

Lesní šlechtitelství na začátku 21. století

Jana Malá, Petr Šíma

Lesní společenství je po korálovém útesu považováno za nejkompexnější a biologicky nejvíce rozrůzněný ekosystém. Lesy evropského mírného pásma poskytují životní prostor pro nezměrný počet druhů životních forem: mikroskopický edafon, rostliny, bezobratlé i obratlovce. Rozsáhlá průmyslová odvětví jsou doposud závislá na produktech, které lesní ekosystémy poskytují. Výzvou pro začínající 21. století je zachování druhové pestrosti lesních biocenóz. Je třeba v širokém měřítku zabezpečit reprodukci lesnických významných druhů a vyšlechtěných odrůd. V současné době lze pro tyto účely efektivně využít množení *in vitro* (mikropropagace), které je v mnoha případech jediným možným způsobem záchrany ohrožených rostlinných druhů.

Historie mikropropagace

Vědecké opodstatnění pro vývoj buněčných a tkáňových kultur rostoucích mimo prostředí živého organismu, tj. v podmínkách *in vitro*, vychází ze dvou základů: buněčné teorie M. J. Schleidena (1838) a T. Schwana (1839), podle níž mají jednotlivé buňky organismu „schopnost nezávislého života“, a darwinovské koncepce hormonální regulace rostlinného růstu (1880). Během 2. poloviny 19. stol. byly tyto teorie podpořeny sporadickými pozorováními tvorby kalusu a adventivních pupenů v místech poranění rostlinného pletiva. Předpokládalo se, že na rozdíl od živočišných buněk jsou rostlinné somatické buňky totipotentní, což znamená, že i u terminálně diferencovaných buněk (s ukončeným vývojem) lze vyvolat morfogenetické procesy, které ve vhodných podmínkách vedou k regeneraci zcela vyvinuté a životaschopné rostliny.

V r. 1893 se podobnou problematikou zabýval C. Reehinger, avšak kultivaci izolovaných částí rostlin v živých médiích popsal až v r. 1902 G. Haberlandt. Jeho pokusy však nebyly zcela úspěšné, protože používal příliš jednoduché živné médium.

V 30. letech 20. stol. byla izolována první přirozeně se vyskytující rostlinná růstová látka — auxin, kyselina indolyl-3-oxová — a byly popsány její účinky na růst (Živa 2001, 3: 105–106). Teprve tento objev vzbudil zájem vědců a odstartoval systematický výzkum. P. White ve Spojených státech (indukce růstu kořenů u kalusu tabáku), R. Gautheret a P. Nobécourt ve Francii (indukce růstu kořenů u kalusu mrkve) začali své proslulé pokusy s buněčnými kulturami a organogenezi *in vitro*, jejichž klíčové výsledky publikovali prakticky současně, v rozmezí šesti týdnů v r. 1939. Toto datum lze proto považovat za skutečný začátek kultivace rostlinných pletiv a buněk v podmínkách *in vitro*.

V této souvislosti je třeba zmínit ještě jeden důležitý objev. O několik let dříve (1934) si P. White povšiml, že se v nově vytvářejících kořenech v kulturách nevyskytují virové částice, z čehož usoudil, že do buněk dělivého pletiva (meristému) virová infekce neproniká. V r. 1952 G. Morel využil kořenových meristematických kultur nejen pro eliminaci viru, ale později (1960) i pro zavedení mikropropagačních kultur, na jejichž základě dnes stojí veškeré celosvětově využívané technologie množení *in vitro*

(mikropropagace). Nedílnou měrou se na tom podílel také objev cytokininů a poznání F. Skooga a C. O. Millera (1957), že různými kombinacemi auxinů a cytokininů lze řídit regenerační schopnost *in vitro* kultivovaných rostlinných pletiv a buněk. Návazně na tyto výzkumy popsali v r. 1958 J. Reinert v Německu a F. Steward v USA tvorbu somatických embryí z kalusů a buněčných suspenzních kultur mrkve.

I když bylo zřejmé, že rostliny lze takto regenerovat, jednoznačný důkaz o totipotentnosti rostlinné buňky přinesly až práce I. K. Vasilá a A. C. Hildebrandta (1965), kterým se podařilo z jednotlivých izolovaných buněk vypěstovat kompletní rostliny tabáku. V té době byly ve větším měřítku rozmnožovány *in vitro* hlavně dvouděložné rostliny (luštěniny).

Jehličnany byly využity pro studie růstu *in vitro* jako jedny z prvních rostlin, i když ojedinele. V r. 1924 studoval A. Schmidt růst embryí v kultuře u několika druhů borovic (*Pinus*) a o 10 let později již zmíněný R. Gautheret sledoval vývoj a cytologii kalusu z kambialních explantátů borovice hvězdovité (*P. pinaster*). Obnovený zájem o mikropropagaci konifer vzbudila až práce E. Balla, který v r. 1950 publikoval své studie o indukci morfogenetických pochodů v kalusu sekvoje vždyzelené (*Sequoia sempervirens*). Od té doby se této problematice věnují desítky laboratorů téměř po celém světě. V polovině 90. let 20. stol. se postupy klonového množení různých druhů rostlin už zabývalo přes 500 pracovišť (komerčních i výzkumných) ve 23 evropských státech, nejvíce v Německu (71), Velké Británii (49), Holandsku (45) a v ČR (21).

Postupy mikropropagace

Explantátové kultury

Jako explantáty se označují různé typy *in vitro* kultivovaných rostlinných částí. Zdrojem explantátů může být prakticky jakákoliv část rostliny (tab. 1). Většinou to jsou menší části (propagula), které se při klasickém vegetativním způsobu množení (řízkování, roubování) nedají použít. Množení v kulturách *in vitro* je podmíněno vypracováním vhodných postupů umožňujících navodit v primárním explantátu tvorbu a růst orgánů a následnou regeneraci kompletní rostliny (organogeneze, viz obr.), anebo vytváření embryí ze somatických buněk a jeho další vývoj v životaschopnou rostlinu (somatická embryogeneze, viz obr.).

Úspěšnost organogeneze i somatické embryogeneze závisí na:

- volbě vhodného dárce (stáří, fyziologický stav), době sběru, způsobu a délce skladování zdrojového materiálu a výběru a technice zpracování explantátů;
- přenosu explantátu do sterilního prostředí *in vitro*. Rostlinný materiál bývá v různé míře kontaminován patogenními mikroorganismy, které jsou částou příčinou pozdějšího uhynutí explantátu. Musí se vyzkoušet takový sterilizační postup, aby byl dostatečně účinný a co nejméně narušil rostlinná pletiva;
- nalezení optimálních kultivačních podmínek, které vyhovují odlišným růstovým požadavkům jednotlivých druhů. Rozumí se tím chemické složení živného média, kultivační teplota, délka a intenzita osvětlení;

Demonstrační plocha s výsadbou *in vitro* vypěstovaných třešňových ptáčků (*Prunus avium*)



- stanovení podmínek pro aklimatizaci dospělostých kompletních rostlin před jejich vysazením do venkovního stanoviště.

Vznik a vývoj nové rostliny

Podstatou organogeneze je vyvolání diferenciálních a morfogenetických procesů v rostlinných pletivech růstovými faktory obsaženými v indukčním živném médiu. Vhodným zdrojovým materiálem jsou zvláště meristemická pletiva pupenů odebíraných v době vegetačního klidu (dormance) stromů na podzim nebo na jaře. Adventivní (vyrůstají kdekoli mimo místa obvyklého růstu) nebo axilární výhony vyrůstající z primárního explantátu se přesazují na médium, kde dochází k pomnožení (multiplikaci). Část propagovaného materiálu se uchová v genové bance explantátů pro budoucí použití a zbývající explantáty se přenesou do zakořeňovacího média, v němž se vyvolá rozvoj kořenů, aby z nich mohly být dopěstovány kompletní rostliny. Všechna média mají přesně dané složení pro určitý druh. Používá se kyselina β -indolylmásečná, benzylaminopurin, kasein, glukamin, sacharóza a kyselina α -naftylctoová v různých poměrech a koncentracích.

Kompletně vyvinuté rostlinky je třeba aklimatizovat (postupně přivykat na venkovní podmínky, zejména sníženou vzdušnou vlhkost) v nesterilních substrátech (perlit, rašelina). Tato fáze růstu je považována za kritické období, protože kořeny vytvořené v agarových médiích nejsou ještě plně funkční a u listů není zcela vyvinutá kutikula a průduchy. Po aklimatizaci se rostliny přesazují na venkovní záhony do lesní školky a po dopěstování (zpravidla po roce) je lze vysadit na konečné stanoviště.

Organogeneze se ukázala prozatím jako nejspolehlivější mikropropagační metoda pro množení listnatých dřevin. V praxi byly takto množeny např. břízy (*Betula* spp.), třešň ptáci (*Prunus avium*), ořešáky (*Juglans* spp.), topoly (*Populus* spp.), jabloně (*Malus* spp.) a také blahovičníky (*Eucalyptus* spp.). U jehličnanů se osvědčila u několika druhů zeravů (*Thuja* spp.), borovic (*Pinus* spp.) a sekvojí (*Sequoia* spp.). Indukovat organogenezi se podařilo také u smrku ztepilého (*Picea abies*), douglasky tisolisté (*Pseudotsuga menziesii*), modřínu opadavého (*Larix decidua*) a tisu červeného (*Taxus baccata*), ale ve srovnání s výše uvedenými druhy s nižšími výtěžky.

Somatická embryogeneze

Velmi nadějnou metodou vhodnou pro klonové množení i pro genetické manipulace je somatická (nepohlavní, adventivní) embryogeneze. Vlivem hormonů v živném médiu se embrya vyvíjejí přímo z buněk juvenilního pletiva, anebo nepřímo z nediferencovaného embryogenního pletiva. Somatická embrya se svými biochemickými a morfologickými vlastnostmi neodlišují od embryí vzniklých zygoticky (splynutím pohlavních buněk).

Růst embryogenního pletiva lze poměrně snadno navodit u mnoha druhů lesních stromů, ale dosáhnout konverze somatického embrya v kompletně vyvinutou a životaschopnou rostlinu se ještě příliš nedaří. V r. 1982 byla popsána somatická embryogeneze v buněčné suspenzi kultuře smrku pichlavého (*Picea glauca*), vývoj embryí byl však pouze částečný. Až v 2. pol. 80. let



Plně vyvinuté somatické embryo dubu zimního (*Quercus petraea*), nahoře ♦ Navození růstu (indukovaná organogeneze) z vrcholového meristému zimního (dormantního) pupene modřínu opadavého (*Larix decidua*), dole

byla somatická embryogeneze a úspěšná konverze popsána u smrku Engelmannova (*Pengelmannii*), smrku ztepilého (*P. abies*), borovice Lambertovy (*Pinus lambertiana*), borovice kadidlové (*P. taeda*), douglasky tisolisté, modřínu opadavého, jedle bělokoré (*Abies alba*) a u sekvoje vždyzelené (*Sequoia sempervirens*).

Výzkum využití somatické embryogeneze pro mikropropagaci listnatých stromů započal prakticky ve stejné době. V r. 1985 byla získána somatická embrya z explantátů zygotických embryí a endospermu ořešáku královského (*Juglans regia*), jírovce maďalu (*Aesculus hippocastanum*) a jeho křížence (*A. hippocastanum* x *Pavia rubra*), lísky obecné (*Corylus avellana*) a olivovníku evropského (*Olea europaea*), která úspěšně konvertovala na kompletní rostliny. U dubu korkového (*Quercus suber*) byla popsána somatická embryogeneze v r. 1987, u dubu cesmínovitého (*Q. ilex*) a dubu červeného (*Q. rubra*) v r. 1989. V r. 1990 se zdařila nejen indukce somatických embryí u dubu letního (*Q. robur*) a dubu zimního (*Q. petraea*), ale i u lípy srdčité (*Tilia cordata*) a velkolisté (*T. platyphyllos*). U břízy bělokoré (*Betula pendula*), začaly pokusy se somatickou embryogenezí až v 90. letech 20. stol.

Stav lesů v České republice

V našem státě je zalesněno 2 641 000 ha (tj. asi 33,5 % celkové rozlohy). Po Finsku, Švédsku a Rakousku patříme k nejzalesnějším zemím Evropy. Druhovává rovnováha v našich lesních ekosystémech však začala být narušována už v neolitu, takže lesy rostoucí v dnešní industrializované a urbanizované krajině nelze pokládat za původní a jen nepatrný zlomek zalesněné rozlohy lze označit termínem „les přírody blízký“.



Množící se kultura buku lesního (*Fagus sylvatica*) v genové bance explantátů, nahoře ♦ Aklimatizované výpěstky in vitro tisu červeného (*Taxus baccata*) před výsadbou na venkovní plochy, dole

Obnova lesa

Ve staletí osídlené a obhospodařované krajině se lesy přirozeným způsobem prakticky neobnovují a jejich záchova je zabezpečována umělou obnovou. (Pozn.: O poklesu přirozené obnovy lesa svědčí následující statistiky: ve 30. letech 20. stol. činila přirozená obnova lesa z celkové obnovy ještě 23 %, v 50. letech 10 %, v r. 1960 3,6 % a v r. 1985 už jen 1,7 %. Na přelomu století přirozená obnova opět přesáhla hranici 10 % a stále mírně stoupá, z 900 ha v r. 1990 na téměř 4 000 ha v r. 2002, přesto má snižující se tendenci, ze 35 000 ha v r. 1990 na 22 000 ha v r. 2002. Nové výsadby však sledovaly hlavně ekonomické cíle, takže druhová, věková i prostorová skladba našich lesů není optimální. Plošně byly vysazovány především rychle rostoucí, hospodářsky významné, především jehličnaté lesní stromy poskytující průmyslově žádanou dřevní hmotu (smrk, borovice). V současnosti se postupně zvyšuje zastoupení listnatých stromů, případně se vysazují stromy mající meliorační a zpevňující funkce. Podíl listnatých dřevin se při umělých obnovách lesních porostů ve srovnání s r. 1990 výrazně zvýšil a v r. 2002 činil 35,3 %.

Mnoho druhů dřevin a zvláště dřeviny keřového vzrůstu jsou však stále v lesním hospodářství přehlíženy, i když řada z nich tvoří důležitou součást lesních ekosystémů. Keřové patro vytváří vhodné mikroklima pro obnovu jiných lesních dřevin jak v klimaxových, tak v hospodářsky využívaných lesích. Křovinný porost zlepšuje vyčerpané lesní půdy a z tohoto hlediska lze keře považovat za důležité přípravné dřeviny, které zvláště ve vyšších polohách vytvářejí funkční porosty v místech odumřelých smrkových monokultur. Mimo jiné až několikanásobně zvyšují protiprachovou filtrační schopnost lesa.

Tab. 1 Rostlinné části používané pro explantáty u lesních dřevin

gametofytická pletiva: samičí i samičí
embrya: nevyvinutá i vyvinutá
hypokotyl, kotyledony: vrcholky
 výrůstků, rašící semenáčky
meristémy: apikální, axilární pupeny
celé orgány: jehličí, listy
kambiální pletiva
buňky a protoplasty

Řada keřů i dalších přehlížených lesních stromů je na seznamech ohrožených druhů. Některé se u nás vyskytují již jen v několika málo exemplářích. Rozmnožování semeny nebo výmladky pro jejich přirozenou obnovu nestačí a ani je nelze množit řízkováním nebo roubováním. Jejich záchrana je však pro zachování biodiverzity lesa naprosto nezbytná. V těchto případech lze s výhodou využít mikropropagační postupy.



Kvetoucí výpěstek *in vitro* kriticky ohroženého lýkovec vonného (*Daphne genkwa*) na venkovním záhonu. Snímky J. Vorla, VÚLHM

Mikropropagace lesních dřevin v ČR

V našich zemích se začal jako první problematice výzkumu a využití explantátových kultur lesních dřevin pro účely lesnického šlechtitelství věnovat V. Chalupa už počátkem 70. let. Vypracoval mikropropagační postupy pro běžné druhy jehličnatých a většinu listnatých dřevin rostoucích u nás a je v tomto oboru jedním z nejcitovanějších českých vědců.

Naše prozatím největší pracoviště zabývající se výzkumem klonového množení lesních dřevin *in vitro* a soustředující rozsáhlou genovou banku explantátů je ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti (VÚLHM). V současné době se zde uchovává 27 druhů lesních dřevin (tab. 2), z nichž některé jsou řazeny mezi kriticky ohrožené a silně ohrožené (viz obr.). Tento materiál lze kdykoli použít k dalšímu množení.

Růst explantátových výpěstků se sleduje od r. 1996 ve venkovních podmínkách v experimentální lesní školce VÚLHM na Baních ve Zbraslavi a v demonstračních objektech Kluky (Písek), Polná (Českomoravská vrchovina) a Trutnov.

Výsledky analýz přírůstků, biometrická

Tab. 2 Lesní stromy a keře množené klonováním *in vitro* (mikropropagací)

listnaté stromy

buk lesní (*Fagus sylvatica*), dub letní (*Quercus robur*), dub zimní (*Q. petraea*), hrušeň polnička (*Pyrus pyraeaster*), jablň lesní (*Malus sylvestris*), jeřáb břek LR* (*Sorbus torminalis*), jeřáb český EN* (*S. bohemica*), jeřáb krasový ** (*S. eximia*), jeřáb muk LR* (*S. aria*), jeřáb oskeruše (*S. domestica*), jeřáb ptačí (*S. aucuparia*), jeřáb sudetský (*S. sudetica*), jilm habrolistý (*Ulmus carpiniifolia*), jilm horský (*U. glabra*), jilm vaz (*U. laevis*), lípa srdčitá (*Tilia cordata*), lípa velkolistá (*T. platyphyllus*), topol osika (*Populus tremula*), topol osika hybridní (*P. tremula* × *P. tremuloides*), třešeň ptačí (*Prunus avium*)

jehličnaté stromy

modřín opadavý (*Larix decidua*), smrk ztepilý (*Picea abies*), tis červený VU* (*Taxus baccata*)

keře

bříza trpasličí EN* (*Betula nana*), lýkovec vonný CR* (*Daphne genkwa*), vrba bylinná (*Salix herbacea*), vrba dvoubarvá (*S. bicolor*)

*) stupně ohrožení (IUCN) — kategorie: C1. Kriticky ohrožené druhy (CR—critically endangered), C2. Silně ohrožené druhy (EN—endangered), C3. Ohrožené druhy (VU—vulnerable), C4. Vzácně se vyskytující druhy vyžadující další studium a monitorování (LR—lower risk)

**) druhy lesních stromů a keřů uvedené v Červeném seznamu cévních rostlin České republiky 2000 (J. Holub: Red list of vascular plants of the Czech republic 2000, Preslia 72, 187–230)

zákona č. 149/2003 Sb. a jeho prováděcích vyhlášek). Stanoviště pro výsadbu musí odpovídat zásadám stanoveným pro lesnickou rajonizaci reprodukčního materiálu lesních dřevin se zřetelem k přírodním lesním oblastem a vegetačním lesním stupňům a dále výsledkům šlechtitelského testování.

Perspektivy využití mikropropagačních technologií

Technologie klonového rozmnožování *in vitro* umožňují pracovat s velmi malým množstvím rostlinného materiálu, takže jeho odběr dárcovský strom nepoškozuje. Nabízí se proto její využití zvláště tam, kde jde o záchranu silně ohroženého druhu, nebo se dárcovská dřevina vyskytuje už jen sporadicky. Dnes jsou takto přednostně rozmnožovány cenné nebo ohrožené populace dubů (*Quercus* spp.), tisů červeného (*Taxus baccata*), zbytkové populace jilmu habrolistého (*Ulmus minor*), vybrané klony jilmu horského (*U. glabra*) a jilmu vaz, cenné populace endemických jeřábů, jeřáb břek, jeřáb oskeruše a také jablň lesní (*Malus sylvestris*) a hrušeň polnička (*Pyrus pyraeaster*).

Jak již bylo zmíněno výše, je další výhodou tohoto postupu možnost množení z meristemických pletiv, která jsou prostá patogenních zárodků, takže získaný sadební materiál může napomoci při ozdravování napadených lesních biotopů.

Z ekonomického hlediska je nepřehlédnutelné, že mikropropagovaný rostlinný materiál, který se uchovává v genové bance explantátů, lze kdykoli použít pro další namnožení neomezeného počtu jedinců v relativně krátkém časovém období. Shromáždění co největšího počtu klonů od jednotlivých druhů je předpokladem zajištění genetické variability množného druhu.

Využití mikropropagačních postupů je však daleko širší. Explantátové kultury slouží při základním výzkumu rostlin jako optimální model pro studium morfologických, biochemických i genetických vlastností rostlin. V posledních letech se tyto technologie stále více využívají ve šlechtění. Umožňují totiž rychlé namnožení jedinců s vyžadovanými vlastnostmi (např. rezistence, fytohemidie) získané jak postupy klasického šlechtění, tak pomocí genových manipulací.