

Netradičné metódy rozmnožovania drevín pomocou explantátových kultúr

Rozvojom urbanizovaných a priemyselných oblastí sa postupne zhoršuje životné prostredie, čo negatívne pôsobí na základné životné funkcie drevín, vrátane ich rozmnožovania. Popri fyzikálnochemickom pôsobení na jednotlivé orgány, môžu sa prejavíť aj príznaky znižovania reprodukčných schopností, najmä zníženie produkcie semien a ich klíčivosti.

Aj keď existujú mnohé spôsoby eliminácie negatívnych účinkov zhoršeného životného prostredia, do centra pozornosti sa v súčasnosti dostávajú možnosti regenerácie drevín pomocou explantátových kultúr. V tvorbe a ochrane životného prostredia sa využívajú najmä:

- pri záchrane a reprodukcii genofondu drevín so zameraním na oblasti postihnuté priemyselnými imisiami,
- v šľachtiteľských programoch zameraných na zvýšenie odolnosti drevín voči zhoršenému životnému prostrediu,
- pri záchrane a reprodukcii genofondu populácií ohrozených hromadným hynutím.

Explantátové kultúry predstavujú komplex perspektívnych metód pestovania rastlín v podmienkach in vitro. V súčasnosti sa im venuje veľká pozornosť, pretože môžu výrazne prispieť k zvýšeniu produkčných schopností drevín. Napriek množstvu experimentálnych výsledkov získaných v oblasti explantátových kultúr nemožno ich zovšeobecňovať, pretože existujú značné rozdiely v požiadavkách na pestovanie jednotlivých druhov alebo kultivarov drevín. K množstvu faktorov, ktoré ovplyvňujú proces regenerácie drevín, patrí okrem genotypu aj vek a fyziologický stav dreviny, z ktorej sa primárny explantát odobral, veľkosť explantátu, miesto a čas odberu, zloženie kultivačného média a ďalšie (Kamenická, Rypák, 1989). Vo výskume explantátových kultúr v oblasti rozmnožovania drevín sa v súčasnosti sústreďuje pozornosť hlavne na:

- mikropropagáciu (množenie rastlín pomocou menších častí) z aspektu zvýšenia produkčného potenciálu,
- zvýšenie odolnosti proti chorobám a nepriaznivým vplyvom prostredia,
- somatickú embryogenézu,
- dlhodobé uchovávanie explantátov kryokonzerváciou, ako základ pre budovanie genobáň vzácnych, ustupujúcich alebo vysokoprodukčných druhov a ich hybridných foriem,
- vzdialenú hybridizáciu a genetické manipulácie, vrátane genového inžinierstva,
- možnosť indukcie tvorby haploidných a polyploidných rastlín využitím premenlivosti rastlinných pletív.

S prihliadnutím na tieto smery sa výskum v oblasti rastlinných explantátov v Arboréte Mlyňany - Ústave

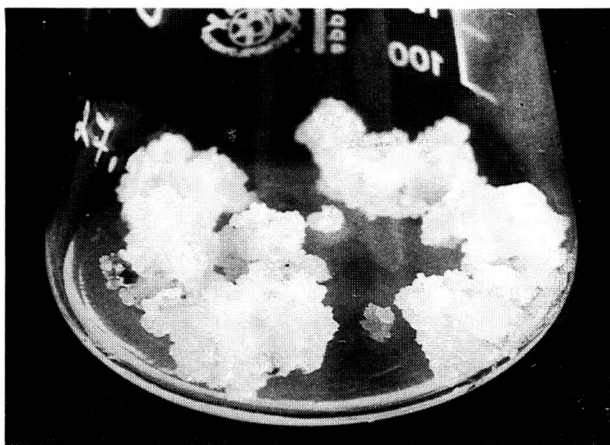
endrobiológie SAV zameriava na rozpracovanie metód mikropropagácie niektorých introdukovaných a domácich drevín tak, aby výsledky rozšírili základné poznatky nielen o regulačných mechanizmoch a biologických zákonitostiach priebehu rastových procesov, ale aj obnovy celistvosti drevín v podmienkach in vitro. Výskum sa v súčasnosti orientuje hlavne na metódy mikropropagácie vzácnych, ťažko zakoreňujúcich alebo ohrozených druhov drevín. Tieto metódy sú aktuálne najmä vzhľadom na sústavné zhoršovanie životného prostredia, čo súvisí s poklesom ich reprodukčnej schopnosti. Objektom výskumu sú: gaštan jedlý (*Castanea sativa* Mill.), pagaštan konský (*Aesculus hippocastanum* L.), magnólia soulangeová /*Magnolia x soulangeana* (Soul.), smrekovec opadávy (*Larix decidua* Mill.), tuja mlyňanská (*Thuja occidentalis* L. cv. *malonyana*), borovica lesná (*Pinus silvestris* L.), borovica Armondova (*Pinus armandii* Franch.), borovica Bungeova (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.), borovica Banksova (*Pinus banksiana* Lamb.) a borovica trpasličia (*Pinus pumila* /Pall./ Regel).

Využitie explantátových kultúr možno rozdeliť do dvoch skupín, ktoré zahŕňajú: 1. techniky zachovávajúce pôvodný genotyp (meristémové kultúry, embryokultúry), 2. techniky zvyšujúce genetickú variabilitu (kalusové, bunkové a protoplastové kultúry).

V súčasnosti medzi najviac prepracované patria kalusové a orgánové kultúry.

Kalusové kultúry

Kalusovú kultúru možno indukovať z každého pletiva. Pri jej odvodení z púčikov pagaštana konského (*Aesculus hippocastanum* L.) sa potvrdilo, že významnú úlohu má zloženie kultivačného média (obr. 1). Odvodená primárna kultúra sa pestuje na médiách s pridaním rôznych koncentrácií auxínov a cytokinínov, ktoré ovplyvňujú nielen jej rast a štruktúru, ale sú rozhodujúce aj pre priebeh morfogénzy (Rypák, Kamenická, 1986). Okrem regenerácie rastlín pomocou organogénzy môžu rastlinné embryá regenerovať in vitro aj cestou somatickej embryogenézy. Táto metóda je zvlášť per-



1. Kalusová kultúra pagaštana konského (*Aesculus hippocastanum* L.) po 28 dňoch pestovania na médiu s obsahom auxínov

2. Zakorenené výhonky magnólie soulangeovej (*Magnolia x soulangeana* Soul.)



3. Zakorenené výhonky rododendróna žltého (*Rhododendron luteum* L.)



spektívna pre šľachtenie drevín. Výsledky, ktoré sa získali pri pestovaní nedozretých embryí borovice (*Pinus abies* L.), smrekovca opadavého (*Larix decidua* Mill. (Nagmani, Bonga, 1985), ako aj pri listnatých drevinách (Merkle, Sommer, 1986; Ostrolucká, Preťová, 1991), sú veľmi nádejné. Ešte však chýba veľa poznatkov o jednotlivých etapách využitia týchto techník, ale aj ďalších biotechnologických postupov v šľachtiteľských programoch zameraných na zvýšenie odolnosti drevín.

Orgánové kultúry

Ďalšou, pomerne široko rozpracovanou metódou regenerácie drevín, sú orgánové kultúry. Pokiaľ vychádzajú z meristémov, vyznačujú sa genetickou stabilitou potomstva. Skúmali sme možnosti regenerácie pagaštana konského (*Aesculus hippocastanum* L.) z vrcholových púčikov, aktinídie význačnej (*Actinidia arguta* Sieb. et zucc. /Miq.) a aktinídie čínskej (*A. chinensis* Planch.) z pazušných púčikov, gaštana jedlého (*Castanea sativa* Mill.), tuje mlyňanskej (*Thuja occidentalis* L. cv. *malonyana*), borovice lesnej (*Pinus silvestris* L.), borovice Armandovej (*P. armandi* Franch.) a smrekovca opadavého (*Larix decidua* Mill.) z izolovaných embryí (obr. 2, 3, 4). Z hľadiska indukcie organogenézy zohrávajú dôležitú úlohu koncentrácia, druh a dĺžka pôsobenia rastových regulátorov a fyzikálne faktory kultivačného prostredia (najmä svetlo a teplota). Explantáty sa navzájom odlišujú v citlivosti voči exogénne aplikovaným rastovým regulátorom, z čoho vyplýva aj ich rozdielna morfogénna aktivita.

Organogenéza (tvorba a rast orgánov) ihličnatých drevín vychádza prevažne z juvenálnych pletív. Pri kultivácii starších výhonkov gaštana jedlého sme pozorovali zvýšenú produkciu polyfenolov a postupné nekrotizovanie až usychanie vrcholových apexov. Menšie výhonky (do 15 mm) mali sklon k zvýšenej tvorbe kalusu, čím sa inhibovala tvorba koreňov. Výsledky potvrdili, že najvhodnejším primárnym explantátom pre kultiváciu tuje mlyňanskej, smrekovca opadavého, borovice lesnej a borovice Banksovej sú kľúčne listy semenáčikov dopestovaných v aseptických podmienkach (Debreceniová, Krajčová, 1991). Naproti tomu pre pestovanie borovice Bungeovej a borovice trpasličej sú vhodnejšie celé embryá izolované zo semien po studenej stratifikácii (skladovanie pri teplote 5 °C počas 2-3 týždňov vo vlhkej zmesi rašeliny a piesku). Najmenej vhodným materiálom na odber primárnych explantátov uvedených druhov ihličnatých drevín sú segmenty hypokotylu a izolované ihlice semenáčikov. Vzhľadom na rozmnožovanie mnohých druhov drevín, ktoré sú nielen súčasťou zelene v mestskom prostredí, ale sú aj významnými ovocnými a lesnými drevinami, považujú sa metódy rozmnožovania *in vitro* v súčasnosti za zvlášť aktuálne. Dosiachnutie vysokého koeficientu rozmnožovania a kvality dopestovaných regenerantov závisí nielen od druhu drevín, ale aj od zloženia média, v ktorom hrá dôležitú úlohu

4. Dopestované regeneranty aktinídie čínskej (*Actinidia chinensis* Planch.) v podmienkach in vitro

optimálna koncentrácia rastových regulátorov. Pri dlhodobom pestovaní explantátov na médiách s vysokým obsahom cytokinínov nielenže klesá počet a intenzita rastu výhonkov, ale objavujú sa aj príznaky straty chlorofylu. Odlišný fyziologický účinok majú rastové regulátory zo skupiny auxínov alebo gibberelínov. Na indukciu adventívnych púčikov je nevyhnutná prítomnosť cytokinínov, naproti tomu vyššia prítomnosť auxínov (kyselina β -indolylmaslová) v zakoreňovacom médiu podporuje tvorbu koreňov (obr. 5, 6). Pri testovaných druhoch sme pozorovali aj nerovnomerný rast a vývin explantátov počas ich pestovania na rovnakých médiách. Predpokladáme, že tieto rozdiely vyplývajú z odlišnej endogénnej hladiny rastových regulátorov. Dôležitou etapou, od ktorej závisí úspech regenerácie, je prechod regenerantov z podmienok in vitro do podmienok in vivo. Rastliny dopestované in vitro majú určité anatomické a morfológické zvláštnosti, nemajú kutikulu, čím sa znižuje intenzita transpirácie, majú znížený podiel palisádového parenchýmu v listoch a heterotrofný spôsob výživy. Takéto rastliny sa musia adaptovať na zmenené podmienky prostredia tým, že sa udržiavajú pri vyššej vlhkosti a chránia pred priamymi slnečnými lúčmi. Začiatok ich rastu súvisí s ukončením procesu adaptácie.

S prihliadnutím na doterajšie výsledky, ktoré sa dosiahli v kultúrach in vitro pri regenerácii drevín, možno ich oprávnené považovať za veľmi perspektívne. Nie sú len potenciálnym zdrojom rozmnožovania drevín v obnove iesa, ale môžu sa dobre uplatniť aj v produkcii a šľachtení drevín pre oblasti so zhoršeným životným prostredím, kde sú klasické metódy obmedzené.

Literatúra

- Debreceniová, M., Krajčová, D., 1991: Reakcia vybraných druhov rodu *Pinus* na kultiváciu v in vitro systéme. *Lesnícky časopis* (v tlači)
- Kamenická, A., Rypák, M., 1989: Explantáty v rozmnožovaní drevín. *Acta dendrobiologica*, 158 pp.
- Merkle, S. A., Sommer, H. E., 1986: Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera*. *Can. J. For. Res.*, 16, p. 420-422.
- Nagmani, R., Bonga, J. M., 1985: Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can. J. For. Res.*, 15, p. 1088-1091.
- Ostrolucká, M. G., Preťová, A., 1991: The occurrence of somatic embryogenesis in the species *Quercus cerris* L. *Biológia (Bratislava)* 46, p. 9-14.
- Rypák, M., Kamenická, A., 1986: Organogéza gaššana jedlého (*Castanea sativa* Mill.) v podmienkach in vitro. *Lesníctví*, 32, 897-904.



5. Predlžovací rast výhonkov borovice trpasličej (*Pinus pumila* (Pall./Regel) na médiu s obsahom aktívneho uhlia



6. Izolovaný výhonok borovice Banksovej (*Pinus banksiana* Lamb.) na zakoreňovacom médiu

