit zakořeňování každodenním postřikováním mikrořízků třešně ptačí 1,0 mM roztokem kyseliny askorbové (Vassar 2003). Je to podnět pro pozdější ověření této praktiky též u jeřábu oskeruše.

Zahradnické ošetřování sazenic jeřábu oskeruše pocházejících z laboratoře vedlo až k výsledné výšce ± 70 cm dosažené za 14 měsíců od vyjmutí ze skla (kap. 5.4). Rapidní růst nastal po přesazení z květníků do volné půdy, kde se mohla vyvinout rozměrnější rhizosféra. V literatuře jsem našla údaj, že při výsevu za umělých podmínek se podařilo za jednu vegetační sezónu získat semenáčky 80 až 120 cm vysoké (Rohmeder 1951 non vidi, sec. Prudič 2000). Vyrůstnost exemplářů z mikrořízků není ve srovnání s tím nijak podřadná. Na základě tohoto poznatku lze považovat za nadějný návazný projekt cílený na srovnávací morfologické studium včetně rhizologických rozborů a biometriky. Měl by se týkat dostatečně velkých souborů generativně a vegetativně (tj. mikropropagací) množených jedinců pocházejících z téhož matečného stromu a měl by být realizován souběžně pro oba typy sazenic na pokusných školkařských plochách.

Diskusi k výsledkům kultivace jilmu horského (*Ulmus glabra*) lze otevřít lapidárním konstatováním, že se mi nezdařila produkce mladých jedinců. Kultura embryogenního pletiva se ovšem rozrůstala velmi dobře. Literární prameny jsou se zřetelem na poznatky uvedené v kap. 4.1 a 5.2 neobyčejně zajímavé. Bylo-li použito jako primárního explantátu úžlabních pupenů odebraných v únoru z větviček 80letého

stromu, potom na MS médiu s obsahem 0,2 mg/l BAP + 0,1 mg/l IBA vznikla orgánová kultura (Malá et al. 2005). Jiní autoři postupovali podobným způsobem, odebrali pupeny v březnu a použili médium označované WPM bez fytohormonů (Biroščíková et al. 2004). Tito autoři ovšem v rozporu s předešlou prací udávají, že materiál ze 70letého stromu projevoval rekalitranci, tj. nerostl. Z pupenů mladého 15letého jedince ovšem byly opět zahájeny orgánové kultury. V dřívější práci Chalupové se uvádí, že úžlabní pupeny, případně špičky či segmenty výhonů, mohou být zdrojem orgánových kultur jedině když média neobsahují fytohormony nebo jen velmi nízké koncentrace. Je-li více cytokininu, vzniká kalus (Chalupa 1994). Zde nacházím příčinu chování pupenů jilmu na médiu s relativně vysokým obsahem 1 mg/l cytokininu BAP, na němž vznikal při mých experimentech bujně rostoucí kalus. V kontrastu s tím lze uvést orgánové kultury kultivarů jilmu 'Pioneer', které rostly na MS médiu i při velmi vysoké koncentraci 2,2 mg/l cytokininu BAP (Fink et al. 1986).

Corredoira, Vieitez et Ballester (2002, 2003) experimentovali s kalusovým pletivem odvozeným z nezralých zygotických embryí *Ulmus glabra* a *U. minor* a na modifikovaném MS médiu sporadicky dosáhli vzniku somatických embryí. Konstatovali však, že pro život těchto embryí je nezbytné tekuté médium, kdežto na zpevněném médiu dochází k hnědnutí i desikaci. Tekuté médium označují za podstatné. To je v souladu s mými poznatky, i když jsem dosáhla pouze somatických embryí v časném globulárním stadiu. Pokud byl ovšem kalus získán z dospělého stromu, somatická embrya se nedařilo získat vůbec (o. c. 2002). I embrya, která tito autoři vypěstovali do stavu dobře vyvinutých děloh a základů primárního kořene, byla defektní, protože jejich apikální meristém byl zakrnělý nebo chyběl úplně. Nebyla následkem toho schopná další morfogeneze. Somatická embryogeneze *U. glabra* tedy je cestou problematickou. Nicméně pokusy s kalusovým pletivem *U. minor* získaným z vegetativních částí, kdy primárním explantátem byly segmenty listů odebraných z orgánových kultur in vitro, byly úspěšné až po zakořenění rostlinek do normální půdy (Conde, Loureiro et Santos 2004). K indukci tvorby kalusu z listů bylo použito modifikované MS médium s obsahem 0,5 nebo 1,0 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové^{§§}. Tvorba embryí musela být podpořena též kinetinem (alternativa

^{§§} Syntetický fytohormon ze skupiny auxinů.

mnou používaného BAP). Druh *U. minor* je tedy případem dřeviny, kde je mikropropagace možná orgánovou i kalusovou kulturou. Je to také zřejmě poprvé, kdy bylo dosaženo u některého druhu jilmu somatické embryogeneze z orgánů pocházejících z dospělého jedince a nikoli z nezralého semene, jak je obvyklé. Je pozoruhodné, že uvedení autoři také přiznávají asi 60procentní mortalitu embryí na pevném médiu v důsledku desikace i při častém pasážování. Znovu tedy může být připomenuta výhodnost tekutého média v kombinaci s pískovým nosičem, jak jsem je odzkoušela na *U. glabra*.

Se zřetelem na vytčené cíle této dizertační práce je nalezení "slepé uličky" při kultivaci kalusových kultur *U. glabra* neúspěchem, neboť produkce embryogenního pletiva nestačí. Může však pomoci k akceptování reality v podobě limitu somatické embryogeneze daného druhu a nasměrování dalších projektů u tohoto materiálu spíše na orgánové kultury in vitro.

V přehledu literatury, v závěru kap. 2.1, jsem uvedla příklad vedlejšího využití kalusové kultury jilmu in vitro. S rostoucím pletivem jsem proto laborovala, abych popsala jeho vlastnosti. Je samozřejmé, že vztah pletiva k prostředí musí být jiný než je tomu u integrálního organismu. Například zatímco pletivo je acidofilní, stromy jsou vůči pH půdy naprosto tolerantní (Svoboda 1953). Tvorba kalusového pletiva se obvykle indukuje ve tmě (Corredoira, Vieitez et Ballester 2002, etc.) a ve tmě také může být dlouhodobě pěstováno. Můj výsledek, podle něhož toto nezelené pletivo roste lépe na světle než ve tmě, je kvantifikován pomocí velmi hrubých odhadů (tab. 4). Je ovšem natolik zvláštní, že by v rámci dalšího výzkumu stál za ověření například vážením inokula a konečného produktu. Prokázalo by se tím, že i nesespecializované buňky mají funkční fytochromový systém.^{***} Praktické důsledky pro laboratorní metodiku, potvrdí-li se tento nový poznatek, by byl: Inkubaci kalusového pletiva za účelem maximální produkce neprovádět tradičním způsobem v temnu, ale na světle. Důkaz, že nediferencované pletivo nepotřebuje na rozdíl od pletiv v orgánech žádnou fyziologickou přípravu k získání rezistence vůči mrazu, je též pozoruhodný. I to má využití v laboratořích, neboť připadá v úvahu velmi jednoduchá kryoprezervace zmrazením na nevelký stupeň (15 °C).

^{***} Tento systém regulující fotoperiodismus pracuje ve světlené oblasti "red – far red".

Souhrn zatím jen dosti malých úspěchů v mikropropagaci botanických druhů nebo hybridů jedlí jsem uzavřela s tím, že od konce devadesátých let minulého století nebyl učiněn objev činící ze somatické embryogeneze spolehlivou metodu množení ve velkém (kap. 2.3). Pro malou úspěšnost však ji nelze zavrhnout, neboť jsou zde také možnosti orgánových kultur z apikálních pupenů odebraných z juvenilních exemplářů, objevené na *A. fraseri* (Bergmann, Sun et Stomp 1997). Kombinace obou přístupů nebyla zatím vyzkoušena, ale lze poukázat na případ *Picea glauca* (Park 2002). Jedinci získaní somatickou embryogenezi jsou dále množeni řízkováním a toto množení již funguje v lesnické praxi. Mám-li naznačit nejslibnější směr dalšího experimentování s jedlemi, pak jej spatřuji ve snaze převést produkt somatické embryogeneze v orgánovou kulturu poskytující opakovaně v několika subkulturách mikrořízky.

Modelová hybridní jedle byla při mých pokusech úspěšně převedena do formy ESM, tj. iniciační fáze somatické embryogeneze. Také fáze multiplikační byla vyřešena s jistým úspěchem, neboť pomalý růst kalusového pletiva na pevném agarovém médiu se podařilo urychlit převedením na pískový nosič s tekutým médiem (kap. 5.3.3). Ve stadiu globulárních somatických embryí, ať již vzniklých na speciálním médiu s maltózou, anebo za jiných okolností, však kultury ustrnuly ve vývinu a polární embrya nevznikala. Limitem metody zde je nejspíše konstituce daná genetickými vlohami, a tak se zde příliš brzy projevilo stárnutí kultur popsané včetně příčin v literatuře (Roth, Ebert et Schmidt 1997). Nicméně, kalusové kultury hybridní jedle i jilmu shodně signalizovaly určitou schopnost specializace buněk (zelenání) v nejranější fázi růstu nediferencovaného pletiva (kap. 5.3.3). Pokud by se při dalším výzkumu hybridní jedle mělo věnovat úsilí novým pokusům o embryogenezi, pak mohu na základě dosavadních poznatků po iniciační kultuře doporučit jedinou subkulturu, a sice provedenou na světle, za použití pískového nosiče a s médiem obsahujícím maltózu místo sacharózy. Multiplikační fázi je lepší zcela vynechat, neboť pravděpodobně ireverzibilně potlačuje schopnost diferenciací. Je ovšem možné pletivo z iniciační kultury při přepasáží dělit, neboť dle mých poznatků lze počítat se značnou rezistencí vůči mechanické disturbanci. Kdyby se podařilo docílit vývinu a "vyklíčení" somatických embryí, bylo by žádoucí převést je v orgánové kultury pomocí média bez fytohormonů. Pozdějším pasáží na tekuté médium s velmi nízkou koncentrací cytokininu (např. BAP 0,1

mg/l) by snad bylo možné indukovat proliferaci. Jistá perspektiva pro další projekt tedy existuje, ač určitě nepůjde o tzv. výzkum s jistým výsledkem.

7. Závěry

Byly prokázány výhody metodické úpravy, kdy se místo orgánových a kalusových kultur modelových dřevin na pevném médiu použijí kultury na pískovém nosiči s tekutými médii. Ukazuje se tak, že moje předešlé poznatky z experimentování s tímto typem nosiče pro orgánové kultury *Sorbus sudetica* (Prknová 2004, 2007) mohou mít širší uplatnění; zlepšují vitalitu i v případě kalusových kultur.

Kalusové kultury *Ulmus glabra* by měly být hned po iniciální fázi vystaveny světlu, neboť na světlo reagují kladně. Stejně kultury hybridní jedle nebyly z tohoto hlediska testovány, avšak lze je též světlu vystavit, byly přinejmenším indiferentní.

Kalusové kultury podléhaly senescenci později, když byly ovlivněny mechanickou disturbancí. Po disturbanci není třeba je pasážovat a růst pokračuje až do obsazení prostoru na pískovém nosiči. Tento fenomén lze vysvětlit jediň tím, že rozvolněné pletivo může optimálně využít výhod tekutého média, v němž dobře difundují živiny odčerpávané pletivem a dobře se ředí škodlivé odpadní produkty ze zestárých buněk podléhajících autolýze.

Embryogenní pletiva modelových dřevin jsou extrémně citlivá na desikaci, ač právě desikace je jednou z technik častěji používaných k indukci vyzrávání somatických embryí. V případě *Ulmus glabra* je tím potvrzen dřívější poznatek jiných autorů (Corredoira, Vieitez et Ballester 2002, 2003). Pro tento materiál se z toho důvodu nemůže doporučit kultivace na zpevněných agarových nebo podobných médiích. Desikace jako prostředek k ovlivňování pletiv je u jilmu i zkoumané hybridní jedle nevhodná.

Kalusové kultury modelových dřevin (jilmu i jedle) lze díky popsanému jednoduchému a extrémně levnému způsobu kultivace pěstovat dosti dlouho a značně je pomnožit, ač subkultury následující po iniciální fázi potlačují schopnost diferenciaci. Snadná kultivace je minimálně v případě *Ulmus glabra* potenciálně využitelná v aplikované biochemii, neboť již dávno je známa produkce skopoletinu (s fungicidními účinky) pomocí složitě realizovaných suspenzních kultur *U. campestris* a *U. pumila* (Valle et al. 1967).

Orgánové kultury *Sorbus domestica* mohou být díky vyvinuté a do detailu popsané metodice použity v lesnické praxi. Mohou překlenout ekologickou nevýhodu tohoto druhu v našich podmínkách, kde se tento jeřáb nerozsemeňuje.^{†††} Na rozdíl od umělého výsevu ve školkách lze ověřenou nenáročnou mikropropagací klonovat.

Vývin kmene v prvním roce je u jedinců pocházejících z mikropropagace *Sorbus domestica* blízký vývinu semenáčů, zmíněnému v literatuře (Rohmeder 1951 non vidi, sec. Prudič 2000). Je to tedy metoda použitelná a lze doporučit návazný projekt zaměřený na srovnání ontogeneze a rhizologie vegetativně (mikropropagací) a generativě množených jedinců ve statisticky významných souborech.

Při mikropropagaci *Sorbus domestica* pomocí orgánových kultur lze zcela vynechat fázi zakořeňování in vitro, jestliže mikrořízky mají velmi vysokou vitalitu dosahovanou pomocí navržených kultur s pískovým nosičem. Tím se metoda podstatně zjednodušuje o jednu náročnou laboratorní operaci.

Orgánové kultury *Sorbus domestica* nelze přechovávat pomocí kryoprezervace, ale mohou doporučit inhibici růstu chladem. Tento způsob přechovávání absolvují kultury ve stavu olistěném a zcela zeleném. Tyto kultury lze přimět k opětovnému růstu in vitro, ale nelze je přímo používat k řízkování. Mikrořízky se zásadně odebírají z rostoucích a nikoli inhibovaných kultur.

^{†††} Neschopnost rozsemeňovat se je ovšem velkou výhodou při zavádění jeřábu oskeruše jako cenné dřeviny s vynikajícím vzhledem i kvalitním dřevem do krajiny. Introdukovaná dřevina se nemůže samovolně šířit, a proto nelze mít vážných námitek z hlediska ochrany přírody.

V neposlední řadě, ve vztazích k určitým ekologickým faktorům klonovaného materiálu in vitro, ať již diferencovaného nebo dediferencovaného, se prokázala často propastná odlišnost od obecné ekologie druhů. Ač to muselo být mnoha badateli v laboratořích pozorováno a akceptováno jako logická samozřejmost, zůstávalo to postulátem čili předpokladem bez důkazu. Na základě několika důkazů popsaných ve výsledcích mých experimentů tedy navrhuji pro badatelský směr zabývající se zvláštní ekologií při laboratorní mikropropagaci nový termín "laborekologie".^{***} Rozumí se jím ekologie v laboratorních podmínkách, ve kterých se mikropropagace uskutečňuje.

Literatura

- Adams, R. M., Koenigsberg, S. S. et Langhans, R. W. , 1979: In vitro propagation of *Cephalotus follicularis* (Australian pitcher plant). Hort. Sci 14: 512-513.
- Abdullah, R. et al.: Immature embryo: A useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. Electron. J. Biotechnol. [online]. Pontificia Univ. Catol. Valparaíso, 2005, vol.8, no.1 [citováno 27. července 2007].
Dostupné na: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582005000100006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-3458.
- Addicott, F. T. et Lyon, J. L., 1969: Physiology of abscisic acid and related substances.- Ann. Rev. Plant Physiol. 20: 139-164.
- Aderkas, P. et al., 2002: Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69: 111-120.
- Aderkas, P., Label, P. et Lelu, M. A., 2002: Charcoal effects development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. Tree Physiol. 22: 431-434 [non vidi].

^{***} Nabízející se termín "mikroekologie" je již vžitý pro ekologii bakteriální, a proto je pro daný případ nepoužitelný.

- Afele, J. C. et al., 1992: Somatic embryogenesis and plant-regeneration from zygotic embryo culture in blue spruce (*Picea pungens* Engelman). *Plant Cell. Rep.* 11: 299-303 [non vidi].
- Arrillaga, I., Marzo, T. et Segura, J., 1991: Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27: 341-348.
- Arrillaga, I., Marzo, T. et Segura, J., 1992: Embryo culture of *Fraxinus ornus* and *Sorbus domestica* removes seed dormancy. *HortScience* 27: 371.
- Arya, S., Kalia, R. K. et Arya, I. D., 2000: Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. *Plant Cell Rep.* 19: 775-780.
- Baebler, S. et al. 2005: Establishment of cell suspension cultures of yew (*Taxus x Media* Rehd.) and assessment of their genomic stability. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 338-343.
- Beckwith, C. R. et Goldfarb, B., 1991: Development of western spruce budworm on Douglas-fir callus tissue. *Research Note Pacif. Northwest Res. Stat. (PNW-RN-504)*, Portland, 5 s.
- Benson, E. E., 2000: Special symposium: In vitro recalcitrance: An introduction.- *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 36: 141-148.
- Bergmann B. A., Sun, Y. H. et Stomp, A. M., 1997: Harvest time and nitrogen source influence in vitro growth of apical buds from Fraser fir seedlings. *HortScience* 32: 125-128.
- Bhagwat, B. et Lane, W. D., 2004: In vitro shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweethart'. *Plant Cell Tiss. Cult.* 78: 173-181.
- Bhattacharya, J. et al., 2002: Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo explant of papaya (*Carica papaya* L. cv. Washington and Honey Dew). *Indian J. Exp. Biol.* 40: 624-627 [non vidi].
- Biroščíková, M. et al., 2004: Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.). *Plant Cell Rep.* 22: 640-644.
- Bonga, J. M., 2004: The effect of various culture media on the formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix decidua*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 43-48.

- Breton, D. et al., 2005: High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 494-504.
- Budimir, R et Vujičić, R., 1992: Benzyladenine induction of buds and somatic embryogenesis in *Picea omorica* (Pančič) Purk. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 31: 89-94.
- Conde, P., Loureiro, J. et Santos, C., 2004: Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell Rep.* 21: 632-639.
- Corredoira, E. et al. 2004: Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *Cryo Lett.* 25: 33-42 [non vidi].
- Corredoira, E. et al. 2005: Genetic transformation of *Castanea sativa* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hortic.* 693: 387-393.
- Corredoira, E., Vieitez, A. M. et Ballester, A., 2002: Somatic embryogenesis in elm. *Ann. Bot.* 89: 637-644.
- Corredoira, E., Vieitez A. M. et Ballester, A., 2003: Proliferation and maintenance of embryogenic capacity in elm embryogenic cultures. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39: 394-401.
- Cyhelský, L. (1967): *Statistika v příkladech*. Stát. Nakl. Tech. Literatury, Praha.
- Damiano, C. et Monticelli, S., In vitro fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection [online].- *Electronic Journal of Biotechnology* vol. 1, no.3, © 1998 by Universidad Católica de Valparaíso [citováno 22. dubna 2008].
Dostupné na: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/4/bip/>.
- David, H. et al., 1992: Evidence for early stages of somatic embryo development in a protoplast derived cell culture of *Prunus avium*. *Physiol. Plant.* 85: 301-307,
- Dodds, J. H. et Roberts, L. W., 1995: *Experiments in plant tissue culture*. 3rd. ed., Press Syndicate of the University of Cambridge, ISBN 0-521-47892-8, 256 s.
- Dunstan, D. I. et Bethune, T. D., 1996: Variability in maturation and germination from white spruce somatic embryos, as affected by age and use of solid or liquid culture. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 32: 165-170 [non vidi].
- Dyachok, J. V. et al., 2000: Rhizobial Nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. *Plant Cell Rep.* 19: 290-297.

- Find, J., Grace, L. et Krogstrup, P., 2002: Effect of anti-auxins on maturation of embryogenic tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). *Physiol. Plant.* 116: 231-237.
- Fink, C. V. M. et al, 1986: In vitro organogenesis from shoot tip, internode, and leaf explants of *Ulmus* x 'Pioneer'. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7: 237-245.
- Foster, G. S. et Diner A. M., ed., 1994: Applications of vegetative propagation in forestry. Proceedings of the Southern regional information exchange group biennial symposium on forest genetics, Huntsville, Alabama, July 8-10, 1992. Publ. South. Forest Exper. Station New Orleans.
- Gajdošová, A. et al., 1995: Induction, protein-composition and DNA-ploidy level of embryogenic calli of silver fir and its hybrids. *Biol. Plant.* 37: 169-176.
- Gajdošová, A., Múčková, M. et Šturdík, E., 2003: Produkcia taxánov kalusovými kultúrami tisú. *Nova Biotech.* III-1: 80-89.
- Gajdošová, A. et Vooková, B., 1991: Karyological study of *Abies* sp. callus culture. *Biológia* 46: 211-217.
- Garin, E., Grenier, E. et Grenier-De March, G., 1997: Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48: 83-91.
- Gartland, J. S. et al. 2001: Ri-plasmid mediated transformation and regeneration of *Ulmus procera* (English elm). *Plant Growth Regul.* 33: 123.129.
- Gorbatenko, O. et Hakman, I., 2001: Desiccation-tolerant somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. *Internat. Journ. Pl. Sci.* 162: 1211-1218 [non vidi].
- Grant, N. J. et Hammatt, N., 2000: Adventitious shoot development from wild cherry (*Prunus avium* L.) leaves. *New Forrests* 20: 287-295.
- Guevin, T. G. et Kirby, E. G., 1997: Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49: 219-222.
- Guevin, T. G., Micah, V. et Kirby, E. G., 1994: Somatic embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies balsamea*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37: 205-208.
- Gupta, P. K. et Durzan, D. J., 1985: Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Plant Cell. Rep.* 4: 177-179 [non vidi].

- Gutiérrez-Pesce, P. et al., 1998: Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 17: 574-580.
- Gutiérrez Pesce, P. et Rugini, E., 2004: Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock 'Colt' (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 79: 223-232.
- Gutmann, M. et al., 1996: Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journ. Exp. Bot.* 47: 1095-1917 [non vidi].
- Hammatt, N. et Grant, N. J., 1997: Micropropagation of mature British wild cherry. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47: 103-110.
- Hammatt, N. et Grant, N. J., 1998: Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* (wild cherry). *Plant Cell Rep.* 17: 526-530.
- Han, K. H. et Park, Y. G.: Somatic embryogenesis in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). In Jain, S. M., Newton, R. J. (eds.), *Embryogenesis in woody plants*, Kluwer Academic Publishers, 1999, vol. 5, s. 149-161.
- Harrison, M. A., 1997: Analysis of ethylene biosynthesis in plant tissue by GC/FID, in: Dashek, W. V. [ed.], *Methods in plant biochemistry and molecular biology*, chap. 12, CRC Press, Boca Raton, New York, 1997, ISBN 0-8493-9480-5.
- Harry, I. S. et Thorpe, T. A., 1991: Somatic embryogenesis and plant-regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. *Bot. Gaz.* 152: 446-452 [non vidi].
- Hausman, J. F., 2000: Poplar acclimation to cold during in vitro conservation at low non-freezing temperature: Metabolic and proteic changes. *Journ. Plant Physiol.* 157: 117-123.
- Hejný, S. et Slavík, B. [ed.] et al., 1988: *Květena České socialistické republiky 1.-* Academia, Praha.
- Hejný, S. et Slavík B. [ed.] et al., 1992: *Květena České republiky 3.* Academia, Praha, ISBN 80-200-0256-1.
- Hristoforoglu, K. et Schnidt, J. et Bolharnordenkampf H., 1995: Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40: 277-283.

- Hrib, J., Vooková B. et Kormuťák, A., 1997: Biochemical differences between normal callus and embryogenic suspensor mass of silver fir. *Biol. Plant.* 39: 507-513.
- Chalupa, V., 1983: Rychlé vegetativní množení některých listnatých lesních dřevin in vitro. *Lesnictví* 29: 309-320.
- Chalupa, V., 1986: Rozmnožování jehličnatých stromů in vitro. *Lesnictví* 32: 997-1010.
- Chalupa, V., 1988: Rozmnožování lípy (*Tilia cordata* Mill.), akátu (*Robinia pseudoacacia* L.) a jeřábu (*Sorbus aucuparia* L.) in vitro a růst stromů vypěstovaných in vitro. *Lesnictví* 34: 705-719.
- Chalupa, V., 1993: Rozmnožování modřínu (*Larix decidua* Mill.) orgánovými kulturami a růst stromů vypěstovaných in vitro. *Lesnictví* 39: 481-486.
- Chalupa, V., 1994: Použití biotechnologických metod pro rozmnožování a záchranu jilmů. *Lesnictví - Forestry*, 40: 507 - 512.
- Chalupa, V., 2000: Růst lesních stromů vypěstovaných in vitro z orgánových kultur a ze somatických embryí. *Les. Práce* 79: 498-501.
- Chalupa, V., 2003: In vitro propagation of *Tilia platyphyllos* by axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis.- *Journ. Forest Sci.* 49: 537-543.
- Chavez, V. M. et Litz, R. E., 2004: Organogenesis from megagametophyte and zygotic embryo explants of the gymnosperm *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58: 219-222 [non vidi].
- Chee, P. P., 1996: Plant regeneration from somatic embryos of *Taxus brevifolia*. *Plant Cell Rep.* 16: 184-187 [non vidi].
- Janssens, J., 1986: In vitro propagation of sundew, *Drosera regia* Stephens. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 51: 61-66.
- Jones, N. B., Vanstaden J. et Bayley, A. D., 1993: Somatic embryogenesis in *Pinus patula*. *Journ. Plant Physiol.* 142: 366-372.
- Josífko, M., 1971: Pravděpodobnost a matematická statistika pro biology.- Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 139 s.
- Kärkönen, A., 2001: Plant tissue cultures as models for tree physiology: somatic embryogenesis of *Tilia cordata* and lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies. Academic dissertation, Faculty of Science, Univ. Helsinki, 89 s.

- Khelifi, S. et Tremblay, F. M., 1995: Maturation of black spruce somatic embryos. 1. Effect of L-glutamine on the number and germinability of somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41: 23-32.
- Kim, Y. W. et al., 1998: Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55: 95-101.
- Klimaszewska, K. et al., 2001: Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 392-399 [non vidi].
- Kobliha J., 2000: Novošlechtění jedle (*Abies* spp.). Závěrečná zpráva projektu NAZV EP 7136. ČZU, Praha.
- Kobliha, J., 2002: Wild cherry (*Prunus avium* L.) breeding program aimed at the use of this tree in the Czech forestry. *Journ. Forest Sci.* 48: 202-218.
- Kobliha, J. et Janeček, V., 2001a: Šlechtění třešně ptačí v Evropě. *Les. Práce* 80: 255-257.
- Kobliha, J. et Janeček, V., 2001b: Šlechtění třešně ptačí v ČR. *Les. Práce* 80: 391-392.
- Kormuťák, A. et Vooková, B., 2001a: Early growth characteristics of some *Abies* hybrids. In: Muller-Starck, M. et Schubert, R. [eds.], *Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions* Kluwer Academic Publishers, London-Dordrecht-Boston-London, 331-338 [non vidi].
- Kormuťák, A. et Vooková, B., 2001b: Peroxidase activity in non-embryogenic and embryogenic calli and in developing somatic embryos of white fir (*Abies concolor* Gord. et Glend). *Plant Biosyst.* 135: 101-105 [non vidi].
- Kormuťák, A., Vooková B. et Salajová, T., 1997: Serological study on non-embryogenic and embryogenic calli of the European black pine (*Pinus nigra* Arn) and silver fir (*Abies alba* Mill). *Journ. Appl. Bot.* 71: 108-110 [non vidi].
- Krajnáková, J., 1997: Callogenesis of anther cultures of *Ulmus glabra* Huds. *Lesnictví* 43: 110-116 [non vidi].
- Krüssmann, G., 1983: *Handbuch der Nadelgehölze*. 2. ed. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, ISBN 3-489-62622-2.
- Kubát, K.: Jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.) v sz. Čechách. *Electron. J. Biotechnol.* [online]. Katedra biologie PF UJEP v Ústí n. L., © 2005-2007 [citováno 27. září 2007]. Dostupné na: http://biology.ujep.cz/cs/vyzkumni_cinnost/oskeruse.html.

- Kubíková, J., 1971: Geobotanické praktikum. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 186 p.
- Kvaalen, H. et al., 2005: Somatic embryogenesis for plant production of *Abies lasiocarpa*. Can. Journ. Forest Res. 35: 1053-1060 [non vidi].
- Kyte, L. et Kleyn, J., 1996: Plants from test tubes. 3rd ed., repr. 1999, Timber Press, Inc., Portland, ISBN 0-88192-361-3, 240 s.
- Label, P. et Lelu, M.-A., 2000: Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) somatic embryos. Physiol. Plant. 109: 456–462.
- Lall, S., Mandegaran Z. et Roberts, A. V., 2006: Shoot multiplication and adventitious regeneration in *Sorbus aucuparia*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 85: 23-29.
- Li, X. Y., Huang, F. H. et Gbur, E. E., 1997: Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in lobolly pine (*Pinus taeda* L.). Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 33: 184-189 [non vidi].
- Libiaková, G. et al., 1995: Karyological study of *Abies concolor* x *Abies grandis* calli and shoots regenerated in vitro. Biológia 50: 61-64.
- Libiaková, G. et Gajdošová, A., 1993: Karyological analysis of the long-term cultivated *Abies* sp. calli. Biológia 48: 93-94.
- Linsmaier, E. M. et Skoog, F., 1965: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.
- Litz, R. E., Moon, P. A. et Chavez Avila, V. M. 2005. Somatic embryogenesis and regeneration of endangered cycad species. Acta Hort. (ISHS) 692:75-80. [non vidi]
- Malá, J. et al., 1999: Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých dřevin. Zprávy Les. Výzk. 44/4: 6-10.
- Malá, J. et al., 2002: Reprodukce ohrožených populací třešně ptačí (*Prunus avium*) in vitro.- Zpr. Lesnic. Výzk., fasc. 47/1: 5-8.
- Malá, J. et al., 2005: Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots. Biol. Plant. 50: 8-14.
- Malá, J. et Chalupa, V., 1986: Pěstování aseptických kultur smrku (*Picea abies* L.) a douglasky (*Pseudotsuga menziesii* /Mirb./ Franco) in vitro. Práce VÚLHM 69: 61-83.

- Malá, J. et Chalupa V., 1987: Vegetativní rozmnožování douglasky *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Lesnictví 33: 525-532.
- Malá, J. et Šíma, P., 2004: Lesní šlechtitelství na začátku 21. století. Živa 2004: 242-244.
- Mandegaran, Z., Roberts, A. V. et Hammatt, N., 1999: The ability of *Prunus avium* x *P. pseudocerasus* 'Colt' to form somatic embryos in vitro contrasts with the recalcitrance of *P. avium*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59: 57-63.
- Mathur, G., 2001: Morphogenetic studies of two Indian pines in vitro: *Pinus roxburghii* Sarg. and *Pinus wallichiana* A. B. Thesis, National chemical laboratory Pune – 411 008, University of Pune, 137 s.
- Matt, A. et Jehle, J. A., 2005: In vitro plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). Plant Cell Rep. 24: 468-476.
- Mauleová, M., Vítámvás, J. et Tušek, Z., 2004: Rozmnožování významných druhů listnatých stromů technikami in vitro. Zpr. Les. Výzk. 49: 3-6.
- Meloun, M. et Militký, J., 2004: Statistická analýza experimentálních dat. Ed. 2.- Academia, Praha, ISBN 80-200-1254-0, 953 s.
- Miko, M., Gažo, J. et Biroščíková, M., 2004: In vitro klonové množenie genetických zdrojov jarabiny oskorušovej (*Sorbus domestica* L.) z územia Slovenska. Acta Fytotech. Zootech. 7: 85-89.
- Minocha, R. et al., 1993: Polyamides in embryogenic cultures of Norway spruce (*Picea abies*) and red spruce (*Picea rubens*). Tree Physiol. 13: 365-377.
- Mo, L. H. et Arnold, S., 1991: Origin and development of embryogenic cultures from seedlings of Norway spruce. Journ. Plant Physiol. 138: 223-230.
- Moore, T. C., 1989: Biochemistry and physiology of plant hormones. 2nd ed. Springer-Verlag, New York, ISBN 0387904018.
- Mott, R. L., Thomas, H. A. et Namkoong, G., 1978: In vitro rearing of southern pine beetle larvae on tissue-cultured loblolly pine callus. Annals of Entomology Society of America. 71: 564-566 [non vidi].
- Muna A.-S. et al., 1999: In vitro propagation of semi-dwarfing cherry rootstock. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59: 203-208.

- Murashige, T. et Skoog, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Ndoye, M., Diallo, I. et Gassamba/Dia, Y. K., 2003: In vitro multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *Afr. Journ. Biotech.* 2: 421-424.
- Nordgaard, J. V., 1997: Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Sci.* 124: 211-221 [non vidi].
- Nordgaard, J. V. et Krogstrup, P., 1991: Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Cell Rep.* 9: 509-513 [non vidi].
- Novák, F. A., 1961: Vyšší rostliny Tracheophyta. Nakl. Českosl. Akad. Věd, Praha.
- Oluwaseun A. S. et Erhinmeyoma A. B., 2005: Induction of callus and somatic embryogenesis from cotyledon explants of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *Afric. Journ. Biotech.* 4: 68-71.
- Opatrný, Z., 2007: Z každé buňky nový organismus. Regenerační kompetence rostlin, *Živa* 2007: 53-56.
- Osterc, G., Luthar, Z. et Štampar, F., 2004: The importance of the sterilization procedure for producing vigorous cherry plants (*Prunus* sp.) in vitro. *Acta Agric. Sloven.* 83: 45-51.
- Paganová, V., 2008: Ecological requirements of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] CRANTZ.) and service tree (*Sorbus domestica* L.) in relation with their utilization in forestry and landscape.- *J. For. Sci.* 54: 216-226.
- Park, Y., 2002: Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59: 651-656.
- Percy, R. E., Klimaszevska, K. et Cyr, D. R., 2000: Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. *Can. J. Forest Res.* 30: 1867-1876 [non vidi].
- Piagnani, C. et Bassi, D., 2000: Aspetti de la propagazione di *Sorbus* spp.- *Italus-Hortus* 7: 3-7.
- Podrázský, V., Remeš, J. et Karnet, P., 2002: Hodnotová produkce a půdotvorná funkce třešně ptačí. *Les. Práce* 81: 255-257.
- Podrázský, V. et al., 2002: Porostotvorná funkce třešně ptačí. *Les. Práce* 81: 213-215.

- Prknová, H., 2004: Optimalizace kultivačních podmínek při mikropropagaci jeřábu krkonošského (*Sorbus sudetica*) pro účely záchrany fytofenofonu v imisní oblasti Krkonošského národního parku.- Dipl. Pr., ČZU v Praze, Fakulta lesnická a environmentální, 56 s.
- Prknová H., 2007: The use of silica sand in micropropagation of woods.- Journ. Forest Sci. 53: 88-92.
- Procházka, S. et al., 2003: Fyziologie rostlin. Academia, Praha, ISBN 80-200-0586-2, 484 s.
- Prudič, Z., 1998: Růst a rozšíření *Sorbus domestica* L. a *Sorbus torminalis* (L.) Crantz v Moravských Karpatech.- Lesnictví 44: 32-38.
- Prudič, Z.: Pěstování jeřábu břeku a oskeruše. Lesnická práce 2000/7 [online].
Silvarium.cz. [citováno 25. září 2008]. Dostupné na:
<http://lesprace.silvarium.cz/content/view/1538/139/>.
- Přehled registrovaných přípravků na ochranu rostlin 2008.- vyd. Česká společnost rostlinolékařská, Praha, ISBN 978-80-02-01992-3, 350 pp.
- Purohit, S. D., Singhvi, A. et Nagori, R., 2004: In vitro shoot bud differentiation from leaf segments of *Achras sapota*. Biol. Plant. 48: 109-112 [non vidi].
- Rajbhandari, N. et Stomp, A. M., 1997: Embryogenic callus induction in Fraser fir. HortScience 32: 737-738.
- Ramarosandratana, A. V. et Staden, J., 2003: Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 74: 249-255.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. et Acosta-Dueñas, B., 1996: Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46: 85-87.
- Rodríguez-Garay, B. et Rubluo, A., 1992: In vitro morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Bodecker). Cact. Succ. J. 64: 116-119.
- Roth, R., Ebert, I. et Schmidt, J., 1997: Trisomy associated with loss of maturation capacity in long-term embryogenic culture of *Abies alba*. Theor. Appl. Genet. 95: 353-358.

- Saiprasad, G. V. S., 2001: Artificial seeds and their applications.- Resonance 2001/5: 39-47.
- Salaj, T. et Salaj, J., 2004: Somatic embryo formation on mature *Abies alba* x *Abies cephalonica* zygotic embryo explants. Biol. Plant. 47: 7-11.
- Salajová et al., 1996: Embryogenic culture initiation and somatic embryo development in hybrid firs (*Abies alba* x *Abies cephalonica*, and *Abies alba* x *Abies numidica*). Plant Cell Rep. 15: 527-530.
- Salajová, T. et Salaj, J., 2001: Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon explants isolated from emblings and seedlings of hybrid firs. Journ. Pl. Physiol. 158: 747-755 [non vidi].
- Salajová, T. et Salaj, J., 2005: Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: embryogenic tissue initiation, maturation and regeneration ability of established cell lines. Biol. Plant. 49: 333-339.
- San José, M. C. et al., 2005: Cryopreservation of European chestnut germplasm. Acta Hortic. 693: 225-231 [non vidi].
- Shevade, A. et Preece, J. E., 1993: In vitro shoot and floral organogenesis from stamen explants from *Rhododendron* PJM group clone. Scient. Hortic. 56: 163-170.
- Schenk, R. U. et Hildebrandt, A. C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.
- Schuller, A., Kirchner-Neß R. et Reuther, G., 2000: Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60: 23-31.
- Schuller, A. et Reuther, G., 1993: Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. Plant Cell Rep. 12: 199-202 [non vidi].
- Singh, A. K. et Chand, S., 2003: Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timer-yelding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. Journ. Plant Physiol. 160: 415-421 [non vidi].
- Skořepa, H., 2006a: Jedle bělokorá v našich lesích. Živa 2006: 108-110.
- Skořepa, H., 2006b: Jak podpořit návrtá jedle bělokoré? Živa 2006: 205-206.

- Studnička, M., 1989: Studie kriticky ohroženého druhu *Pinguicula bohemica* se zřetelem na možnosti jeho záchrany.- ms. [kandid. disert. práce, depon. in: Bot. ústav AV ČR Průhonice], 185 s..
- Stuppy, W. et Nagl., W., 1992: Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10: 85-88.
- Svoboda, P., 1953: Lesní dřeviny a jejich porosty. Státní zemědělské nakladatelství.
- Taber, R. P., Zhang, C. et Hu, W. S., 1998: Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Can. J. Bot.* 76: 863-871.
- Tang, H. et al., 2002: Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Scient. Hortic.* 93: 235-244.
- Tang, W. et Newton, R. J., 2005: Micropropagation through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures derived from mature embryos of Christmas tree species. *Propag. Ornament. Plants* 5: 59-66 [non vidi].
- Tanimoto, H. et Kagi, T., 1994: Effect of supporting materials on the growth and regeneration of *Begonia x hiemalis* cultured in vitro.- *Journ. Japan. Soc. Hortic. Sci* 62: 839-844 [non vidi].
- Theilade, I. et Petri, L., 2003: Conservation of tropical trees ex situ through storage and use. *Guidelines and Technical Notes* 65: 1-15, [Danida Forest Seed Centre, Humleback, Denmark].
- Thompson, R. G. et Aderkas, P., 1992: Somatic embryogenesis and plant-regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell Rep.* 11: 379-385 [non vidi].
- Trigiano, R. N. et al., 1989: Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.* 150/1: 72-77 [non vidi].
- Valle, T. et al., 1997: Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant Sci.* 125: 97-101.
- Vassar, V., 2003: Effect of ascorbic acid and citric acid on ex vitro rooting and acclimatization of *Prunus avium* L. microshoots.- *Acta Hortic.* 2003: 251-254.
- Větvíčka., V., 1999: Evropské stromy. Aventinum, Praha, ISBN 80-7151-182-X

- Vicient, C. M. et Martínez, F. X., 1998: The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. *Rev. Brasil. Fisiol. Veg.* 10: 1-12.
- Vidal, N. et al., 2005: Cryopreservation of chestnut by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 63-68.
- Vieitez, A. M., Ferro, E. M. et Ballester, A., 1993: Micropropagation of *Fagus sylvatica* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 29: 183-188 [non vidi].
- Vooková, B., Gajdošová, A. et Matúšová, R., 1998: Somatic embryogenesis in *Abies alba* x *Abies alba* and *Abies alba* x *Abies nordmanniana* hybrids. *Biol. Plant.* 40: 523-530.
- Vooková, B. et Kormuťák, A., 2001: Effect of sucrose concentration, and indole-3-butyric acid on germination of *Abies numidica* somatic embryos. *Biol. Plant.* 44: 181-184.
- Vooková, B., Kormuťák, A. et Hrib, J., 2001: Effect of myo-inositol on somatic embryogenesis of *Abies numidica*. *Journ. Appl. Bot. – Angew. Bot.* 75: 46-49.
- Vooková, B. et Kormuťák, A., 2003: Plantlet regeneration in *Abies cilicica* Carr. and *Abies cilicica* x *Abies nordmanniana* hybrid via somatic embryogenesis. *Turk. J. Bot.* 27: 71-76.
- Vooková, B. et Kormuťák, A., 2004: Propagation of some *Abies* species by somatic embryogenesis. *Acta Univ. Latvien., Biol.*, 676: 257-260.
- Vooková, B. et Kormuťák, A., 2006: Comparison of induction frequency, maturation capacity and germination of *Abies numidica* during secondary somatic embryogenesis. *Biol. Plant.* 50: 785-788.
- Walton, D. C., 1980: Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 453-489.
- Ziv, M., 2000: Bioreactor technology for plant micropropagation. *Hortic. Rev.* 24: 1-30.