



Ústav genetiky a biotechnológií rastlín
Slovenskej akadémie vied

Využitie inovatívnych vedeckých prístupov na zvýšenie efektívnosti lesného hospodárstva



SPOLUFINANCOVANÉ ES



Nitra, 2010

Názov: **Využitie inovatívnych vedeckých prístupov
na zvýšenie efektívnosti lesného hospodárstva**

Vydal: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 949 01 Nitra

Zostavil: kolektív autorov

Vydanie: prvé

Náklad: 1.000 výtlačkov

Tlač: Tlačiareň PRESS GROUP, s. r. o., Sládkovičova 86, 974 05 Banská Bystrica

ISBN 978-80-970498-8-1

OBSAH

Medzidruhové hybridy jedlí pre imisné oblasti Slovenska	5
Genetické markery a ich využitie v lesnom hospodárstve	17
Techniky <i>in vitro</i> a ich využitie pri lesných drevinách	33
Klonálne množenie čučoriedok, brusníc a ostružín <i>in vitro</i>	51
Transgénne dreviny	65
Výkladový slovník	79

Medzidruhové hybridy jedlí pre imisné oblasti Slovenska

Zvýšená citlivosť domácej jedle bielej (*Abies alba* Mill.) k rýchlo sa meniacim podmienkam prostredia vyústila do rozsiahleho odumierania jedľových porastov u nás. Tento jav je nápadný najmä v blízkosti veľkých priemyselných centier, ktoré uvoľňujú do ovzdušia veľké množstvá imisií. Pokles jedle bielej v lesoch Slovenska z pôvodných 15 % na súčasné 4 % je dôsledkom vysokého stupňa genetickej uniformity domácich populácií tejto dreviny a s tým súvisiacej nízkej adaptability jedle k rýchlo sa meniacim podmienkam prostredia.

Medzidruhovú hybridizáciu je považovaná za jednu z najúčinnjších a najprístupnejších metód šľachtenia drevín. Všeobecne sa usudzuje, že hybridné formy sa vyznačujú vyšším stupňom heterozygotnosti, čo im umožňuje rýchlejšiu adaptáciu na nové ekologické podmienky a predstavujú zároveň perspektívnu cestu zachovania biologických predností jedle bielej a zvýšenia jej adaptability a rezistencie k meniacim sa podmienkam prostredia.



Pomocou medzidruhovej hybridizácie získavame jedincov s kombináciami vlastností, aké sa pri čistých druhoch nevyskytujú. K žiaducim vlastnostiam patrí aj tolerancia a odolnosť voči abiotickému a biotickému ohrozeniu, spolu s udrжанím minimálne priemerných rastových parametrov. Produkcia medzidruhových hybridov jedle bielej so zvýšenou odolnosťou voči suchu umelou hybridizáciou, ich množenie v podmienkach *in vitro* a následná introdukcia do lesných porastov za účelom zvýšenia genetickej variability a odolnostného potenciálu u nás povedie v konečnom dôsledku k poklesu odumierania jedľových porastov v lesoch Slovenska.

V súčasnosti je na Slovensku zriadených niekoľko trvalých výskumných plôch, na ktorých sa dlhodobo sleduje kvalita, t. j. rýchlosť rastu a odolnosť hybridov jedlí.

Medzidruhové hybridy jedlí pre imisné oblasti Slovenska

Andrej Kormuťák

Súčasnú ako aj predpokladanú nepriaznivú zmenu klimatických pomerov na našej planéte vyvolávajú zvýšený záujem odborných kruhov i širokej laickej verejnosti o pokračujúcu redukciu genetickej rôznorodosti rastlín, ktorá je evidentná tak na úrovni druhov ako aj lokálnych populácií. Aj v nasledujúcich desiatkach rokov sa predpokladá, že vegetácia bude vystavená nepriaznivým účinkom rôznorodých znečisťujúcich látok (polutantov) globálneho, regionálneho a lokálneho charakteru, ktoré priamo alebo prostredníctvom pôdy budú ovplyvňovať jednotlivé rastliny a ich spoločenstvá. Vzhľadom na skutočnosť, že charakter imisného zaťaženia a klimatických zmien sa v dôsledku nekoordinovaného rozširovania priemyselných aktivít a celosvetového skleníkového efektu



predpovedá iba veľmi ťažko, zostáva nanajvýš aktuálna požiadavka na udržanie genetickej variability rastlín ako základného predpokladu zachovania ich adaptability k rýchlo sa meniacim podmienkam prostredia.

Extrémny dopad silného vplyvu imisií na lesy strednej Európy možno ilustrovať aj na príklade jedle bielej (*Abies alba* Mill.). Ako jediný prirodzene sa vyskytujúci zástupca rodu *Abies* na našom území je svojim takmer 4% plošným zastúpením piatou najrozšírenejšou drevinou Slovenska. Priemernou zásobou 358 plm/ha sa jedľa biela zaraďovala donedávna medzi naše hospodársky najdôležitejšie dreviny. Nesporný a čoraz častejšie zdôrazňovaný je aj biologický a estetický význam jedle bielej v našich lesoch. Poľská autorka Dobrowolska ju nazýva pre jej vysokú bioindikačnú hodnotu „mimózou“ (z gréckeho citlivka), zatiaľ čo ukrajinský autor Švidenko ju považuje za „zelenú perlu“ Bukovinských Karpát, najmä pre veľký pôdoochranný a vodoregulačný význam jedle bielej. Jej vertikálne rozšírenie siaha od 232 m n. m. v Malých Karpatoch (Harmónia pri Modre) do 1 500 m n. m. vo Vysokých Tatrách. Avšak aj napriek týmto charakteristikám, predstavuje táto drevina zároveň jeden z najpálčivejších problémov nášho lesného hospodárstva. Už dávnejšie pozorovaný jej ústup z lesov celej strednej Európy sa v posledných desaťročiach urýchlil a dosiahol v niektorých oblastiach až kalamitný charakter. Zatiaľ čo v roku 1930 činilo zastúpenie jedle bielej v našich lesoch 14 %, v súčasnosti je to už iba necelých 4 %. Pritom podľa

čl. S. 201 Zákona o globálnej environmentálnej politike z roku 1988 sa už 10 % pokles zastúpenia akéhokoľvek pôvodného druhu považuje za významnú redukciu jeho biologickej diverzity. V okolí Novák, ako jedného z najviac znečistených regiónov Slovenska, došlo až k 59 % redukcii porastov tejto dreviny od roku 1958, zatiaľ čo v oblasti Žiaru nad Hronom činí tento pokles za rovnaké obdobie 54 %.

Z historického hľadiska sa žiada uviesť, že asi prvé správy o odumieraní jedlí pochádzajú z Nemecka zo 16. a 17. storočia. Už od roku 1650 vo Franskom lese sa pozorovala klesajúca výmera jedle bielej. Až 80 % porastov v uvedenom lese tvorila jedľa biela a iba 10 % smrek. V roku 1973 bola už situácia opačná, keď 88 % výmery tvoril smrek a len 3 % jedľa biela. V Česku prvé správy o hynutí starých jedľových porastov pochádzajú zo Sliezska v roku 1842. O hynutí 50 a 25 ročných jedľových porastov sa zmieňuje v roku 1922 lesník pracujúci u českého grófa Štenberga. Spomínaný lesník si všimol úhyn jedlí v relatívne priaznivých klimatických podmienkach, kde porasty boli chránené od mrazov. Upozorňuje na potrebu pestovania jedle bielej ako prímеси v borovicových a dubových lesoch pre jej ochranu pred mrazom. Už v tomto období sa upozorňovalo na vplyv imisií z tovární, osobitne na vysokú citlivosť jedle k imisiám. V súčasnosti sa rapidný ústup jedle bielej pripisuje zníženej genetickej rozmanitosti uvedeného druhu a s tým spojenému zníženiu jej vitality a adaptability k vonkajším podmienkam. Podľa niektorých autorov je odumieranie jedle bielej geograficky úzko späté s tou časťou jej prirodzeného rozšírenia v strednej Európe, kde sa nepozorujú takmer žiadne rozdiely medzi provenienciami jedle. Naopak, absencia akýchkoľvek náznakov chradnutia jedle je charakteristická pre južné oblasti prirodzeného areálu jedle bielej v Európe, kde sú zaznamenávané výrazné rozdiely medzi jednotlivými provenienciami a pomerne vysoká vitalita a adaptabilita druhu.

Zúžená genetická variabilita stredoeurópskych populácií jedle vyústila do zníženia jej adaptačných schopností. Niektorí autori to pripisujú pomerne veľkým rozmerom a relatívne vysokej špecifickej hmotnosti peľových zŕn jedle bielej v dôsledku čoho je ich rozptyl obmedzený. Obmedzený dolet peľu je zrejme hlavnou príčinou vysokej miery samoopelenia jedle bielej v prirodzených podmienkach a s tým spojeného zníženia životaschopnosti jej semenného potomstva. Všeobecne sa totiž samoopelenie hodnotí ako najvyšší stupeň príbuzenského kríženia, ktoré má za následok zúženie genetickej premenlivosti a následné zníženie vitality potomstva. V genetickej terminológii sa tento jav označuje ako inzuchtná depresia. Inzuchtný charakter stredoeurópskych populácií jedle bielej je s najväčšou pravdepodobnosťou príčinou zníženej odolnosti tejto dreviny k abiotickým a biotickým faktorom prostredia a jej postupného odumierania.



Receptívne kvety jedle bielej spolu s pohľadom na vyvíjajúce sa semená v šiške.

1. Hybridizácia ako riešenie súčasnej situácie

V nazeraní na možnosti udržania jedle bielej v našich lesoch sa v odborných kruhoch prezentujú dva názory. Prvý z nich počíta s perspektívnou náhradou jedle duglaskou tisolistou (*Pseudotsuga menziesii*), ktorej však škodia mrazy. Druhý názor počíta s udržaním a záchranou jedle bielej pomocou vnútrodruhovej hybridizácie rôznych proveniencií jedle. Taktiež sa čoraz nástojčivejšie prezentuje nevyhnutnosť medzidruhovej hybridizácie domácej jedle bielej s cudzokrajnými druhmi jedlí, najmä s druhmi mediteránnnej oblasti. V oboch prípadoch sa sleduje cieľ postupného zvýšenia heterozygotnosti, resp. genetickej rôznorodosti jedle bielej ako jedného z hlavných predpokladov zvýšenia jej vitality a odolnosti. Posledná uvedená alternatíva však naráža na legislatívne prekážky. V záujme zachovania čistoty genofondu jedle bielej sa totiž legislatívne zamedzilo rozsiahlejšie zavádzanie cudzokrajných druhov jedlí do našich lesov. Výhodiskom by mohla byť výnimka z tohto nariadenia, hlavne v oblastiach silného imisného spádu, kde jedľa biela nie je schopná trvalejšej existencie.

Domnievame sa, že medzidruhové hybridy jedle bielej sú tou alternatívou, ktorá poskytuje možnosť zachovania jedľových porastov aj na imisne zaťažených lokalitách Slovenska pri zachovaní výrazného genetického podielu jedle bielej na týchto lokalitách. Ich hlavnou výhodou oproti čistým druhom je zvýšená heterozygotnosť, vďaka ktorej sa vyznačujú rýchlejším rastom a zvýšenou odolnosťou. Dôkazom toho sú spontánne hybridy jedlí, ktoré boli popísané v rôznych častiach sveta a ktoré vo väčšej alebo menšej miere zdieľajú obe tieto vlastnosti.

1.1 Spontánne hybridy jedlí

Najviac prirodzených hybridov jedlí vzniká spontánne medzi druhmi mediteránnnych oblastí Európy. Menší počet spontánnnych hybridov je na severoamerickom kontinente a ázijské druhy sú dodnes prebádané nedostatočne v tomto ohľade. Prvým popísaným prirodzeným medzidruhovým hybridom rastúcim v mediteránnnych oblastiach Európy bol hybrid *A. borisii-regis* opísaný Mattfeldom v roku 1926. Hybrid bol nazvaný na počesť bulharského kráľa Borisa III. a vznikol ako produkt spontánnej hybridizácie medzi druhmi *A. alba* × *A. cephalonica*. Vyskytuje sa v tranzitnej zóne na severe Balkánskeho polostrova, kde rastie ešte viac na sever druh *A. alba*, pričom na juhu sa vyskytujú izolované populácie *A. cephalonica*. Hybridy sa vyskytujú v mieste, kde sa prirodzené populácie materských druhov stýkajú na hraniciach severného Grécka a bývalej Juhoslávie. Na severe sú hybridy viac podobné druhu *A. alba* a na juhu *A. cephalonica*, s ktorými rastú v hybridných zónach. Najnovšie štúdie potvrdili, že hybridné populácie popísané Mattfeldom v 30. rokoch minulého storočia sa vyskytujú ešte aj v južnejších populáciách Peloponézskych jedlí. Recipročným krížením *A. cephalonica* × *A. alba* vznikol hybrid *A. nebrodensis*, ktorý rastie veľmi vzácnne v severovýchodnej Sicílii a dnes je udržiavaný len vegetatívne.

Produktom spontánnej hybridizácie je aj hybrid *A. bornmülleriana*, nazvaný na počesť nemeckého profesora botaniky J. Bornmüllera. Prvýkrát bol popísaný Floussom (1936) ako hybrid medzi druhmi *A. cephalonica* × *A. nordmanniana*. Vznikol už v geologicky dávnej minulosti a dnes rastie na území severozápadného Turecka.

Veľmi blízkym predchádzajúcemu je hybrid *A. equi-trojani*. Prvýkrát bol popísaný Mattfeldom ako hybrid medzi *A. cephalonica* a *A. bornmülleriana*, ktorý rastie na malom území západného Turecka. Na Pyrenejskom polostrove sa už dávnejšie pozorovala vysoká genetická a hybridologická afinita medzi jedľou španielskou (*A. pinsapo* Boiss.) a jedľou alžírskou (*A. numidica* De Lann.), čo podľa niektorých autorov svedčilo o ich spoločnom vývoji v priebehu evolúcie. Podľa Caballosa a Bolaños (1928) a Gausena (1933) jedľa

španielska rastúca v pohorí Sierra de Rondo na juhu Európy a jedľa alžírka rastúca na susednom území severnej Afriky mali spoločného predka, ktorý rástol v období Miocénu na spojitom území Gibraltarského prielivu. Ich spoločný hybrid je známy pod názvom *A. pinsapo* var. *vel* hybrida. V roku 1951 objavil J. Masferrer v pohorí Gerona v Španielsku spontánne rastúci hybrid *A. masjoanii*. Rástol na farme Masjoan v mieste prirodzeného výskytu *A. alba* a podľa toho dostal aj pomenovanie. Zistilo sa, že materský druh uvedeného hybridu bol *A. pinsapo*, ktorý bol opelený druhom *A. alba*. V nasledujúcom roku bolo získaných až 100 000 hybridných semien *A. masjoanii*. Hybrid mal intermediárny charakter oboch rodičov.

Aj na severoamerickom kontinente je známych viacero prirodzené sa vyskytujúcich medzidruhových hybridov jedlí. Hybrid *A. schastensis* vznikol hybridizáciou druhov *A. magnifica* × *A. procera*. Má intermediárny charakter medzi oboma rodičmi a rastie vysoko v horách Sierry Nevady a Mont Schasta v Kalifornii. Bol objavený Jeffreiom v roku 1852 v už spomínaných horách Shasta. Medzidruhovú hybrid *A. intermedia* je výsledkom spontánnej hybridizácie druhov *A. balsamea* × *A. fraseri* v Apalačskom pohorí v severovýchodnej časti USA. V juhozápadnom Oregone a v severozápadnej Kalifornii dochádza v zónach vzájomného prekrývania sa prirodzených areálov jedle srienistej (*A. concolor*) a jedle obrovskej (*A. grandis*) k ich vzájomnej hybridizácii za vzniku hybridných populácií *A. concolor* × *A. grandis*. V uvedenej oblasti bol popísaný aj spontánny hybrid druhov *A. magnifica* × *A. procera*. Výpočet spontánnych hybridov jedlí na severoamerickom kontinente uzatvára medzidruhovú hybrid *A. balsamea* × *A. fraseri* na severozápade USA a v Kanade.

Čo sa týka Ázie, v tejto časti sveta boli doposiaľ popísané iba dva medzidruhovú hybridy. V severovýchodnej Číne, kde sa stretávajú prirodzené areály *A. sibirica* a *A. nephrolepis* sa vyskytujú hybridné populácie *A. sibirico-nephrolepis*, zatiaľ čo na Japonských ostrovoch je známy hybrid *A. umbellata* vznikajúci spontánnou hybridizáciou druhov *A. firma* × *A. homolepis*.

Z vyššie uvedeného prehľadu je zrejmé, že najviac prirodzených hybridov jedlí vzniká medzi druhmi mediteránnych oblasti Európy. Menší počet spontánnych hybridov bol zistený na severoamerickom kontinente, zatiaľ čo ázijské druhy sú z hľadiska ich spontánnej hybridizácie doposiaľ ešte málo preskúmané. Bez ohľadu na produkčný potenciál hybridov vyjadrený ich výškovým a hrúbkovým rastom, nesporný zostáva ich význam z hľadiska obohacovania genofondu jedlí v celosvetovom meradle, ako jeden z hlavných predpokladov ich adaptability na meniace sa podmienky prostredia.

1.2 Umelé hybridy jedlí

Rozsiahle pokusy s umelou hybridizáciou jedlí uskutočnené doc. Ing. Eugenom Chirom, CSc. v Arboréte Mlyňany - Ústave dendrobiológie SAV, Ing. Ladislavom Gregussom, CSc. vo Výskumnom ústave lesného hospodárstva vo Zvolene ako aj pokusy na našom pracovisku v tejto oblasti presvedčivo dokumentovali vysokú hybridologickú afinitu jedle bielej ku všetkým mediteránnym zástupcom rodu *Abies*, t. j. k jedli gréckej (*A. cephalonica* Loud.), jedli cilickej (*A. cilicica* Ant. et Kotschy/Carr.), jedli kaukazskej (*A. nordmanniana* Stev./Spach.), jedli španielskej (*A. pinsapo* Boiss.) a jedli alžírkej (*A. numidica* De Lann.). Získané hybridy jedle bielej s vyššie uvedenými druhmi prejavujú na juvenilných štádiách ich vývinu heterózný efekt, teda že rastú rýchlejšie ako rodičovské druhy.

Okrem heterózného rastu sa viaceré hybridy ukázali veľmi sľubné aj z hľadiska ich rezistencie proti chorobám a nepriaznivým klimatickým podmienkam. Ako príklad úspešného využitia medzidruhových hybridov možno uviesť hybridu *A. borisii-regis*

druhov *A. alba* × *A. cephalonica*, ktorý vznikol spontánne na Balkáne. Uvedený hybrid významnou mierou prispieva k vitalite jedľových lesov zmienenej oblasti, najmä v Grécku, kde vykazuje vysokú odolnosť voči intenzívnemu slnečnému žiareniu, suchej pôde a nízkemu úhrnu zrážok. Používa sa aj pri zalesňovaní požiarom zničených biotopov.



Škôlka jedľových semenáčikov v Arborete Mlyňany - Ústave dendrobiológie SAV

V súvislosti s globálnym otepľovaním odporúča skupina francúzskych autorov okolo Arbeza začleniť do hybridizačného programu s jedľou bielou najmä jedľu španielsku a jedľu alžírsku. Oba tieto druhy jedlí rastú na prirodzených stanovištiach, pre ktoré sú charakteristické vysoké nadmorské výšky, suchá a plytká pôda a relatívne nízke teploty. Z tohto dôvodu vykazujú oba druhy najvyššie indexy aridity (suchovzdornosti). Medzidruhovú hybrid *A. pinsapo* × *A. alba* rastie lepšie v porovnaní s *A. alba* na stanovištiach so suchšou pôdou v španielskom Katalánsku. Dnes sa uvedený hybrid využíva ako náhradná drevina pri opätovnom zalesňovaní niekoľko hektárových plôch v Španielsku. Taktiež francúzski autori Fady a Concle odporúčajú využívanie týchto hybridov pri zalesňovaní požiarom zničených plôch Francúzska.

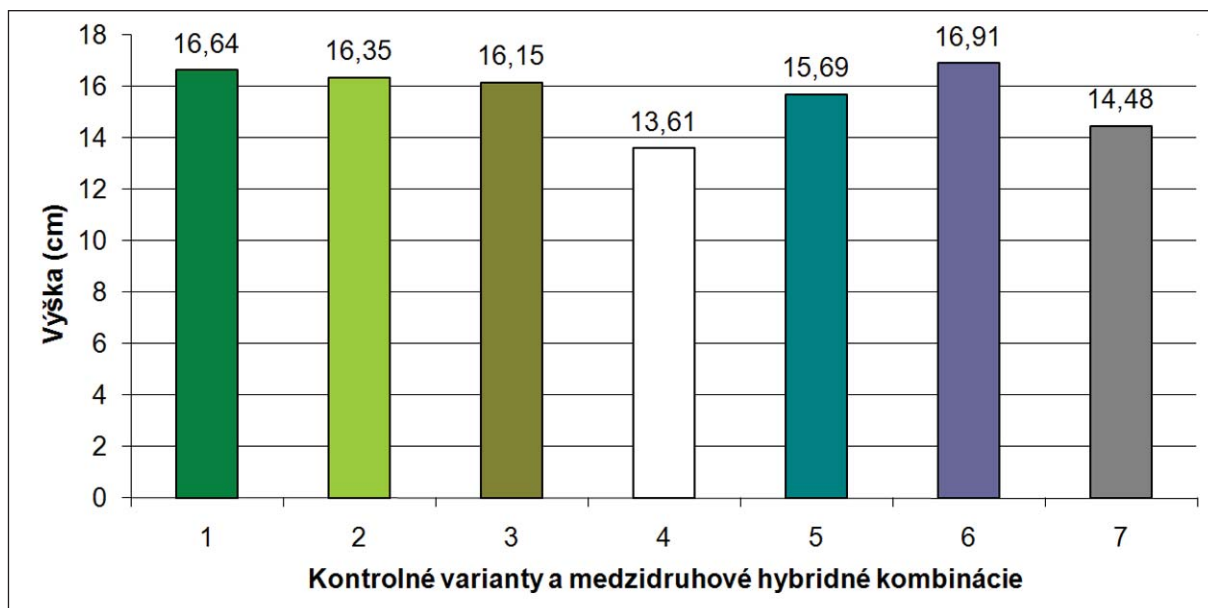
Vyššie uvedené príklady zapadajú do rámca odporúčania, ktoré už v roku 1981 prezentoval rakúsky výskumník Mayer, keď navrhol introducovať spontánne hybridy *A. borisii-regis* (*A. alba* × *A. cephalonica*), *A. bornmülleriana* (*A. cephalonica* × *A. nordmanniana*) a *A. equi-trojani* (*A. cephalonica* × *A. bornmülleriana*) spolu s jedľou kaukazskou (*A. nordmanniana*) do lesov strednej Európy ako náhradu za chátrajúcu jedľu bielu.

2. Rastový potenciál medzidruhových hybridov

Spoločnou charakteristikou prevažnej väčšiny medzidruhových hybridov jedlí, ktoré vznikli spontánne v prírode alebo boli získané umelým opelením je ich rýchlejší výškový rast oproti rodičom. Ide o typický prejav somatickej heterózy, ktorý môže mať trvalejší charakter alebo môže byť iba prechodný.

V začiatkových štádiách vývinu, t. j. na úrovni semenáčikov a sadeníc sme napríklad zistili mierne zaostávanie vo výškovom raste medzidruhového hybridu jedle bielej s jedľou alžírskou za potomstvom zo samoopelenia i voľného opelenia jedle bielej.

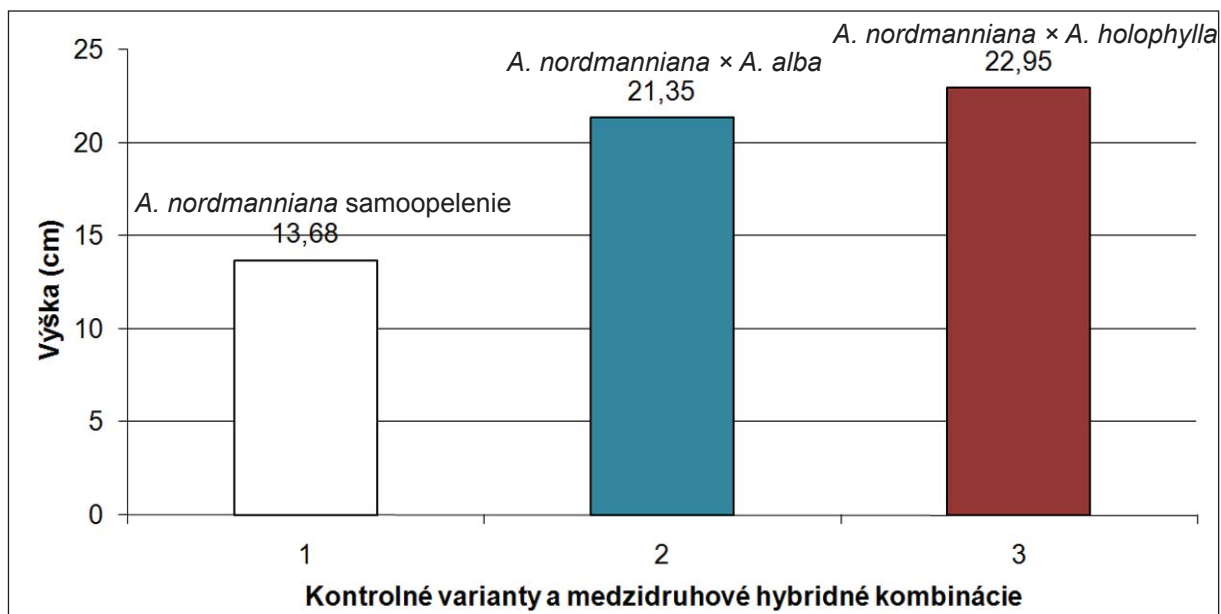
Zrejme sa tu prejavil otcovský druh *A. numidica*, pre ktorý je charakteristický pomalý rast a husté drevo. Táto vlastnosť otca sa prejavila aj u 3-ročných sadeníc medzidruhovej kombinácie *A. alba* × *A. numidica*. Naproti tomu hybridné kombinácie jedle kaukazskej s jedľou bielou, jedľou alžírskou a jedľou procerou predstihovali vo veku 3 rokov potomstvo materskej jedle kaukazskej zo samoopelenia (graf 1).



Graf 1. - Výškový rast medzidruhovú hybridov jedle bielej a jedle kaukazskej vo veku 3 rokov

- 1) *A. alba* samoopelenie
- 2) *A. alba* voľné opelenie
- 3) *A. alba* × *A. numidica*
- 4) *A. nordmanniana* samoopelenie
- 5) *A. nordmanniana* × *A. alba*
- 6) *A. nordmanniana* × *A. numidica*
- 7) *A. nordmanniana* × *A. procera*

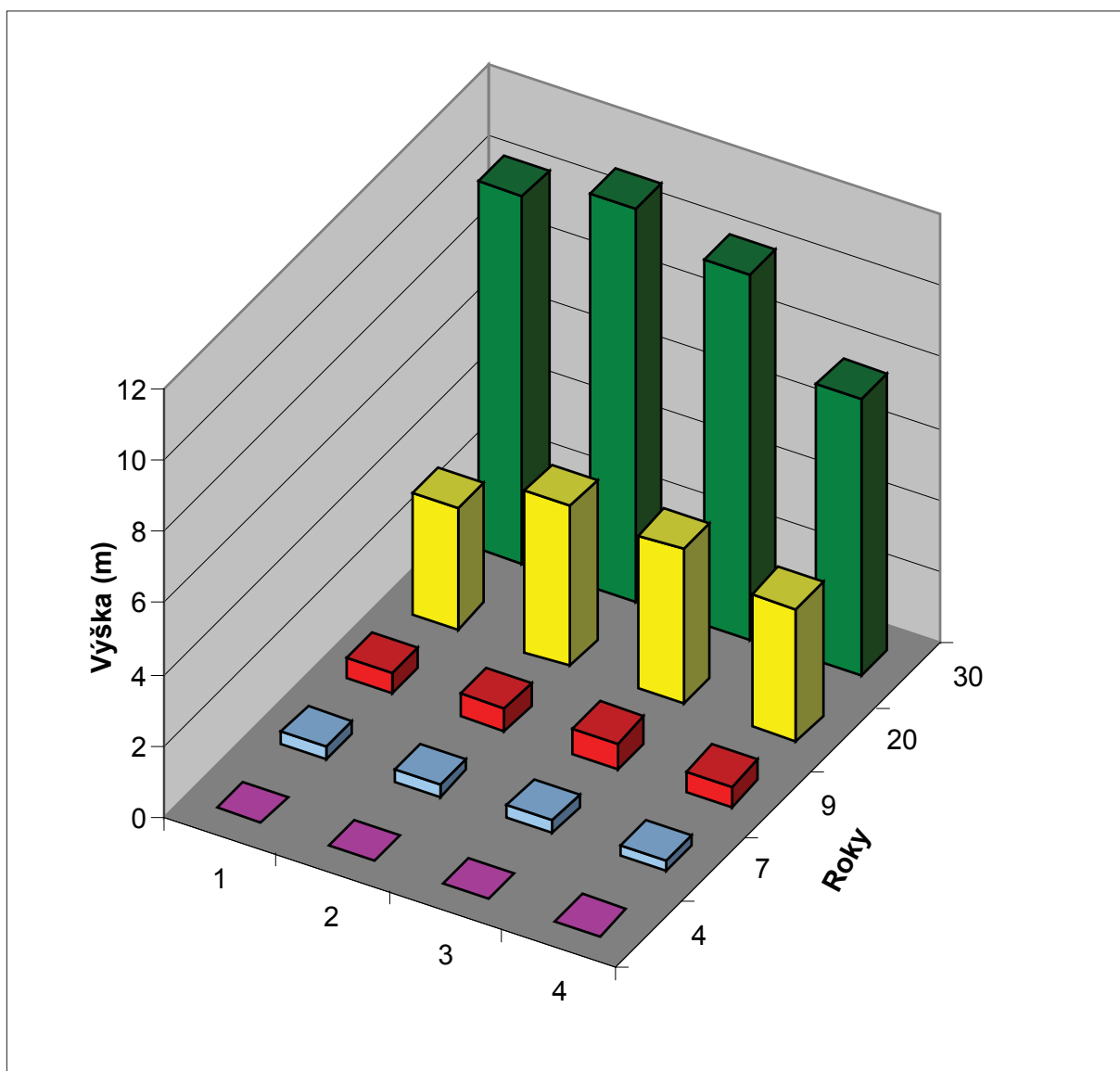
Výrazný heterózný rast je charakteristický aj pre medzidruhovú hybridy jedle kaukazskej s jedľou bielou a jedľou ihlicovitou, ktorá rastie v Ázii. Ako vidieť z grafu 2, medzidruhovú kombinácie *A. nordmanniana* × *A. alba* a *A. nordmanniana* × *A. holophylla* dosahujú vo veku 4 rokov podstatne vyššie výškové prírastky ako kontrola jedle kaukazskej zo samoopelenia.



Graf 2. - Výškový rast medzidruhovú hybridov jedle kaukazskej vo veku 4 rokov

Začlenenie dlhšieho vývinového obdobia hybridov do porovnávacieho štúdia umožnilo komplexnejšie posúdiť dynamiku ich rastu, najmä z hľadiska pretrvávania somatickej heterózy. Ako príklad možno uviesť medzidruhové hybridy jedle gréckej na trvalej výskumnej ploche v Kamenci pod Vtáčnikom, kde sa porovnávali rastové charakteristiky 3 medzidruhových hybridov vo veku 4, 7, 9, 20 a 30 rokov. Uvedená lokalita sa nachádza v oblasti silného imisného spadu tepelnej elektrárne Zemianske Kostolany, resp. Nováckych chemických závodov v Novákoch.

Na úrovni 4-ročných sadeníc bola somatická heteróza charakteristická iba pre medzidruhové hybridy *A. cephalonica* × *A. nordmanniana* s priemernou výškou sadeníc 20,9 cm a *A. cephalonica* × *A. numidica* s priemernou výškou sadeníc 16,2 cm. V prípade medzidruhového hybrida *A. cephalonica* × *A. alba* sa somatická heteróza neprejavila na tomto štádiu vôbec. Uvedený hybrid zaostával svojou priemernou výškou 11,8 cm aj za kontrolou *A. cephalonica* - samoopelenie, pre ktorú bola charakteristická výška 15, 2 cm (graf 3).



Graf 3. - Dynamika výškového rastu medzidruhových hybridov jedle gréckej vo veku 4, 7, 9, 20 a 30 rokov

- 1) *A. cephalonica* samoopelenie
- 2) *A. cephalonica* × *A. alba*
- 3) *A. cephalonica* × *A. nordmanniana*
- 4) *A. cephalonica* × *A. numidica*

Pri hodnotení výškových parametrov 7-ročných sadeníc bol pozorovaný jednoznačný prejav somatickej heterózy iba v prípade hybridu *A. cephalonica* × *A. nordmanniana* s priemernou výškou 39,86 cm, čím výrazne predstihol kontrolu s priemernou výškou 33,42 cm.

V prípade medzidruhovej kombinácie *A. cephalonica* × *A. alba* je zjavné spomalenie výškového rastu s priemernou hodnotou 31,64 cm oproti kontrole. Uvedený hybrid však v ontogenetických štádiách 9, 20 a 30 rokov opäť akceleruje vo výškovom raste a prerastá kontrolu.

V prípade medzidruhovej kombinácie *A. cephalonica* × *A. numidica* je pozorovateľné spomalenie výškového rastu s priemernou hodnotou 30,67 cm, takmer o 3 cm v priemere v porovnaní s kontrolným variantom. Uvedené spomalenie rastu s ďalším vývinom narastá (graf 3).

Pri hodnotení výškového rastu stromov vo veku 9 rokov sa somatická heteróza najvýraznejšie prejavila v prípade hybridnej kombinácie *A. cephalonica* × *A. nordmanniana* s priemernou výškou 72,9 cm. Kontrola *A. cephalonica* – samoopelenie dosiahla v tomto štádiu priemernú hodnotu 57 cm. Medzidruhový hybrid *A. cephalonica* × *A. alba* s priemernou výškou 63,1 cm taktiež výrazne prerastá kontrolu zo samoopelenia, a to až o 6,1 cm. Postupné znižovanie výškového prírastku možno pozorovať u medzidruhového hybridu *A. cephalonica* × *A. numidica*, ktorý vo veku 9 rokov zaostáva priemernou výškou 56,66 cm iba nepatrne za kontrolou, avšak od tohto momentu sa pozoruje sústavný pokles jeho výškového rastu až do veku 30 rokov.

Vo veku 20 rokov možno pozorovať najvýraznejší prejav somatickej heterózy pri medzidruhovej kombinácii *A. cephalonica* × *A. alba* s priemernou hodnotou výškového rastu 451,66 cm. Uvedený hybrid prerastá kontrolu o viac ako 120 cm.

Podobná situácia stále pretrvávajúcej somatickej heterózy bola pozorovaná aj u medzidruhovej kombinácie *A. cephalonica* × *A. nordmanniana* s priemernou výškou 441,33 cm. Oproti kontrole *A. cephalonica* - samoopelenie s priemernou výškou 333,33 cm to znamená prevahu v priemere viac ako 110 cm. Somatická heteróza sa však neprejavila v prípade medzidruhového hybridu *A. cephalonica* × *A. numidica*, ktorý priemernou výškou 325,83 cm zaostal za kontrolou o 8 cm.

Posledné merania výškového rastu sa uskutočnili vo veku 30 rokov. Na tomto štádiu sa pozoroval jednoznačný trend útlmu somatickej heterózy medzidruhových hybridov v porovnaní s kontrolou. Iba v prípade hybridnej kombinácie *A. cephalonica* × *A. alba* s priemernou výškou 1 100,16 cm možno hovoriť o pretrvávajúcej somatickej heteróze. Uvedený hybrid prerastá kontrolu s priemernou výškou 1 000,84 cm takmer o 100 cm.

Spomalenie výškového rastu sa prejavilo v prípade hybridu *A. cephalonica* × *A. nordmanniana*, ktorý zaostával za kontrolou o 1,3 cm. Najvýraznejší pokles vo výškovom raste sa však pozoroval v prípade medzidruhového hybridu *A. cephalonica* × *A. numidica*, ktorý zaostáva v hodnotách priemernej výšky za kontrolou *A. cephalonica* – samoopelenie viac ako o 3 m. V tomto prípade možno konštatovať úplnú absenciu heterózy.

Z vyššie uvedeného porovnania vyplýva, že maximum somatickej heterózy pripadá na obdobie 9 - 20 rokov s postupným poklesom jej prejavov vo veku 30 rokov. Pri ostatných hybridoch dochádza pravdepodobne k postupnému ustrnutiu ich výškového rastu. To však nič nehovorí o charaktere ďalšieho vývinu hybridov, ani o ich úžitkovosti na konci ťažobného obdobia. Jednoznačnú predstavu o dlhodobej výťažnosti hybridov a ich podmienenosti konkrétnymi podmienkami prostredia možno overiť iba na

základe dlhodobého pozorovania porastov na viacerých pokusných plochách a na pokročilejších vývinových štádiách



Čiastkový pohľad na trvalú výskumnú plochu s medzidruhovými hybridmi jedlí v Kamenci pod Vtáčnikom

Na základe sledovania výškového rastu hybridov jedle gréckej vo veku od 4 do 30 rokov je možné pozorovať určitý vzťah, ktorý s opatrnosťou umožňuje robiť čiastkové závery o výškovom raste z pohľadu zabezpečenia vývinu v mladšom veku. Ako uvádzajú nemeckí autori Rohmeder a Schönbach (1959) podľa prírastkov vo veku 10 - 15 rokov sa dá pomerne bezpečne usudzovať o dedične podmienených rastových schopnostiach hybridov.

Hybridné kombinácie, pri ktorých nie je potreba bádať pretrvávajúcu heterózu do vyšších ontogenetických štádií, predstavujú genofond, ktorého význam treba hodnotiť z pohľadu adaptačnej heterózy, hlavne so zreteľom na ich odolnosť k aridnému a znečistenému prostrediu. To je prípad hybridu *A. cephalonica* × *A. numidica*, ktorý napriek absencii heterózy zdá sa, že má také prednosti, akými sú odolnosť k imisiám a vyšším teplotám. Hybrid je nenáročný na pôdny substrát, čo môže mať veľký praktický význam v období prebiehajúcich klimatických zmien.

Genetické markery a ich využitie v lesnom hospodárstve

Lesy sú zložité, druhovo bohaté ekosystémy. V protiklade k stratégii využitia biodiverzity (biologickej diverzity, biologickej rozmanitosti) poľnohospodárskych plodín, pri lesných drevinách sa uchovanie biodiverzity zameriava na stabilizáciu rozmanitých lesných ekosystémov s druhmi s vysokou genetickou variabilitou. Takýto prístup môže zabezpečiť vyššiu životaschopnosť lesných ekosystémov v meniacich sa podmienkach prostredia. Zachovanie a zvyšovanie biodiverzity je implementované aj v strategických cieľoch a prioritách Národného lesníckeho programu Slovenskej republiky (Ministerstvo pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen, 2007).

Pri štúdiu genetickej variability a jej distribúcie pri lesných drevinách sa používajú predovšetkým biochemické markery. Biochemickými markermi sa nazývajú kvalitatívne vlastnosti, ktoré sa prenášajú do ďalších generácií (dedičné markery) a na ich detekciu sa používajú biochemické metódy. K biochemickým markerom patria sekundárne metabolity, bielkovinové markery a DNK markery. Jednotlivé typy markerov majú výhody a obmedzenia, ktoré je nutné brať do úvahy pri výbere vhodného genetického markera v jednotlivých štúdiách.



Genetické markery a ich využitie v lesnom hospodárstve

Radoslava Matúšová

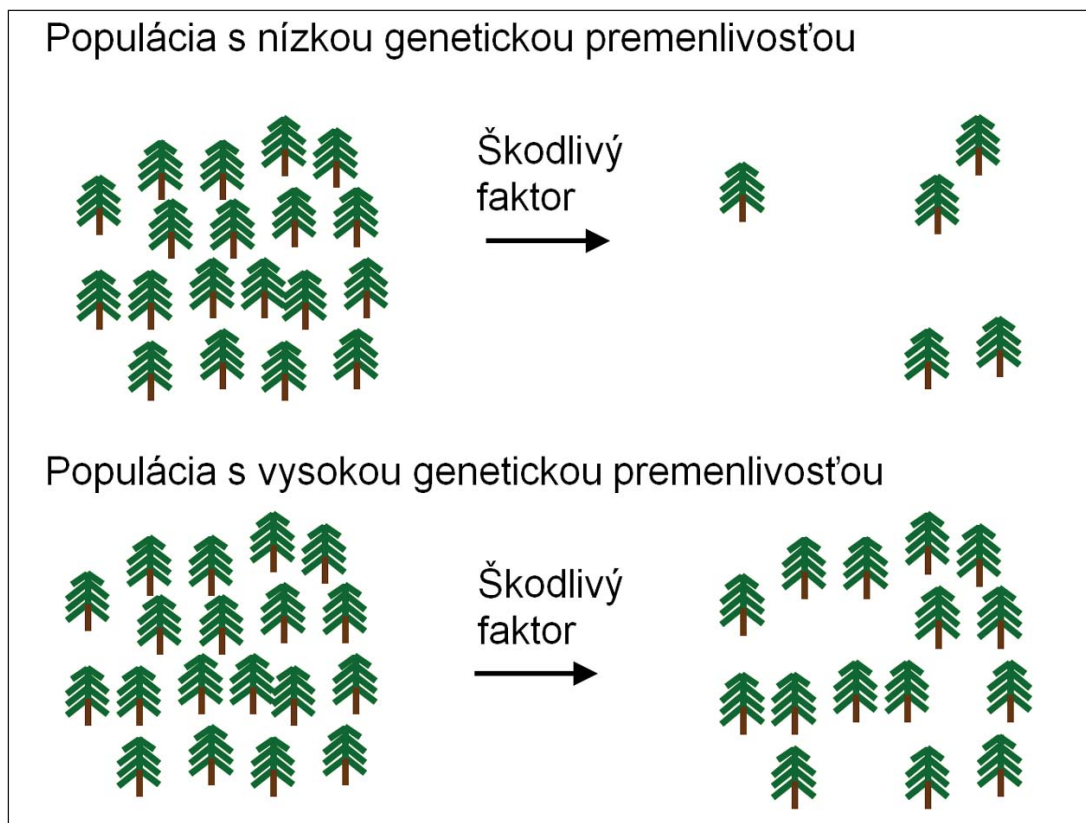
V koncepcii rozvoja lesného hospodárstva v rokoch 2007-2013 je dlhodobým cieľom udržanie a zlepšovanie zdravotného stavu, vitality a odolnosti lesných ekosystémov a zvyšovanie biologickej diverzity (biodiverzity alebo biologickej rozmanitosti). K prioritám lesného hospodárstva v rámci koncepcie na zvyšovanie biologickej diverzity patrí podpora ekologického obhospodarovania lesov, čo zahŕňa aj zlepšovanie ochrany lesných genetických zdrojov, udržiavanie, ochranu, obnovu a zvyšovanie biologickej rozmanitosti.



Ako vznikala biologická rozmanitosť druhov? Počas evolúcie dochádzalo k náhodným zmenám (mutáciám) v genómoch jedincov v rámci druhov. Tieto mutácie sa počas dlhých časových období potomstvom prenášali do ďalších generácií, dochádzalo k náhodnému kombinovaniu mutácií, časť mutácií sa nepreniesla do ďalších generácií. Niektoré vzniknuté mutácie boli (a sú) selektne neutrálne, iné prinášajú istú výhodu pre daného jedinca a jeho potomstvo. Ďalšou skupinou sú mutácie, ktoré sa stanú adaptačne výhodné až v zmenených podmienkach prostredia. Počet a typy týchto mutácií sa podieľajú na vzniku genetickej rozmanitosti v rámci jednotlivých druhov a ovplyvňujú životaschopnosť a prežívanie druhov. Výskumy ukázali, že strata, alebo zníženie genetickej diverzity sú významným faktorom ohrozujúcim adaptívny potenciál druhov v meniacich sa podmienkach prostredia.

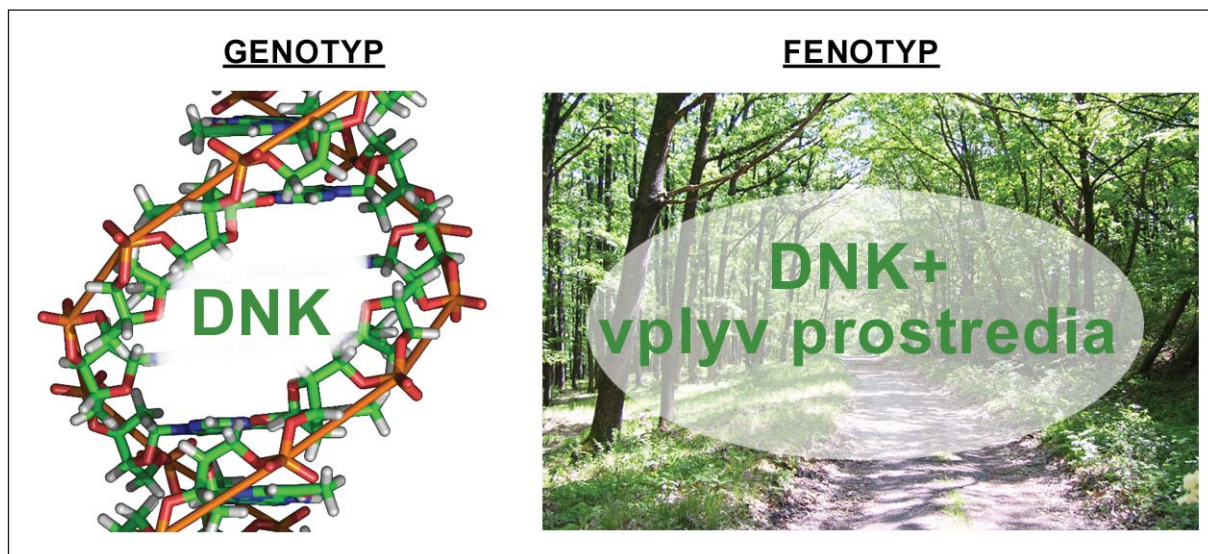
Genetická premenlivosť sa často sleduje na úrovni populácie. Pod pojmom **populácia** rozumieme skupinu jedincov toho istého druhu obývajúcú presne definovaný areál, ktorí sa môžu v rovnakom čase medzi sebou náhodne krížiť. Ak je genetická diverzita populácie nízka a objaví sa napríklad virulentné ochorenie, mnoho jedincov tejto populácie môže byť citlivých na ochorenie a uhynú. V prí-

pade populácie s vyššou genetickou diverzitou je väčšia pravdepodobnosť, že sa v populácii nachádzajú aj jedince, ktoré budú odolné k danému ochoreniu a k výraznému odumieraniu lesného porastu nedôjde (obr. 1).



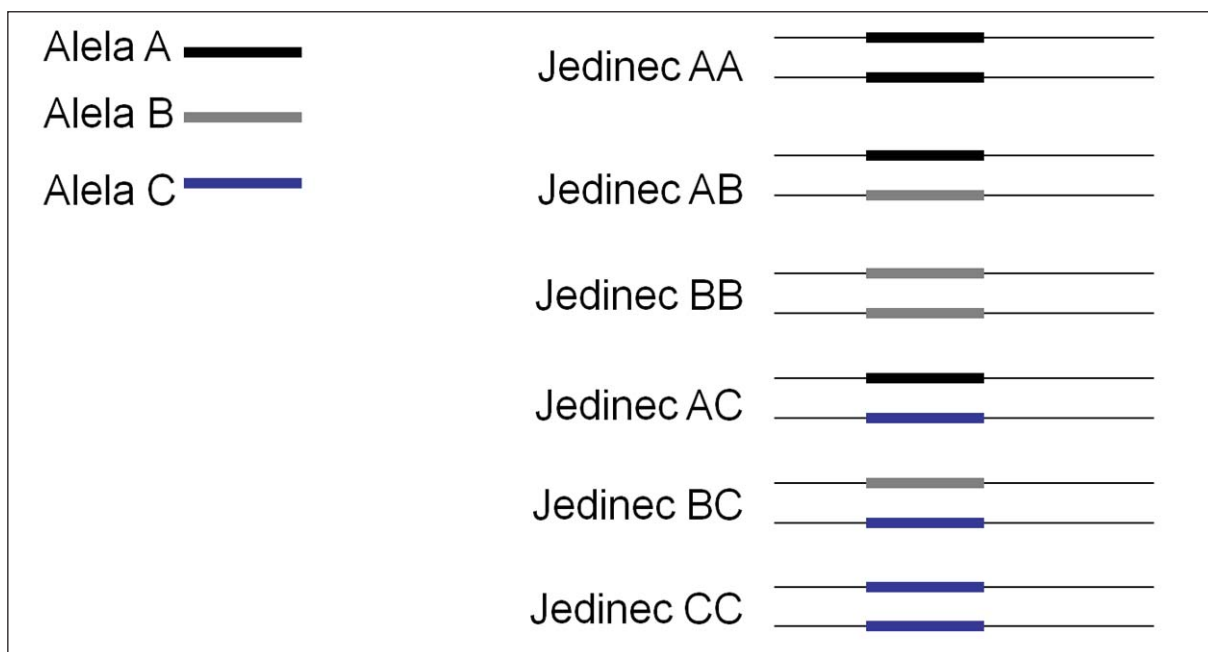
Obr. 1

Biologická rozmanitosť druhov sa pozoruje na fenotypovej a genotypovej úrovni. Súhrn znakov a vlastností jedinca, ktoré môžeme pozorovať, sa nazýva **fenotyp**. Tieto vlastnosti má každý organizmus zapísané vo forme genetickej informácie. Genetická informácia o vlastnostiach každého jedinca sa nazýva **genotyp**. Termín genotyp sa používa pre celkovú genetickú informáciu, ale genotypom sa nazýva aj časť genetickej informácie, ktorá sa týka sledovaného znaku.



Genetická informácia o všetkých vlastnostiach organizmu je daná poradím nukleotidov deoxyribonukleovej kyseliny (DNK). DNK je molekula tvorená stavebnými jednot-

kami, ktoré sa nazývajú nukleotidy. Štyri druhy nukleotidov tvoriacich DNK organizmu sú adenín (A), guanín (G), cytozín (C) a tymín (T). DNK molekula je tvorená dvomi špirálovite stočenými reťazcami nukleotidov. DNK sa nachádza v jadre, chloroplastoch a mitochondriách a každá bunka organizmu obsahuje rovnaké molekuly DNK. Celková DNK organizmu sa nazýva **genóm**. Reťazec DNK možno rozdeliť na kratšie úseky DNK s rôznymi funkciami. Niektoré úseky sa nazývajú gény. Sú to oblasti DNK, ktoré majú presne určenú funkciu a aj presné miesto na reťazci DNK (**lokus**). Časť génov kóduje aminokyseliny, ktoré sú stavebnými jednotkami pre bielkoviny. Štruktúra bielkovín a ich vzájomné interakcie sú zodpovedné za viditeľné charakteristiky – fenotyp. Sekvencie nukleotidov, ktoré tvoria gén, sa môžu líšiť medzi rôznymi jedincami aj v rámci jedného jedinca môžeme zistiť rozdielne formy génov. Tieto rozdielne formy jedného génu sa nazývajú **alely**. Alely sa líšia poradím nukleotidov, ktoré ovplyvňujú aminokyselinové zloženie bielkovín. Väčšina lesných drevín je **diploidná**, to znamená, že každý jedinec má dve alely pre daný znak (obr. 2).



Obr. 2

Diploidné organizmy získavajú jednu kópiu každého génu od matky a jednu kópiu génu od otca. Gény (ich alely) zdedené od oboch rodičov môžu byť identické, v takom prípade je potomok homozygotný pre daný gén alebo vlastnosť. Alebo sa gény rodičov môžu líšiť a vtedy je potomok heterozygotný pre daný gén alebo vlastnosť.

Homozygot je jedinec, ktorý má rovnaké alely sledovaného génu (napr. dve alely typu A – genotyp AA).

Heterozygot je jedinec, ktorý má rozdielne alely sledovaného génu (jednu alelu typu A a jednu alelu typu B - genotyp AB). Alely sa môžu odlišovať jedným nukleotidom alebo viacerými nukleotidmi.

Mutáciami v genómovej DNK dochádza k zmenám poradia nukleotidov, čo sa môže prejaviť vo forme DNK polymorfizmu, ktorý môže byť využitý ako **marker**. V minulosti pojem marker predstavoval vlastnosť kódovanú jedným génom pri ktorom k identifikovateľnej zmene dochádza mutáciou v jednom géne. Zároveň daný gén mal niekoľko alel, a tieto alely sa dali odlíšiť. V súčasnosti sa markerom stávajú aj sekvencie DNK, ktoré nekódujú žiadnu identifikovateľnú vlastnosť, ale markerom sú samotné zmeny sekvencie DNK, ktoré detegujeme priamo (DNK markery). Zme-

nou v poradí nukleotidov DNK môže dôjsť k zmene zloženia aminokyselín v bielkovine. Táto zmena v poradí aminokyselín môže spôsobiť zmenu funkcie bielkoviny, alebo zmenená bielkovina prestane plniť svoju úlohu v organizme (bielkovinové markery, izoenzymové markery). Pri monogénne podmienených znakoch dochádza k identifikovateľnej zmene na základe mutácie v jednom géne. Poznáme aj polygénne podmienené znaky, pri ktorých nevieme určiť, či výsledný fenotyp je výsledkom zmeny v jednom géne, alebo vo viacerých génoch, ktoré sa spolupodieľajú na výslednej zmene vlastností. Polygénne podmienené znaky preto nie sú vhodné pre zisťovanie genetickej rozmanitosti.

GTCGGAT G CGGAACGGAGCA GTCGGAT T CGGAACGGAGCA	Pôvodná sekvencia nukleotidov Zámena nukleotidov
GTCGGATGCG GAAC GGAGCA GTCGGATTCTG GGAGCA	Pôvodná sekvencia nukleotidov Strata nukleotidov
GTCGGATGC GGAACGGAGCA GTCGGATTCTGC GGAACGGAGCA	Pôvodná sekvencia nukleotidov Vloženie nukleotidov
GTCGGATG CGGAACGGAGCA GTCGGATG TG CGGAACGGAGCA	Pôvodná sekvencia nukleotidov Duplikácia nukleotidov
GTCGGA TGC GGAACGGAGCA GTCGGA CGT GGAACGGAGCA	Pôvodná sekvencia nukleotidov Otočenie poradia nukleotidov

Príklady najčastejších mutácií (zmien) v poradí nukleotidov (A,T,C, G) v reťazci DNK.

Aby bolo možné použiť zmeny v zložení DNK alebo bielkovín ako markery, musia spĺňať niekoľko požiadaviek:

- Základnou vlastnosťou je polymorfnosť markera, ktorá je presne detekovateľná. To znamená, že zmenené poradie nukleotidov v molekule DNK alebo zmenené poradie aminokyselín (stavebných častí bielkovín) musí byť detekovateľné pomocou zvolenej metódy
- Rozdielne formy markera by mali byť jasne odlíšiteľné s vhodnými génovými frekvenciami
- Nevyhnutnou podmienkou sú aj vhodné metódy na analýzy veľkých populácií potomstva
- Analýzy a výsledky by mali byť reprodukovateľné medzi rôznymi laboratóriami
- Významnú úlohu pri výbere vhodného markera zohráva aj ekonomičnosť a praktické ľahké použitie pri sledovaní markera
- V prípade využitia markerov v šľachtiteľskom procese je základnou podmienkou spoločné dedenie markera s danou šľachtenou vlastnosťou v potomstve

Pri výbere markera je nevyhnutné zistiť, či sa jedná o dominantný, alebo recesívny znak. Dominantný znak potlačuje alebo skrýva prejav recesívneho znaku. Dominantná alela sa zvyčajne označuje veľkým písmenom (A) a recesívna alela malým písmenom (a). V prípade, že má jedinec dve rovnaké dominantné alely typu A (homozygot AA), pozorujeme prejav A. Ak má jedinec jednu dominantnú alelu (A) a jednu recesívnu alelu (a) (heterozygot Aa), pozorujeme iba prejav dominantnej alely A, pretože prejav recesívnej alely je potlačený. Ak má jedinec obe alely recesívne typu a (homozygot aa), pozorujeme prejav recesívnej alely a. Z uvedeného vyplýva, že pri vzťahu domi-

nantný-recesívny nevieme určiť, či jedinec s prejavom znaku A má alely typu AA alebo Aa (obr. 3). Táto vlastnosť obmedzuje využitie dominantno-recesívnych markerov v niektorých genetických štúdiách.



Obr. 3 - Príklad vzťahu génov dominantný-recesívny (hrach siaty).

1. Morfologické markery

Pri štúdiu genetickej variability a jej distribúcie pri lesných drevinách sa používajú spravidla morfologické a biochemické markery.

Genetické markery morfologickej povahy sú zvyčajne mutanty, ktoré sa spon-tánne vyskytujú v populácii. V prírode sa vyskytujú len vzácné a preto je ich využitie značne obmedzené. Ako príklad možno uviesť albinizmus semenáčikov, ktorý je monogénne podmienený a v lesníckej praxi sa často používal ako genetický marker. Ako morfologické markery sa využívali aj zmeny vo veľkosti a tvare semenáčikov. Pozorovaný trpasličí alebo kríčkovitý vzrast semenáčikov môže byť takisto podmienený mutáciou jedného génu.

Nevýhodou morfologických markerov je skutočnosť, že je prejav daného morfologického znaku často ovplyvnený inými génmi alebo prostredím. Preto je nutné pestovať semenáčky v rovnakých podmienkach, aby sme vylúčili vplyv prostredia na morfologický prejav daného znaku. Väčšina morfologických znakov sa dá určiť až na základe analýzy celej rastliny. Morfologický znak je často výsledkom spolupôsobenia viacerých génov a kombinovaný vplyv takýchto génov limituje počet vhodných morfologických markerov. Recesívne alely génov pre morfologické charakteristiky sú spravidla v homozygotnom stave letálne a teda nedetekovateľné. Zvyčajne je veľmi málo lokusov vhodných pre štúdium akéhokoľvek rastlinného druhu, ich expresia

je dominantno-recesívna a len v malom počte prípadov vieme odlíšiť homozygota od heterozygota. V súčasnosti sa morfológické markery nevyužívajú z dôvodu existencie efektívnejších molekulárnych markerov.

2. Biochemické markery

Biochemickými markermi sa nazývajú kvalitatívne vlastnosti, ktoré sa prenášajú do ďalších generácií (dedičné markery) a na ich detekciu sa používajú biochemické metódy. Pri skúmaní genetickej premenlivosti populácií lesných drevín sa využívali sekundárne metabolity (napr. monoterpény), najviac sa však využívajú bielkovinové a DNK markery.

2.1 Monoterpény

Vysoký a nízky obsah niektorých monoterpénov je kontrolovaný jedným génom. Monoterpény sa môžu študovať vo všetkých vývinových štádiách od semenáčikov až po dospelé jedince a vo všetkých orgánoch, v ktorých sú prítomné. Nevýhodou monoterpénových analýz je pomerne veľká časová náročnosť, zvyčajne dominantno-recesívna dedičnosť a pre stanovenie charakteru dedičnosti nutnosť kontrolovaného kríženia s následnou analýzou potomstva. Najčastejšie sa využívajú na štúdium geografickej premenlivosti a na overenie hybridného pôvodu. Monoterpénové analýzy boli v minulosti využité pri štúdiu evolúcie rodu *Abies* v oblasti Stredomoria. Neskôr boli použité aj pri rozdelení proveniencií z takmer celého areálu rozšírenia jedle bielej do 4 skupín proveniencií: západná Európa, východná Európa, juhovýchodná Európa a oblasť južného Talianska. Monoterpénové analýzy však neumožnili rozlíšenie jednotlivých proveniencií.

2.2 Molekulárne markery

Ďalšou skupinou markerov sú bielkovinové markery a DNK markery. Nazývajú sa aj **molekulárne markery**. Pod pojmom molekulárny marker rozumieme sekvenciu DNK alebo bielkoviny, ktorá je identifikovateľná a teda prispieva k charakterizácii genetickej variability daného druhu.

Pri použití molekulárnych markerov sa genotyp dá určiť na základe analýzy rôznych typov pletív z rastliny. Možno použiť mladé a dospelé listy, zimné púčiky, peľ alebo semená. Z dôvodu ľahšej izolácie a následných analýz sa uprednostňuje izolácia mladých pletív. Mladé pletivá neobsahujú vysoké množstvá sekundárnych látok, ktoré sa musia pri izolácii DNK alebo bielkovín komplikovane odstraňovať. Molekulárne markery zvyčajne umožňujú analyzovať veľké množstvo alel pri použití minimálneho množstva materiálu (stačí jeden púčik alebo semeno). Veľkou výhodou často používaných molekulárnych markerov je kodominancia alel, čo umožňuje presne určiť genotyp daného jedinca v danom znaku.

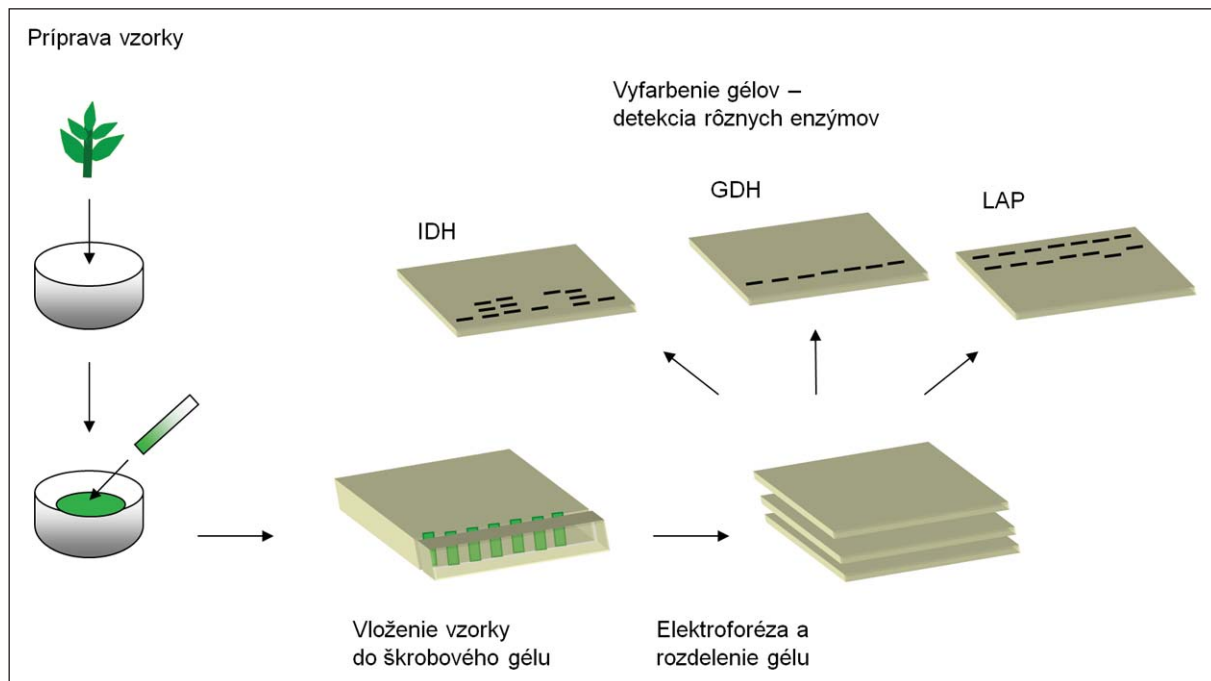
2.2.1 Izoenzýmy

Izoenzýmy sú bielkoviny, ktoré patrili v posledných desaťročiach k najčastejšie využívaným genetickým markerom v lesníckom výskume pre získanie informácií o genetickej štruktúre populácií lesných drevín. Prístrojové vybavenie a chemikálie pre analýzy sú relatívne lacné a je možné charakterizovať veľký počet jedincov v pomerne krátkom čase. Analýza je nedeštruktívna, pretože na charakterizovanie izoeným je potrebné len malé množstvo rastlinného materiálu.

Izoenzýmami sa nazývajú enzýmy, ktoré majú rovnakú enzymatickú funkciu

v organizme, ale líšia sa poradím aminokyselín. Výsledkom rozdielneho poradia aminokyselín môže byť zmena ich elektrického náboja, veľkosti a priestorového usporiadania molekuly. Tieto zmeny sa prejavujú po rozdelení bielkovín v špeciálnych škrobových alebo polyakrylamidových géloch a ich vizualizácii. Rozdelené bielkoviny pozorujeme ako farebné pružky nachádzajúce sa v géli v rôznej vzdialenosti od miesta, kde sa vzorka vložila do gélu. Pre mnohé analýzy izoenzýmov sa využívajú techniky škrobovej elektroforézy. Izoenzýmy sú priamo vizualizované farbením na géli. Použitím špeciálneho farbenia pre jednotlivé enzýmy sa vyfarbia a zviditeľnia iba izoenzýmy, ktoré majú v organizme rovnakú funkciu.

Pre izoenzýmové analýzy sa pri lesných drevinách najčastejšie používajú spiace púčiky, semená alebo mladé listy. Tento rastlinný materiál sa v špeciálne pripravenom roztoku rozdrví. Tak sa do roztoku uvoľnia bielkoviny. Bielkoviny sa potom v špeciálnom škrobovom alebo polyakrylamidovom géli za pomoci elektrického poľa rozdelia podľa veľkosti a elektrického náboja. Jednotlivé enzýmy sa potom farebne vizualizujú ponorením gélu do špeciálnych farbiacich roztokov. Zloženie farbiacich roztokov sa líši v závislosti od typu enzýmu (obr. 4).



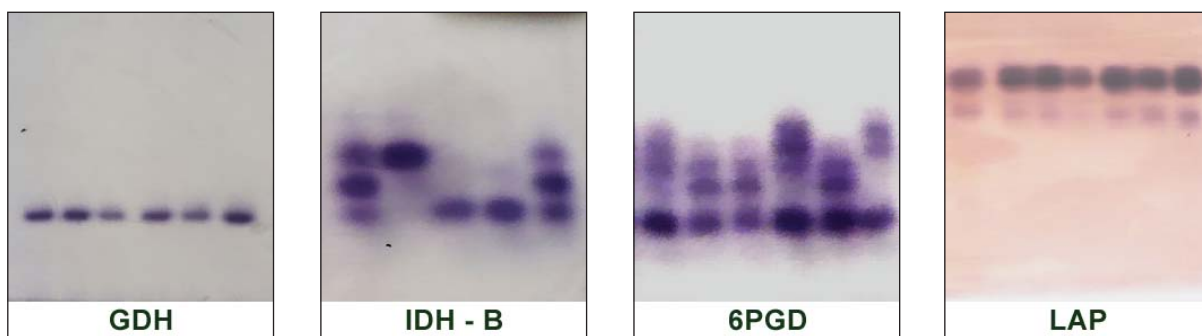
Obr. 4 - Schéma detekcie izoenzýmov použitím škrobového gélu.

Z izoenzýmových vzorov sa následne určujú alelické frekvencie pre jednotlivé enzýmy v populácii. Zisťuje sa, koľko jedincov v populácii má napríklad alelu A, koľko jedincov má alelu B. K základným parametrom patrí aj zisťovanie heterozygotnosti populácie. To znamená, že sa zisťuje koľko jedincov má obe alely rovnaké – homozygot AA alebo homozygot BB, alebo či má jedinec jednu alelu A a jednu alelu B (heterozygot AB). Počet vyfarbených pruhov závisí od typu enzýmu. Určí sa, či je izoenzým tvorený jedným reťazcom aminokyselín, alebo sa na vzniku funkčného enzýmu spájajú 2 alebo 4 reťazce aminokyselín. Na obr. 5 sú schématicky znázornené jednoduché vzory pruhov, ak sa v DNK organizmu pre daný enzým nachádza len jeden gén s dvomi možnými alelami.

Tieto vzory sa stávajú komplikovanejšie v prípade, že sa na vzniku aktívneho enzýmu podieľajú bielkoviny kódované viacerými génmi. Pre genetické štúdie tieto komplexné enzýmové vzory nie sú vhodné, pretože vyžadujú zdĺhavé analýzy.

Genotyp	AA	AB	BB
Enzým tvorený jedným reťazcom (monomér)	_____	_____	_____
Enzým tvorený dvomi reťazcami (dimér)	_____	_____	_____
Enzým tvorený dvomi reťazcami (dimér)	_____	_____	_____
Enzým tvorený štyrmi reťazcami (tetramér)	_____	_____	_____

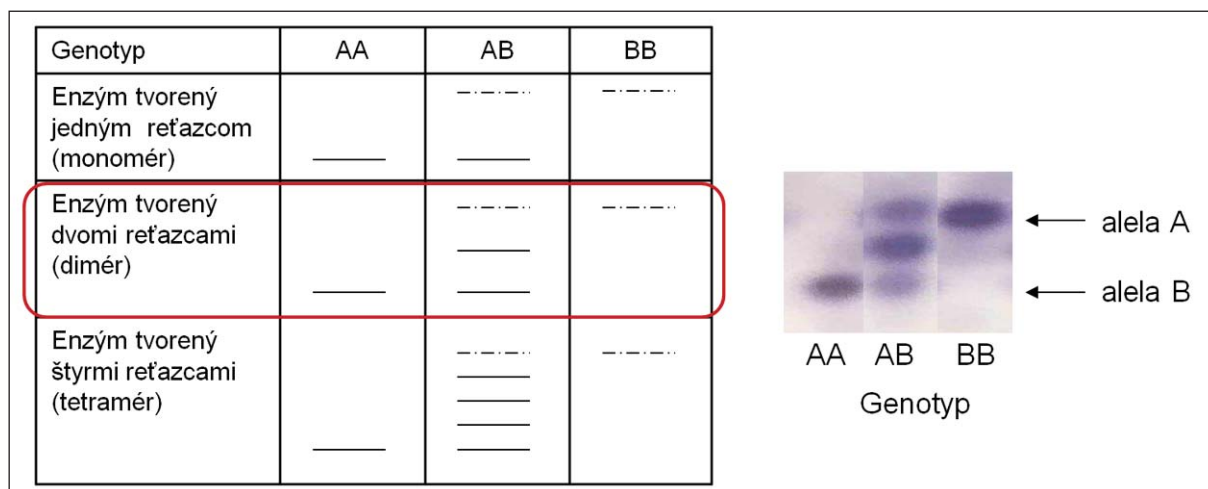
Obr. 5



Obr. 6 - Jednoduché typy izoenzymových vzorov. Ak má analyzovaný jedinec oba gény rovnaké (homozygot - AA alebo BB), tvorí iba jeden typ daného enzýmu. Ak má jedinec rozdielne gény (heterozygot – AB), počet prúžkov závisí od počtu reťazcov, ktoré tvoria funkčný enzým. Poloha prúžku závisí od veľkosti enzýmu a od elektrického náboja enzýmu.

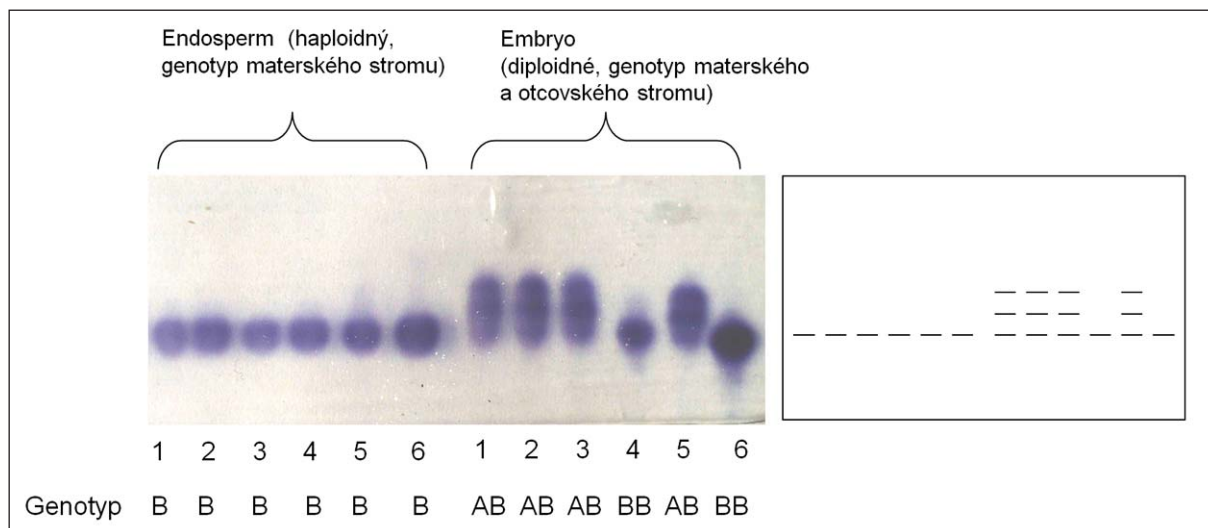
Pomocou analýzy väčšieho počtu jedincov potomstva sa zistí charakter a spôsob dedenia jednotlivých enzýmov. Iba tie typy enzýmov, pri ktorých sa zistí spôsob dedenia, sa ďalej využívajú ako genetické markery. Takto je identifikovaný veľký počet izoenzymových lokusov mnohých druhov drevín a naraz môže byť analyzovaný väčší počet vzoriek. Isoenzýmy sú kodominantné, čo znamená, že môžeme odlišiť homozygota (jedinca, ktorý má dve rovnaké alely) od heterozygota (jedinca má dve odlišné formy génu). Ďalšou výhodou je pomerne vysoká variabilita v izoenzymových lokusoch. Výhodou je i to, že izoenzýmy môžu byť v zásade analyzované z rôznych typov pletív. Je možné analyzovať veľké množstvo lokusov pri použití minimálneho množstva materiálu (zvyčajne stačí jeden púčik alebo semenko) a k prejavu mnohých enzýmov dochádza vo všetkých vývinových štádiách. Isoenzýmy môžeme určiť pri väčšine rastlinných druhov, bez ohľadu na ich tvar, veľkosť a dlhovekosť. Výhodou je aj náhodná distribúcia izoenzymových lokusov. Ďalšia výhoda vyplýva z charakteru semien ihličnatých drevín a ich využitia pre izoláciu a identifikáciu izoenzymov. Semená ihličnatých drevín majú endosperm (výživné pletivo v semene) haploidný a gény nachádzajúce sa v endosperme pochádzajú z materského jedinca. Embryo má gény materského a otcovského pôvodu. Aj izoenzýmy v endosperme sú rovnaké, ako sú v materských stromoch a v embryu sa nachádzajú typy izoenzymov pochádzajúce z materského stromu

a izoenzýmov z otcovského stromu. Analýzou endospermu a zodpovedajúceho embrya z toho istého semena je potom možné porovnať genetickú variabilitu rodičovskej generácie (materský strom a peľ otcovského stromu) a potomstva (embryá). Je známe, že enzým izocitrát dehydrogenáza (IDH) sa skladá z dvoch reťazcov bielkovín (obr. 7).



Obr. 7

Analýzou IDH izoenzýmov v semenách zozbieraných z jedného materského stromu možno určiť genotyp materského stromu pre daný enzým, genotyp peľu podieľajúceho sa na vzniku embrya a taktiež, či semeno vzniklo cudzoopelením, alebo samoopelením. Analýzou viacerých semien je možné určiť, či je materský strom homozygotný alebo heterozygotný v danom izoenzýme, to znamená, či má materský strom dve rovnaké alely pre daný znak, alebo dve rozdielne alely. Stačí analyzovať napríklad 6 semien pochádzajúcich z jedného stromu, aby sme s vysokou pravdepodobnosťou zistili genotyp daného materského stromu (obr. 8).



Obr. 8

Na obr. 8 je uvedený príklad pre lokus pre izocitrát dehydrogenázu (*Idh-B*). Bolo analyzovaných 6 semien z jedného stromu jedle bielej. Prvých 6 vyfarbených prúžkov predstavuje alely enzýmu IDH, ktoré boli detegované v 6 endospermoch (stĺpce 1-6). V stĺpcoch 7-12 sú vyfarbené izoenzýmy embryí. V stĺpci č. 1 je vyfarbený izoenzým detegovaný v endosperme semena č.1. V stĺpci č. 7 sú detegované izoenzýmy z embrya nachádzajúcom sa v semene č. 1. Z obrázku je zrejmé, že materský strom má genotyp BB. Embryá 1, 2, 3 a 5 vznikli cudzoopelením, pretože majú aj alelu A, ktorá

sa nenachádza v materskom strome. Embryá č. 4 a 6 mohli vzniknúť samoopelením, alebo aj cudzoopelením v prípade, ak mal otcovský strom vo svojom genotype pre daný enzým aj alelu B. Heterozygot AB má v strede hybridný prúžok, čo znamená, že daný jedinec má funkčný enzým zložený z jedného reťazca bielkoviny typu A a druhý reťazec typu B. Porovnaním údajov pre viaceré enzýmové systémy z rovnakých semenných vzoriek potom možno určiť, aký je podiel samo- a cudzoopelenia v analyzovaných vzorkách.

Izoenzýmy sa stále používajú ako genetické markery pre lesné dreviny. Sú lacnejšie v porovnaní s analýzami DNA, protokoly pre ich izoláciu, charakterizáciu a spôsob vyhodnotenia sú dobre prepracované. Typická je nízka hladina rozdielnosti medzi populáciami daného druhu. Pri izoenzymoch sa zvyčajne detegujú 1-3 prevládajúce alely s niekoľkými zriedkavými alelami. Predpokladá sa, že väčšina izoenzymov je selektívne neutrálna a ich počty (ich frekvencie) v populáciách sú výsledkom náhodných mutácií a posunov. Rozsah variability izoenzymov lesných drevín je využiteľný pre rôzne analýzy.

Využitie izoenzymov v lesnom hospodárstve

Izoenzýmy našli uplatnenie ako genetické markery jednotlivých stromov napríklad pri identifikácii rodičovských stromov a klonov, identifikácii hybridov, certifikácii komerčných vzoriek semien, overovaní kontrolovaných krížení, pri vyhodnocovaní genetickej efektívnosti semenných sádov a v neposlednom rade aj pri selekcii ekonomicky dôležitých znakov.

Pomocou izoenzymov nie je možné zistiť celkovú variabilitu daného jedinca, ale ak sa analyzuje dostatočný počet izoenzymov a ich lokusov, predpokladá sa, že variabilita zistená pomocou izoenzymov je porovnateľná s celkovou variabilitou daného jedinca. Izoenzýmy sa využívajú ako reprezentant celého genómu na **charakterizovanie genetickej štruktúry populácií**. Pod pojmom **genetická štruktúra** rozumieme nenáhodnú distribúciu alel alebo genotypov v priestore alebo čase, bez ohľadu na organizáciu genómu a meiotické procesy, ktoré tiež môžu ovplyvňovať frekvencie alel a genotypov. Táto priestorová a časová organizácia genetickej variability v rámci populácií rastlín vzniká spolupôsobením mutácií, migrácie, selekcie a genetického driftu. Lesné dreviny sú vo všeobecnosti charakterizované ako druhy s nízkou vnútropopulačnou variabilitou. Genetická variabilita v rámci druhu sa charakterizuje počtom rozdielnych alel v jednotlivých lokusoch a ich počty (frekvencie alel) medzi jedincami daného druhu charakterizujú genetickú štruktúru. Genetická štruktúra nie je v celom areáli rozšírenia druhu rovnaká, ale líši sa na rôznych lokalitách. K zmene genetickej štruktúry dochádza napríklad vplyvom adaptačnej selekcie na danom stanovišti, vzniku mutácií a ich rozšírením na danom stanovišti do ďalších generácií. Zmenu genetickej štruktúry spôsobuje aj genetický drift. **Genetický drift** je typ selekcie založený na náhode prenosu znaku pri produkcii potomstva a nezávisí od vlastností alebo prejavu daného znaku v danom prostredí. Genetickú štruktúru môže ovplyvniť aj náhodný tok génov (hlavne peľom) zo susedných populácií. Z uvedeného vyplýva, že dochádza k zmenám genetickej štruktúry populácií v priestore (predovšetkým tokom génov) a čase (alely prenášané do ďalších generácií). Analýza genetickej štruktúry umožňuje rekonštruovať migráciu lesných drevín z dlhodobého hľadiska, identifikovať oblasti, v ktorých jednotlivé populácie prežili doby ľadové a ako sa šírili späť až k osídleniu súčasného areálu rozšírenia daného druhu. Analýza genetickej štruktúry umožní identifikovať procesy, ktoré zohrali významnú úlohu pri vytváraní genetickej variability daného druhu a taktiež identifikuje umelo založený porast použitím semenného materiálu z inej geografickej oblasti. Ak je genetická štruktúra

populácií rovnaká alebo veľmi podobná v jednej oblasti, ale rozdielna v porovnaní s inými oblasťami, je možné použiť genetické markery na identifikáciu a odlíšenie týchto populácií, čiže možno identifikovať rôzne proveniencie.

Izoenzymové markery sa používajú na **stanovenie genetickej premenlivosti prirodzených populácií na úrovni populácií alebo druhu**. Analýzou genetickej premenlivosti populácií hľadáme zvyčajne odpoveď na dve základné otázky. Prvá sa týka popísania hladiny genetickej variability na úrovni populácií alebo druhu. Vnútropopulačná premenlivosť je najdôležitejšou charakteristikou populácií, pretože veľkosť a distribúcia variability určuje potenciál populácií adaptovať sa v meniacich sa podmienkach prostredia. Druhá sa týka rozdelenia genetickej variability na vnútropopulačnej a medzipopulačnej úrovni. Poznanie distribúcie genetickej variability je dôležité pri určovaní stratégie zachovania a ochrany genetických zdrojov.

Izoenzymy sa využívajú aj pri **zisťovaní systému párenia rastlinných druhov**. Podiel potomstva pochádzajúci zo samoopelenia a cudzoopelenia v každej generácii sú parametre, ktoré charakterizujú systém párenia. V prirodzených populáciách lesných drevín väčšina semien z jedného stromu spadne do okolia tohto stromu a tak sa vytvárajú oblasti geneticky príbuzných potomstiev v prirodzenej lokalite. Následné párenie medzi geneticky príbuznými stromami môže viesť k inbrídingu, inbrednej depresii, čo negatívne ovplyvňuje prežívanie a produkciu voľne opeleného potomstva. V lesníctve sa voľne-opelené semená často používajú na rast semenáčikov pre obnovu komerčných stanovišť a aj na charakterizáciu vplyvu selekcie na genetickú skladbu populácií. Systém párenia určuje stupeň príbuznosti v potomstvách takýchto populácií.

Izoenzymy sa využívajú aj v štúdiách skúmajúcich **evolučné vzťahy** medzi druhmi porovnávaním ich variability. Boli použité pri overovaní (zisťovaní) fylogenetického pôvodu polyploidných druhov. Izoenzymy poskytujú užitočné informácie aj pri skúmaní selekčného tlaku vyvolaného environmentálnymi podmienkami na rastlinné populácie. Izoenzymy boli využívané aj pri overovaní genetickej stability pleťových kultúr lesných drevín a regenerovaných jedincov. Izoenzymy môžu pomôcť aj šľachtiteľom pri vytváraní, vyhodnotení a selekcii žiaducich genotypov v skorých štádiách šľachtiteľského programu. Použitie týchto techník šetrí čas, priestor, úsilie a peniaze pre šľachtiteľa.

2.2.2 DNK markery

Pozornosť genetikov a evolučných biológov sa v poslednej dobe zameriava aj na možnosti využitia analýzy DNK pre genetické a populačné štúdie, pretože priama analýza DNK bez negenetickej variability poskytuje najvhodnejší spôsob určenia genetickej variability na vnútrodrohovej i medzidrohovej úrovni. Analýzy DNK v porovnaní s izoenzymovými analýzami umožňujú **mapovanie väčšieho počtu lokusov** s náhodnou distribúciou v genóme, v kódujúcich i nekódujúcich sekvenciách DNK.

V posledných dvoch desaťročiach sa veľa úsilia vložilo do vývoja nových technológií pre rýchle a lacné analýzy rastlinného materiálu s možnosťou charakterizovať veľký počet jedincov v krátkom čase. Počet rôznych typov DNK markerov sa neustále rozširuje. Každým typom markera a metódy detegujeme variabilitu, ale rozdielného typu a v rozdielnych oblastiach genómu. Výber vhodného markera a metódy závisí aj od komplexnosti genómu. Výber metódy závisí aj od cieľa, ktorý chceme použitím markera dosiahnuť. Mnohé typy markerov sú zatiaľ v štádiu experimentálneho overovania. Ich využitie je však viazané na finančne náročnejšie vybavenie laboratórií, prístrojové a prevádzkové náklady.

RFLP a **RAPD** metódy sa v minulosti využívali na zisťovanie DNK polymorfizmu (RFLP) a pri charakterizácii jednotlivých druhov a pri overovaní hybridov (napr. RAPD). Nakoľko je ich využitie obmedzené, v tejto kapitole popíšeme iba tie DNK markery, ktoré sa v súčasnosti najčastejšie používajú pri riešení otázok lesného hospodárstva na Slovensku a aj v zahraničí.

Mikrosatelity alebo SSR markery

Mikrosatelity alebo opakovania jednoduchých sekvencií (SSR, z angl. Simple Sequence Repeat) sú krátke sekvencie pozostávajúce zvyčajne z 2-6 nukleotidov, ktoré sa v genóme na istom úseku tandémovo (za sebou) opakujú. Počet opakovaných sekvencií medzi jedincami sa môže líšiť a variabilita v počte krátkych opakovaných sekvencií sa využíva ako DNK marker.

Príklad mikrosatelitných sekvencií DNK a ich alel:

Alela A --CGTGACGATATATATATATATATATCGCATGATC--
Alelu A tvorí mikrosatelit zložený z 9 opakovaných sekvencií nukleotidov AT

Alela B --CGTGACGATATATATATATATATATATATATCGCATGATC--
Alelu B tvorí mikrosatelit zložený z 11 opakovaných sekvencií nukleotidov AT

Alela C --CGTGACGATATATATATATATATATATATATATATATATATCGCATGATC--
Alelu C tvorí mikrosatelit zložený z 12 opakovaných sekvencií nukleotidov AT

Miesto, kde sa daný mikrosatelit na reťazci DNK nachádza sa nazýva lokus a varianty mikrosatelitu charakterizované rozdielnou dĺžkou opakovaných sekvencií sa nazývajú alely.

Princíp analýzy mikrosatelitných markerov je podobný ako pri izoenzymových analýzach. Z rastlinného materiálu (najčastejšie spiace púčiky, ihlice, listy alebo semená) sa špeciálnou metódou získa DNK. Mikrosatelitné oblasti DNK sa namnožia (amplifikujú) pomocou metódy na vytvorenie veľkého množstva kópií špecifického úseku DNK. Táto metóda sa nazýva polymerázová reťazová reakcia (aj v slovenskej literatúre sa používa skratka PCR, ktorá je odvodená od anglického názvu metódy). Namnožené úseky DNK sa rozdelia v polyakrylamidovom géli a s pomocou značiek na zistenie veľkosti neznámych fragmentov sa z gélu určia počty nukleotidov namnožených fragmentov. Pri dobrom rozdelení na géli možno rozlíšiť fragmenty s rozdielom 1-2 nukleotidov v dĺžke fragmentu.

Aké sú možnosti ich využitia v praxi? Podobné ako pri použití izoenzýmov. Výhodou mikrosatelitných markerov v porovnaní s izoenzýmami je, že pri analýze mikrosatelitných oblastí detegujeme úseky DNK, u ktorých sa predpokladá, že sú väčšinou selektne neutrálne. Pri mikrosatelitoch bol nájdený veľký počet alel s nízkymi frekvenciami, alebo alely, ktoré sa vyskytovali len v jednej populácii a v iných populáciách sa nedetegovali. Sú to charakteristiky využiteľné pri zisťovaní genetických vzťahov medzi populáciami a aj medzi jednotlivými stromami. Taktiež bol zistený vyšší počet alel mikrosatelitných oblastí v porovnaní s počtom alel izoenzýmov, čo umožňuje podrobnejšiu a presnejšiu analýzu napríklad toku génov v populáciách alebo systému párenia. Ak sa jedna alela v populácii nachádza s vysokou frekvenciou a ostatné alely s nízkou frekvenciou, potom je populácia charakterizovaná nízkym stupňom heterozygotnosti

v danom lokuse, pretože väčšina jedincov bude homozygotná pre daný znak. V takom prípade sa ani nedá zistiť podiel samo- a cudzoopelenia, nakoľko aj materské aj otcovské genotypy sú s vysokou pravdepodobnosťou v sledovanom lokuse identické. V prípade mikrosatelitov sa zvyčajne v populácii nachádza viac alel v lokuse, a aj očakávaná heterozygotnosť v lokuse je vyššia, a teda aj pravdepodobnosť identifikácie pôvodu potomstva zo samoopelenia, alebo cudzoopelenia.

Rodičovské a príbuzenské analýzy sa používajú aj na charakterizáciu stanovišťa. V prípade, že sa semená zbierajú priamo zo stromu, matersky rodič a jeho genotyp je známy. DNK markery sa môžu využiť pri identifikácii otcovského genotypu. Je možné zistiť, či semenné potomstvo vzniklo opelením peľom z jedného stromu, alebo v čase kvitnutia materského stromu boli v jeho blízkosti viaceré stromy, ktorých peľ bol úspešný pri opelení materského stromu. Charakterizovanie príbuzenských vzťahov na lesných stanovištiach napomáha pri charakterizovaní kvality semenného materiálu z hľadiska zachovania genetickej variability. Pomocou genetických markerov sa dá zistiť, či zozbieraný semenný materiál reprezentuje genetickú variabilitu daného stanovišťa. Vhodný marker umožní odvodenie rodičovského genotypu z genotypu potomstva. Genotypy rodičovských stromov umožnia jednoznačnú identifikáciu jednotlivých rodičovských stromov stanovišťa. Je to možné v prípade, ak akékoľvek dva stromy, ktoré môžu potenciálne tvoriť potomstvo sa líšia aspoň v jednej alele. Vhodné markery sú izoenzymy, ktoré majú veľký počet kodominantných jednolokusových markerov a jadrové mikrosatelity, ktoré majú veľký počet alel a sú kodominantné.

Význam mikrosatelitných markerov je overený aj pri kontrole kvality reprodukčného materiálu pre komerčné účely, či už pre zisťovanie dostatočne rozsiahlej genetickej variability alebo mikrosatelity môžu byť využité aj pre detekciu kontaminácií semenného materiálu. Pri komerčnom predaji semien a rastlín je dôležité dodanie geneticky charakterizovaného reprodukčného materiálu. Pre organizácie a firmy, ktoré sa zaoberajú predajom semien a rastlín je dôležité vedieť, či ich reprodukčný materiál (semená aj semenáčky) je kvalitný z pohľadu adaptačného potenciálu. Genetická certifikácia môže pomôcť pri overovaní takejto kvality. Táto verifikácia môže zahŕňať kvantifikáciu genetickej variability, monitorovanie príbuzenského kríženia, overenie, resp. detekciu geografického pôvodu. Z uvedeného dôvodu sa niektoré výskumy a výskumné úlohy zameriavajú na vypracovanie rýchlych a efektívnych metód založených na molekulárnych markeroch na zisťovanie genetickej variability v lesných škôlkach. V jednom z takýchto výskumov sa vedci zamerali na zisťovanie genetickej variability pri dube zimnom (*Quercus petraea*, Matt., Lieb.). Duby, ako aj iné dlhožijúce lesné dreviny potrebujú dostatočný rozsah genetickej variability na to, aby sa adaptovali ku komplexným heterogénnym podmienkam prostredia. Pomocou mikrosatelitných oblastí v jadre zistili vysoký počet rozdielnych alel v jednotlivých lokusoch. Tento počet je oveľa vyšší ako počet alel izoenzymov. Mikrosatelity boli využité aj pri zisťovaní a kvantifikácii možného inbrídingu, čo je dôležitý parameter pri overovaní genetickej kvality reprodukčného materiálu.

Pomocou genetických markerov a provenienčných výskumov možno skúmať adaptáciu lesných drevín na zmenu stanovištných podmienok. Taktiež možno lepšie pochopiť dôsledky zmien spôsobených zásahmi do lesných porastov. Porovnaním lokalít s prirodzenou obnovou a susediacich lokalít obhospodarovaných lesov možno zistiť vplyv obhospodarovania na zmenu genetickej štruktúry lesa. Získané údaje z lesných porastov môžu byť pomocou rôznych simulačných programov využité na predpovedanie genetickej štruktúry týchto populácií po niekoľkých generáciách.

DNK sa nachádza v niekoľkých bunkových organelách. Nachádza sa v jadre,

v chloroplastoch a v mitochondriách. DNK v jadre pochádza od oboch rodičov. DNK v chloroplastoch ihličnatých drevín pochádza iba z otcovského stromu, mitochondriálna DNK z materského stromu, pretože pri vývine semien ihličnanov dochádza k odstráneniu chloroplastov materského stromu a mitochondrií otcovského pôvodu. Paternálna dedičnosť chloroplastov (a chloroplastovej DNK) sa s úspechom využíva pri overovaní hybridného pôvodu medzidruhových hybridov jedlí a iných drevín. Chloroplastové mikrosatelity sú vhodnými markermi aj pre analýzu geografickej variability. Mitochondriálne markery vzhľadom na maternálnu dedičnosť pri väčšine ihličnanov sú vhodným nástrojom pre charakterizáciu lesného reprodukčného materiálu.

Vplyvom ľudských aktivít dochádza k zmenám genetickej štruktúry lesných porastov. K zmenám môže dôjsť napríklad prenosom semien. Zalesňovanie so semenným materiálom pochádzajúcim zo vzdialených lokalít môže úplne eliminovať variabilitu nachádzajúcu sa na danom stanovišti po mnohé generácie. Peľom a prenosom semien môže introdukovaný materiál následne ovplyvniť aj štruktúru susediacich prirodzených lokalít. Introdukované stanovištia sú zvyčajne menej adaptované pre danú lokalitu než prirodzené porasty a preto intenzívna introdukcia semenného a rastlinného materiálu z environmentálne veľmi odlišných lokalít znamená potenciálne riziko pre prežívanie takýchto porastov.

V posledných rokoch sa do popredia dostáva identifikácia a charakterizácia prirodzených lesných porastov z dôvodu zachovania genofondu lesných drevín. Prirodzené lokality sú považované za hodnotné genetické zdroje a ich zachovanie je začlenené do mnohých národných programov zachovania genofondu. Jednotlivé krajiny Európskej Únie majú na základe Smernice 1999/105/EC vypracované regulačné mechanizmy pre získavanie a prenos lesného reprodukčného materiálu a možnosti ich použitia. Vysoký dôraz sa kladie aj na vyhodnotenie vhodnosti prenosu semenného materiálu do iných lokalít.

V danom kontexte sú mikrosatelitné markery vhodným nástrojom na genetickú charakterizáciu lesných porastov, ako aj lesného reprodukčného materiálu. Výber mikrosatelitných markerov (jadrové, chloroplastové alebo mitochondriálne) bude závisieť od cieľa, aké údaje chceme analýzou získať.

Techniky *in vitro* a ich využitie pri lesných drevinách

Pod pojmom *in vitro* techniky rozumieme metódy kultivácie rastlinných buniek, pletív a orgánov, izolovaných od materského organizmu a kultivovaných v umelých podmienkach (*in vitro*, latinsky „v skle“).

Tieto techniky od začiatočných štádií vzniku prešli značným vývojom a stali sa pevnou súčasťou experimentálnej botaniky.

V poslednom období sme svedkami ich prenikania do spoločenskej praxe a v súčasnosti sa považujú za vhodný spôsob vegetatívneho rozmnožovania veľkého počtu rastlinných druhov, významných z hľadiska poľnohospodárstva, záhradníctva a lesníctva.

Princíp techník spočíva v izolácii určitej, teoreticky ľubovoľnej časti rastlinného organizmu (explantát) a v jej kultivácii na umelých živných médiách v simulovaných podmienkach v kultivačných miestnostiach. Manipuláciou kultivačných podmienok (zloženie živného média, svetelné a teplotné pomery v kultivačnej miestnosti) môžeme usmerniť ďalší vývin izolovaného rastlinného pletiva.

Cieľom kultivácie, najmä z praktického hľadiska je získanie celistvej rastliny a po krátkej adaptácii prenos do prírodných podmienok. Pomocou týchto techník sa podarilo vegetatívne rozmnožiť značný počet rastlinných druhov, vrátane listnatých a ihličnatých drevín.

Techniky *in vitro* sú založené na poznatku, že všetky diferencované (špecializované podľa štruktúry, funkcie a vzájomných vzťahov) bunky rastlinného organizmu, napriek odlišným funkciám, obsahujú kompletnú genetickú informáciu a každá rastlinná bunka je totipotentná, t.j. schopná za určitých podmienok *in vitro* vytvoriť nový celistvý organizmus, nového jedinca.

Podľa cieľa je potrebné zvoliť vhodnú techniku *in vitro* a zamerať sa na jej rozpracovanie pri konkrétnom rastlinnom druhu. Zvolená technika a ďalšie faktory, ktoré pôsobia v podmienkach *in vitro* účinne vplyvajú a ovplyvňujú výsledný efekt regenerácie *in vitro*.



Techniky *in vitro* a ich využitie pri lesných drevinách

Terézia Salaj, Mária Gabriela Ostrolucká

1. Podmienky *in vitro* kultivácie rastlinných explantátov

Terézia Salaj

In vitro kultivácia rastlinných explantátov vyžaduje špecifické podmienky, ktoré sa musia prísne dodržiavať, aby sme dosiahli úspešnú regeneráciu rastliny.

Kultivácia prebieha na živných médiách, ktoré majú presne definované zloženie. Živné médiá obsahujú makroelementy (dusík, fosfor, horčík, draslík, síra) a mikroelementy (bór, mangán, jód, molybdén, železo, meď). Makroelementy sa používajú vo forme anorganických solí (približné množstvá 0,17 až 1,9 g.l⁻¹) a mikroelementy sa pridávajú buď ako bežné soli v mikromnožstvách (mg) alebo v modifikovanej forme (napr. železo sa pridáva v chelátovanej forme, tiež v mikromnožstve).



Kultivačná miestnosť

Dôležitou súčasťou živných médií sú rastové regulátory alebo rastové látky či fytohormóny. Jedná sa o chemické zlúčeniny, ktoré sa vyskytujú v rastlinnom organizme a majú regulačnú úlohu. Syntetizujú sa v určitej časti rastlinného organizmu a pomocou vodivých dráh (cievných zväzkov) sú transportované na miesto ich účinku. V rastlinách sa identifikovali viaceré takéto zlúčeniny, ktoré dostali názov prírodné (natívne) rastové regulátory. Popri nich sa podarilo syntetizovať ďalšie zlúčeniny, ktoré majú podobný účinok a nazývajú sa syntetické rastové regulátory.

Rastové regulátory sú súčasťou takmer všetkých živných médií pri *in vitro* kultivácii a zohrávajú veľmi dôležitú úlohu pri regulácii vývinu explantátov. Uvedieme najdôležitejšie skupiny rastových regulátorov, ktoré sa najčastejšie používajú pri príprave živných médií:

Auxíny - do skupiny prírodných auxínov patria kyselina beta-indolyl octová (IAA), kyselina beta-indolyl maslová (IBA). Syntetickými analógmi sú kyselina alfa-naftyloctová (NAA) a kyselina 2,4-dichlófenoxyoctová (2,4-D).

V *in vitro* kultúrach sa auxíny používajú na indukciu adventívnych koreňov (IAA, IBA) alebo na indukciu kalusu (NAA, 2,4-D). 2,4-D je účinnou zlúčeninou pri indukcii somatickej embryogenézy.

Cytokiníny - k natívnym cytokinínom patria zeatín (ZEA), N⁶-(izopentyladenín, 2-iP), 6-benzylaminopurín (BAP). K veľmi účinným syntetickým analógom zaraďujeme kine-tín (KIN) a tidiazurón (TDZ).

Cytokiníny stimulujú bunkové delenie, preto sa v kombinácii s auxínmi používajú na indukciu kalusu. Najdôležitejšiu úlohu zohrávajú pri indukcii adventívnych púčikov a stimulácii vývinu axilárnych púčikov. Ich známou funkciou je aj prevencia senescencie (starnutia).

Giberelíny - v súčasnosti poznáme niekoľko desiatok giberelínov, ale najdôležitejším zástupcom tejto skupiny je natívna kyselina giberelová (GA₃). V *in vitro* kultúrach sa používa na predlžovanie indukovaných výhonkov.

Kyselina abscisová (ABA) je natívny rastový regulátor. Používa sa najmä na stimuláciu vývinu somatických embryí.

In vitro kultivované explantáty nie sú autotrofné, a preto do média sa pridáva zdroj uhlíka, najčastejšie vo forme sacharidov v koncentrácii 2 až 5% (disacharidy ako sacharóza, maltóza, ale vo výnimočných prípadoch aj monosacharidy glukóza alebo fruktóza). Ak sa už dosiahla kompletná regenerácia rastliny, postupne sa môže znižovať obsah sacharidov v médiu, a tým sa rastliny pripravujú na autotrofný rast.

Rastlinné explantáty môžu syntetizovať niektoré dôležité **vitamíny**, ale pre ich lepšiu rast sa do média niektoré vitamíny pridávajú, najčastejšie zo skupiny B (B₁ tiamín, B₂ riboflavín a B₆ pyridoxín). Myo-inozitol sa pridáva v relatívne vysokom množstve (100 až 200 mg.l⁻¹) a považuje sa za nutričnú látku. Na stimuláciu rastu sa môžu tiež pridávať jednotlivé **aminokyseliny** (glycín, glutamín.). Do živných médií sa pridávajú ešte rôzne iné zlúčeniny, ktorých úloha nie vždy je úplne jasná, ale empiricky sa pozorovalo, že stimulujú rast explantátov a ich diferenciáciu v želanom smere (napr. extrakty z rastlinných plodov, kokosové mlieko, kvasnicový extrakt).

Na prípravu živných médií sa používa dvakrát predestilovaná voda a na ich spevnenie agar (z morských rias, špeciálne upravený) alebo synteticky vyrobené látky, ktoré majú vlastnosť gelifikácie (phytagel, gelrite). Hodnota pH média sa upravuje vo väčšine prípadov na 5,6 - 5,8.

In vitro kultivácia sa uskutočňuje za prísne sterilných podmienok, preto všetky nástroje, ktoré používame na izoláciu explantátov (skalpel, preparačné ihly, pinzety) musia byť sterilné. Média sa sterilizujú autoklávaním. Príprava explantátov sa uskutočňuje v tzv. sterilných boxoch a ich kultivácia v kultivačných miestnostiach, kde je zabezpečený stály svetelný a teplotný režim.

Mikrorozmnožovanie je alternatívna biotechnologická metóda vegetatívneho rozmnožovania rastlín v podmienkach *in vitro*. Pri tomto spôsobe mikrorozmnožovania sa kultúry zakladajú z malých, často miniatúrnych kúskov (segmentov) pletív, z čoho je odvodený názov mikrorozmnožovanie (mikropropagácia). Na uskladnenie materiálu potrebujeme relatívne malý priestor. Rozmnožovanie sa uskutočňuje v aseptických podmienkach bez patogénov, ktoré v prírodných podmienkach často nepriaznivo pôsobia na vývin rastlín. Veľkou výhodou tejto metódy je, že celý vývino-



Príprava explantátov v sterilných boxoch.

vý cyklus rastliny (od založenia aseptickkej kultúry až po regeneráciu celej rastliny) sa uskutočňuje v kontrolovaných podmienkach s vylúčením rušivých vplyvov klimatických faktorov, nezávisle na vegetačnom období a pod.

2. Perspektívne techniky mikrorozmnožovania

Mária Gabriela Ostrolucká

Z najčastejšie používaných techník mikrorozmnožovania, ktoré umožňujú zachovať pôvodný genotyp rastliny a produkciu, tzv. klonového potomstva sú uvedené techniky.

Meristémová kultúra predstavuje kultiváciu izolovaných meristémov, ktoré sa využívajú ako primárne explantáty. Izolácia meristému rastových vrcholov z apikálnych (terminálnych) a laterálnych (bočných) púčikov sa uskutočňuje v aseptických podmienkach (pod lupou). Izolácia meristému vyžaduje technickú zručnosť (veľkosť meristému 0,2 – 0,5 mm, často v priemere menšia ako 0,1 mm). Vzhľadom na obťažnosť manipulácie izolujeme meristém z púčikov s jedným až dvomi párami listových primordií (zárodok listov). Veľkosť explantátu určuje aj jeho životaschopnosť a prežitie v kultúre *in vitro*. Meristém koreňa sa využíva ojedinele, len pri niektorých rastlinných druhoch. Priamou regeneráciou meristému získame množstvo výhonkov - viacvýchonkovú kultúru. Izolované výhonky môžeme zakoreniť alebo opäť kultivovať pre ďalšiu proliferáciu axilárnych (pazušných) výhonkov. Meristémová kultúra je regeneračný systém, ktorý umožňuje nielen masovú produkciu geneticky stabilných a identických rastlín, ale aj ozdravenie rastlín a produkciu bezvírusových rastlín, ako aj následné rozmnoženie ozdraveného rastlinného materiálu.

Kultúra rastových (vegetačných) vrcholov. Rastový vrchol je primárnou oblasťou výhonku, ktorá podmieňuje vznik celej rastliny. Izolovaný rastový vrchol ako primárny

explantát môžeme kultivovať bez prerušenia jeho organizovaného rastu. Pri kultivácii rastového vrcholu na kultivačnom médiu s obsahom cytokinínov sa v pazuchách listových primordií diferencuje značné množstvo axilárnych púčikov a výhonkov. Multiplikované výhonky môžu tvoriť trs a súčasne môže dôjsť k axilárnemu vetveniu jeho výhonkov. Týmto postupom môžeme získať veľký počet rastlín.

Nodálna kultúra predstavuje metódu efektívnej reprodukcie, najčastejšie aplikovanú pri listnatých drevinách. Primárnymi explantátmi sú odlistené jednonodálne, dvojnodálne, prípadne trojnodálne segmenty hlavnej stonky alebo bočných výhonkov so založenými púčikmi v pazuchách listov. Úspešnosť regenerácie je založená na multiplikačnom efekte tvorby výhonkov z axilárnych púčikov. Z každého púčika, ako pri predchádzajúcich dvoch technikách, je možné získať značný počet výhonkov, fenotypicky homogénnych a geneticky identických.

Pri uvedených technikách postupujeme rovnako. Multiplikované výhonky môžeme izolovať, opäť deliť na segmenty a následnou kultiváciou a stimuláciou proliferácie výhonkov zvýšiť koeficient množenia alebo ich zakoreniť. Spontánnym zakorenением výhonkov, ale prevažne indukovaným zakorenением sa završí regenerácia v podmienkach *in vitro*. Zakorenené rastliny majú praktické uplatnenie po adaptácii na prírodné podmienky.

Vhodnou a efektívnou metódou rozmnožovania lesných drevín je embryokultúra. Predstavuje kultiváciu izolovaných zreých a nezreých zygotových embryí v rôznom štádiu diferenciácie. Túto metódu je možné využiť na prekonávanie predčasnej aborcie embryí (napr. pri vzdialenej hybridizácii), na získanie a reprodukciu vzácných hybridov, prípadne haploidných jedincov niektorých medzidruhových hybridov, na skrátenie vegetačného pokoja semien a elimináciu inhibície klíčenia semien (pred stratifikáciou), na stimuláciu klíčenia semien s nevyvinutými embryami (napr. čerešňa vtáčia, marhuľa, broskyňa) a tiež na ozdravenie materiálu, nakoľko mnohé hubové, baktériové a vírusové ochorenia sa neprenášajú semenom. Nevýhodou je, že kultiváciou embrya môžeme získať a rozmnožiť rastlinu neznámeho genotypu.

Osobitou a úspešne využívanou technikou pre účely efektívnej mikropropagácie drevín je somatická embryogenéza. Somatická embryogenéza je proces, pri ktorom somatické bunky rôznych pletív (zvlášť klíčnych listov zreých alebo nezreých zygotových embryí), ktoré za určitých špecifických podmienok kultivácie sú schopné diferenciácie a masovej tvorby bipolárnych štruktúr (so stonkovým – vegetačným vrcholom a radikulou – koreňovým pólom), tzv. somatických embryí, nazývaných aj vegetatívne embryá alebo embryoidy. Somatické embryá vznikajú bez splynutia pohlavných buniek, ale pri svojom vývine prechádzajú štádiami analogickými zygotovému embryu. Z hľadiska získania celistvej rastliny je výhodné, že vyvinuté somatické embryá majú diferencovaný vegetačný – vrchol a súčasne koreňový pól. Touto metódou môžeme v podmienkach *in vitro* indukovať kontinuálnu diferenciáciu somatických embryí. Diferencované embryá môžu byť dlhodobo uchovávané v kultúre *in vitro* a využité na ďalšiu reprodukciu. Hlavným zámerom je využitie somatických embryí ako semien, pre ktoré bol zavedený pojem „umelé alebo syntetické semená“. Umelé alebo syntetické semená sú somatické embryá, ktoré sú obaľované do špeciálnych chemických zlúčenín (algináty). V súčasnosti sa v zahraničí rozpracovávajú a zdokonaľujú práve tieto systémy fyzikálnej ochrany somatických embryí a automatizovanej manipulácie, ktoré sú dôležité pre ich praktické využitie.

Častým javom v kultúrach *in vitro* je diferenciácia púčikov, výhonkov, koreňov, prípadne somatických embryí, ktoré v pôvodnom pletive neboli. Je to diferenciácia *de novo* nazývaná adventívnou organogenezou. Štruktúry a orgány diferencované

de novo sú považované za tzv. prídavné – adventívne. Vznikajú pri kultivácii rôznych explantátov. Tento spôsob regenerácie *in vitro* umožňuje tvorbu púčikov a výhonkov na orgánoch a ich pletivách, ktoré sa bežne na vegetatívne množenie nepoužívajú (napr. ihlice, listy a ich segmenty).

Pri lesných drevinách jednou z využívaných techník je **kalusová kultúra**. Kalus je masa buniek s rôznym stupňom diferenciácie a schopnosťou spätnej tvorby organizovaných štruktúr, ktoré predstavujú vlastne nepriamu diferenciáciu púčikov, výhonkov, koreňov alebo aj somatických embryí. Kalus môžeme získať kultiváciou akejkoľvek časti rastlinného organizmu ako napr. listu, stonky, stopky, koreňa, ale aj ich segmentov. V podstate všetky rastlinné bunky sú potenciálnym zdrojom kalusu. Najväčšou kompetenciou disponujú bunky menej diferencované a vývojovo mladšie pletivá. Náročnou a preto menej používanou technikou je **protoplastová kultúra**, ktorá predstavuje izolované protoplasty (rastlinné bunky bez bunkovej steny), ktoré je možné získať z rozličných pletív a orgánov (napr. z listov, stoniek, vegetačných vrcholov, koreňov). Najčastejšie sa využívajú bunky mezofylu listov. Z izolovaných protoplastov je možné doceliť vývin celistvých rastlín indukciou organogenézy alebo somatickej embryogenézy. Splynutím (fúziou) protoplastov je možné dosiahnuť aj produkciu somatických hybridov (tzv. **somatická hybridizácia**) medzi inkompatibilnými alebo z rôznych iných dôvodov nekřížiteľnými druhmi.

3. Mikrorozmnožovanie listnatých drevín

Mária Gabriela Ostrolucká

V súčasných ekologických podmienkach je dôležité venovať sa obnove lesných spoločenstiev. Zabezpečenie a udržanie druhovej rovnováhy a ekologickej stability lesných ekosystémov vyžaduje zvýšenie zastúpenia listnatých drevín v lesoch, čo vyžaduje dostatočné množstvo sadbového materiálu, ktorého produkcia v prírodných podmienkach je značne limitovaná. Práve mikrorozmnožovanie umožňuje preklenúť problémy drevín súvisiace s dlhým a pomalým životným cyklom, a tým aj neskorým nástupom generatívnej reprodukcie (semenných rokov). Odkrýva možnosti rozmnoženia a záchrany tých druhov, pri ktorých klasické – autovegetatívne rozmnožovanie je limitované nízkou schopnosťou zakoreňovania a generatívne rozmnožovanie, napr. znížením generatívnej produkcie, nedostatkom kvalitného semena, predlžovaním intervalu medzi semennými rokmi (dub, buk), predčasnou aborciou semien (dub) a pod. Mikrorozmnožovanie predstavuje reprodukčný systém, ktorý umožňuje v relatívne v krátkom čase produkciu veľkého množstva rastlín. V ostatných rokoch nadobúda stále väčšie uplatnenie pri rozmnožovaní listnatých drevín, napriek finančnej náročnosti na špecializované zariadenie a vybavenie laboratórií, na ich prevádzku a pod. Z techník *in vitro* sú perspektívne najmä tie, ktoré môžu zohrať úlohu pri skrátení a urýchlenní šľachtiteľského procesu, pri reprodukcii vyšľachteného materiálu, ktoré umožňujú reprodukciu genotypov odolných voči nepriaznivým biotickým a abiotickým faktorom so žiadanými hospodárskymi vlastnosťami, genotypov ohrozených druhov, hybridov získaných kontrolovaným opelením, starých stromov s cennými vlastnosťami a pod. Pri dospelých stromoch sa na zlepšenie schopnosti regenerácie využíva rejuvenilizácia ich pletív, a to vrúbľovaním výhonkov z dospelých stromov, zmladzovanie pomocou koreňových a pňových výmladkov alebo ošetrovaním východzieho materiálu rastovými regulátormi.

V podmienkach *in vitro* boli úspešne regenerované početné druhy listnatých drevín

vo svete, ale aj na Slovensku. Prvé pokusy s dopestovaním celistvých rastlín pri listnatých drevinách sa začali v rokoch 1934 – 1940 (Gautheret). Efektívna regenerácia bola dosiahnutá pri mnohých hospodársky významných druhoch rodov *Quercus* - dub (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. cerris*, *Q. petraea*, *Q. suber*, *Q. virgiliana*), *Fagus* - buk (*F. sylvatica*, *F. grandifolia*), *Populus* – topoľ (*P. tremula*, *P. nigra*, *P. alba*), *Salix* – vrbá (*S. caprea*, *S. viminalis*), *Tilia* - lipa (*T. cordata*, *T. platyphyllos*), *Betula* - breza (*B. pendula*, *B. verrucosa*, *B. platyphylla*), *Fraxinus* – jaseň (*F. americana*, *F. angustifolium*, *F. excelsior*), *Alnus* - jelša (*A. incana*, *A. viridis*), *Ulmus* - brest (*U. glabra*, *U. minor*, *U. leavis*, *U. americana*), *Castanea* – gaštan (*C. sativa*, *C. vesca*), *Fraxinus* – jaseň (*F. excelsior*), *Robinia* - agát (*R. pseudoacacia*), *Junglas* - orech (*J. nigra*, *J. regia*), *Sorbus* – jarabina (*S. aucuparia*), *Cornus* - lieska (*C. mas* “*macrocarpa*”), *Morus* – moruša (*M. nigra*, *M. alba*) atď. Napriek tomu, že pri niektorých z uvedených druhov sú metodické postupy mikrorozmnožovania dobre rozpracované a publikované, neustále sa zdokonaľujú a modifikujú pri konkrétnych druhoch.

Najvýhodnejšími primárnymi explantátmi pre dosiahnutie vysokého koeficientu množenia (počet získaných rastlín na primárny explantát) a dopestovania niekoľkých tisícov rastlín sú **meristémy izolované zo zimných apikálnych a axilárnych púčikov** alebo **apikálne a nodálne segmenty s dormantnými púčikmi** (obr. 1), ktoré sú aj zárukou získania klonu, t.j. neobmedzeného množstva identických jedincov vybraného genotypu.



Obr. 1 - Iniciácia vývinu a rastu výhonkov pri druhu *Quercus virgiliana* z nodálnych segmentov s jedným alebo dvomi axilárnymi púčikmi.

Proces mikrorozmnožovania začína tým, že primárne explantáty vysterylizujeme (v 0,1% HgCl_2) a následne kultivujeme za konštantných kultivačných podmienok (teplota 23 °C, 16 hodín svetlo a 8 hodín tma a intenzita osvetlenia 50 $\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-2}$) na živnom médiu, ktorého zloženie sa musí modifikovať podľa druhu dreviny. Vysoký multiplikačný efekt je možné dosiahnuť pri optimálnom zložení agarového média. Uvedené typy explantátov vyžaduje prevažne vyšší obsah cytokinínov a nižšiu koncentráciu auxínov. Obsah cytokinínu v médiu potláča apikálnu (vrcholovú) dominanciu, stimuluje zakladanie axilárnych púčikov, vývin a rast výhonkov, čím dochádza k tvorbe **viacvýhonkovej kultúry** (obr. 2).

Podobný multiplikačný efekt nastane pri kultivácii **izolovaných rastových**



Obr. 2 - Intenzívna tvorba axilárnych púčikov a výhonkov - vznik tzv. viacvýhonkovej kultúry pri druhu *Quercus rubra*.

vrcholov na kultivačnom médiu s obsahom cytokinínov. V pazuchách listových primordií sa diferencuje množstvo axilárnych púčikov a z nich tvorba výhonkov.

Úspešnosť mikromnoženia je vyššia pri odbere explantátov zo semenáčikov alebo z mladších pletív dospelých stromov, napr. zo semien. **Embryokultúra** je zvlášť vhodný systém reprodukcie, pri ktorom významným zdrojom explantátov sú semená z voľného alebo kontrolovaného opelenia, ktorých kultiváciou je možné dosiahnuť vysoký koeficient množenia. Môžeme kultivovať nielen zrelé a nezrelé semená, ale aj časť semena s embryonálnou osou alebo len samotné embryonálne osi (embryo bez klíčnych listov), ktoré sa sterilne izolujú zo semien. Jedná sa o zvlášť efektívnu metódu množenia niektorých druhov listnatých drevín (dub, orech, gaštan, pagaštan), ktorých semená sú rekalcitrantné. Uvedené explantáty sú zvlášť efektívne využívané na reprodukciu dubov, nakoľko umožňujú prekonať mnohé nedostatky ako je znížená fruktifikácia, problém s dlhším uskladnením semien, ktoré rýchle dehydratujú a strácajú klíčivosť a sú náchylné na výskyt plesní. Navyše pre duby je typická predčasná aborcia plodov (už koncom júla a v auguste). To znamená, že odber explantátov je potrebné uskutočniť pred opadom plodov (v skoršom kotyledonárnom štádiu). Práve táto technika je často aplikovaná pri duboch (obr. 3), napr. pri *Quercus rubra*, *Q. robur*, *Q. suber*. Embryonálna os bola použitá ako primárny explantát taktiež pri buku (*Fagus sylvatica*) s výsledkom tvorby výhonkov s multiplikačným efektom. Prítomnosť cytokinínov v médiu je dôležitá, nakoľko odstraňuje dormanciu a stimuluje tvorbu axilárnych púčikov a výhonkov. Zároveň táto technika umožňuje získať priamo celistvú rastlinu aj bez etapy zakorenenia, nakoľko nedochádza len k vývinu a rastu vegetačného vrcholu, ale pri zachovaní koreňového pólu na embryonálnej osi aj k tvorbe koreňového systému. Má prakticky význam aj pri rozmnožení cenných genotypov a vzácných hybridov, ktorých semená, prípadne izolované embryonálne osi, sú dlhodobo uchovávané kryoprezerváciou (v tekutom dusíku).

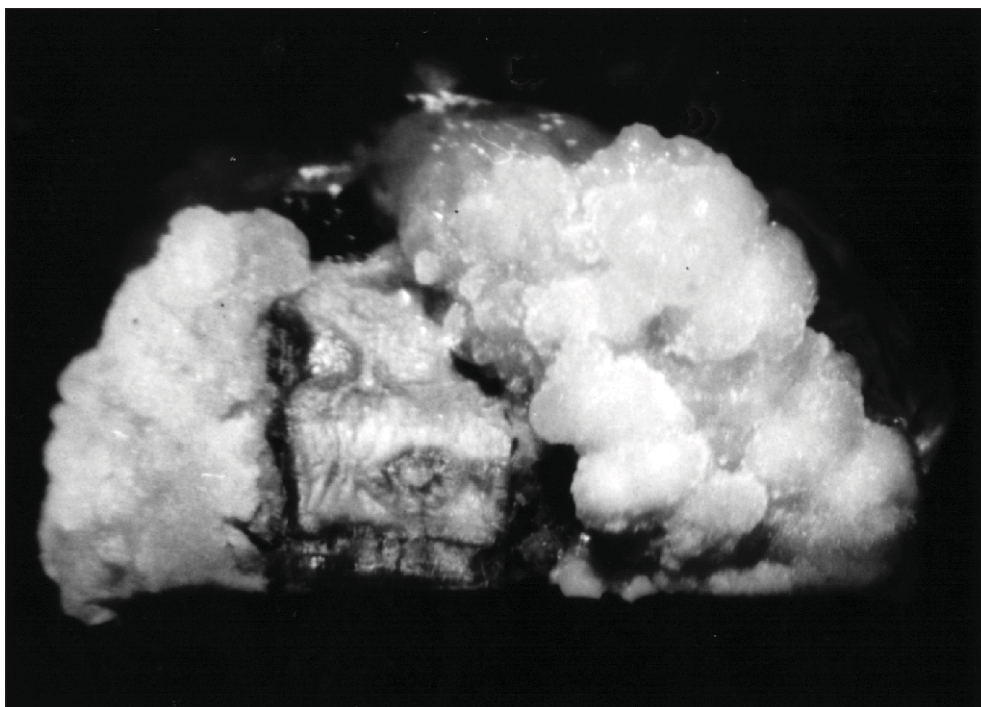
Významnou a sľubnou technikou pre masové množenie listnatých drevín je so-



Obr. 3 - Diferenciácia axilárnych výhonkov z izolovaných embryonálnych osí druhu *Quercus virgiliana*.

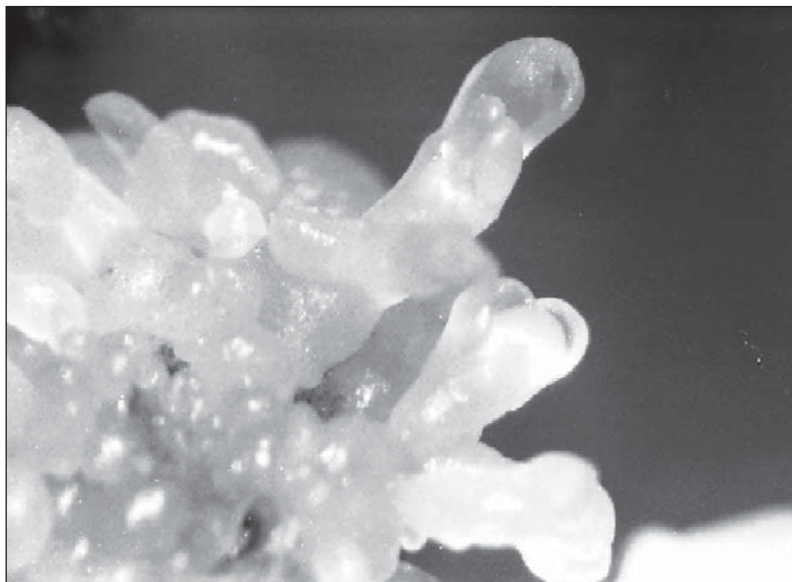
matická embryogenéza, ktorá umožňuje klonálnu produkciu rastlín (pri priamej regenerácii z pletiva explantátu), ale môže viesť aj k variabilite regenerovaných rastlín (pri nepriamej regenerácii, t. j. cez tvorbu kalusovej kultúry). Somatické embryá sa podarilo výnimočne získať z pletiva listov (*Betula pendula*, *Quercus robur*). Vhodnejšími explantátmi sú zrelé a zvlášť nezrelé zygotové embryá alebo len izolované kľúčne listy a ich segmenty (obr. 4).

Tieto pletivá disponujú vyššou embryogénnou schopnosťou. Úspešnosť jej realizácie závisí od podmienok *in vitro*, zvlášť vhodného kultivačného média s rastovými látkami,

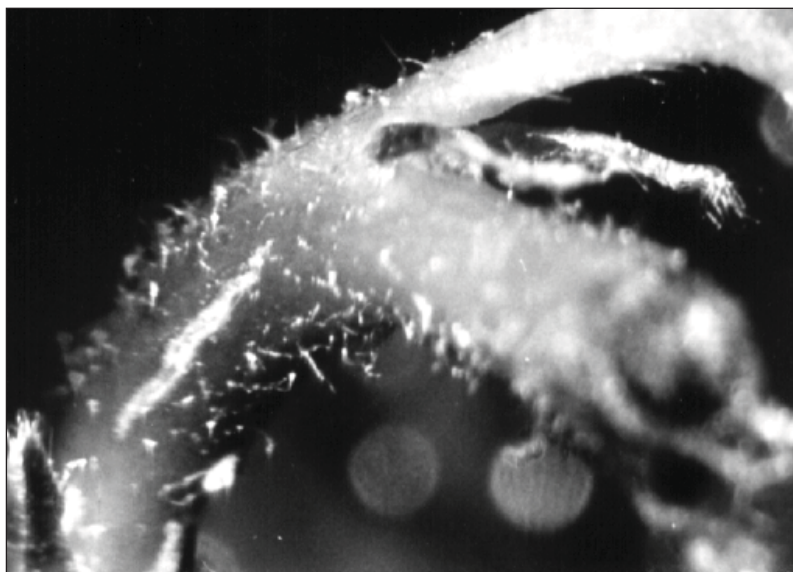


Obr. 4 - Indukcia diferenciácie somatických embryí na segmente kľúčneho listu pri druhu *Quercus robur*.

t. j. od obsahu cytokinínov, auxínov, ich vzájomného pomeru, prípadne obsahu aminokyselín. Neexistuje univerzálny metodický postup indukcie somatických embryí, pretože každý druh, ba aj genotyp vyžaduje určité špecifické podmienky. V súčasnosti už existuje spektrum listnatých drevín, pri ktorých bol proces somatickej embryogenézy úspešne indukovaný, ale klíčenie somatických embryí s ich praktickým využitím bolo dosiahnuté len pri niektorých druhoch. Úspešná indukcia somatických embryí a ich vývin boli zaznamenané pri druhoch rodov *Citrus*, *Corylus*, *Salix*, *Populus*, *Tilia*, *Quercus*, *Aesculus*, *Juglans*, *Robinia*, *Pawlonia*, *Magnolia*, *Liliodendron*, *Ilex* a pod. Dôležitá je nielen indukcia somatických embryí, vývin embryí, ale pre praktickú a komerčnú aplikáciu sú dôležité ďalšie etapy – klíčenie somatických embryí, ich separácia, desikácia a enkapsulácia (technológia obalovania - vyživovací a ochranný obal), významná z hľadiska manipulácie pri výseve. Pre automatizáciu týchto postupov sa najmä v zahraničí používa bioreaktorový systém. Regenerácia rastlín bola zaznamenaná, napr. *Quercus robur*, *Q. acutissima*, *Q. suber*, *Q. ilex*, *Tilia cordata* atď. Obr. 5 ilustruje somatické embryá v kotyledonárnom štádiu a obr. 6 klíčiace somatické embryo pri dube letnom (*Quercus robur*).



Obr. 5 - Somatické embryá v kotyledonárnom štádiu s vydiferencovanými klíčovými listami a radikulou (zárodočným koreňom) pri druhu *Quercus robur*.



Obr. 6 - Klíčiace somatické embryo pri druhu *Quercus robur*

V ostatných rokoch je výskum zameraný aj na indukciu gametickej embryogenézy, zvlášť androgenézy, ktorá bola indukovaná pri viacerých listnatých drevinách (*Betula pendula*, *Aesculus hippocastanum*, *Castanea sativa*, *Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. cerris*, *Q. suber*, *Fagus sylvatica*, *Populus nigra*). Pri niektorých druhoch sa podarilo indukovať nielen haploidné embryá, ale regenerovať aj rastliny, napr. pri *Quercus suber* kultiváciou peľníc.

Adventívna organogenéza bola dosiahnutá pri mnohých listnatých drevinách. Táto technika je veľmi efektívny regeneračný systém, nakoľko umožňuje masovú produkciu rastlín z malého kúska pletiva (listu, listovej stopky, stonky), na ktorom sa púčiky a výhony bežne netvoría, vznikajú *de novo*. Regenerácia rastlín touto technikou bola zaznamenaná pri viacerých druhoch, a to z pletiva listov mikrovýhonkov, semenáčikov, ale aj z pletív listov starých stromov (*Betula pendula*, *Populus nigra*, *Nothofagus alpina*, *Aesculus hippocastanum*, *Fagus sylvatica*).

Pri všetkých technikách z hľadiska ich praktického uplatnenia je dôležitá etapa zakorenenia izolovaných mikrovýhonkov (obr. 7 a 8), špecificky podľa rastlinného druhu



Obr. 7 - Spontánne zakorenenie výhonkov druhu *Quercus robur* (na kultivačnom médiu s obsahom cytokinínu, bez prítomnosti auxínu).



Obr. 8 - Zakorenenie výhonkov druhu *Quercus robur* na zakoreňovacom kultivačnom médiu (s obsahom aktívneho uhlia a auxínu).

- buď v podmienkach *in vitro* (v modifikovaných pevných, agarových médiách s obsahom auxínu) alebo *ex vitro* po prenesení do pôdneho substrátu (po namáčaní mikrovýhonkov v roztoku auxínu alebo komerčne produkovaného stimulátora). Zakorenené rastliny sa po prenose do skleníka aklimatizujú a postupne adaptujú na zníženú 70% vzdušnú vlhkosť (obr. 9). Po aklimatizácii môžu byť vysadené na experimentálne plochy pre ďalšie pestovanie. V priebehu ďalšieho rastu by mali byť sledované a hodnotené rastové charakteristiky a prípadná mortalita. Súčasne poznatky potvrdzujú, že rastové parametre sú zrovnateľné so sadenicami generatívneho pôvodu a zároveň dokazujú, že techniky *in vitro* je možné úspešne využiť na rýchlu a masovú reproduk-



Obr. 9 - Regenerované rastliny druhu *Quercus robur* po aklimatizácii a adaptácii na podmienky *ex vitro* v pôdnom substráte s perlitom (3:1).

ciu takmer všetkých druhov listnatých drevín. Zárukou kvality rastlín získaných v podmienkach *in vitro* je odber primárnych explantátov z výberových stromov, cenných a produktívnych genotypov.

Aplikácia techník mikrorozmnožovania má v Európe a ostatných krajinách sveta stúpajúcu tendenciu. Uvádza sa, že každoročne sa dopestuje niekoľko miliónov sadeníc listnatých drevín, ako sú topole, brezy, čerešne, eukalypty a pod.

4. Mikrorozmnožovanie ihličnatých drevín

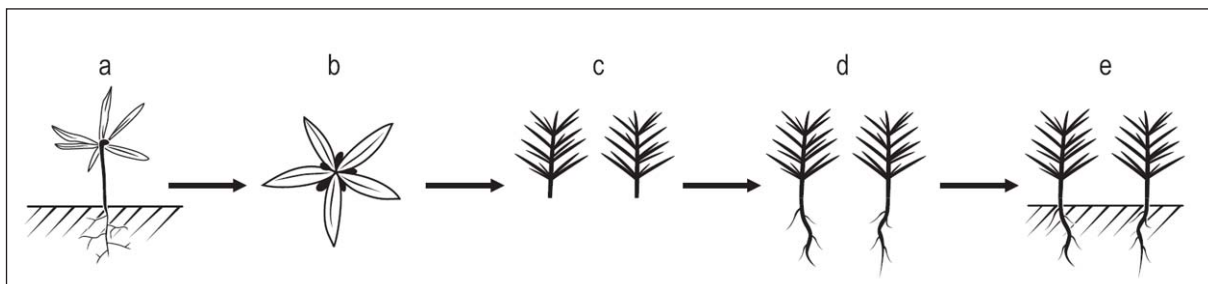
Terézia Salaj

Regenerácia ihličnatých drevín (stromov) v podmienkach *in vitro* sa uskutočňuje technikami mikrorozmnožovania cestou:

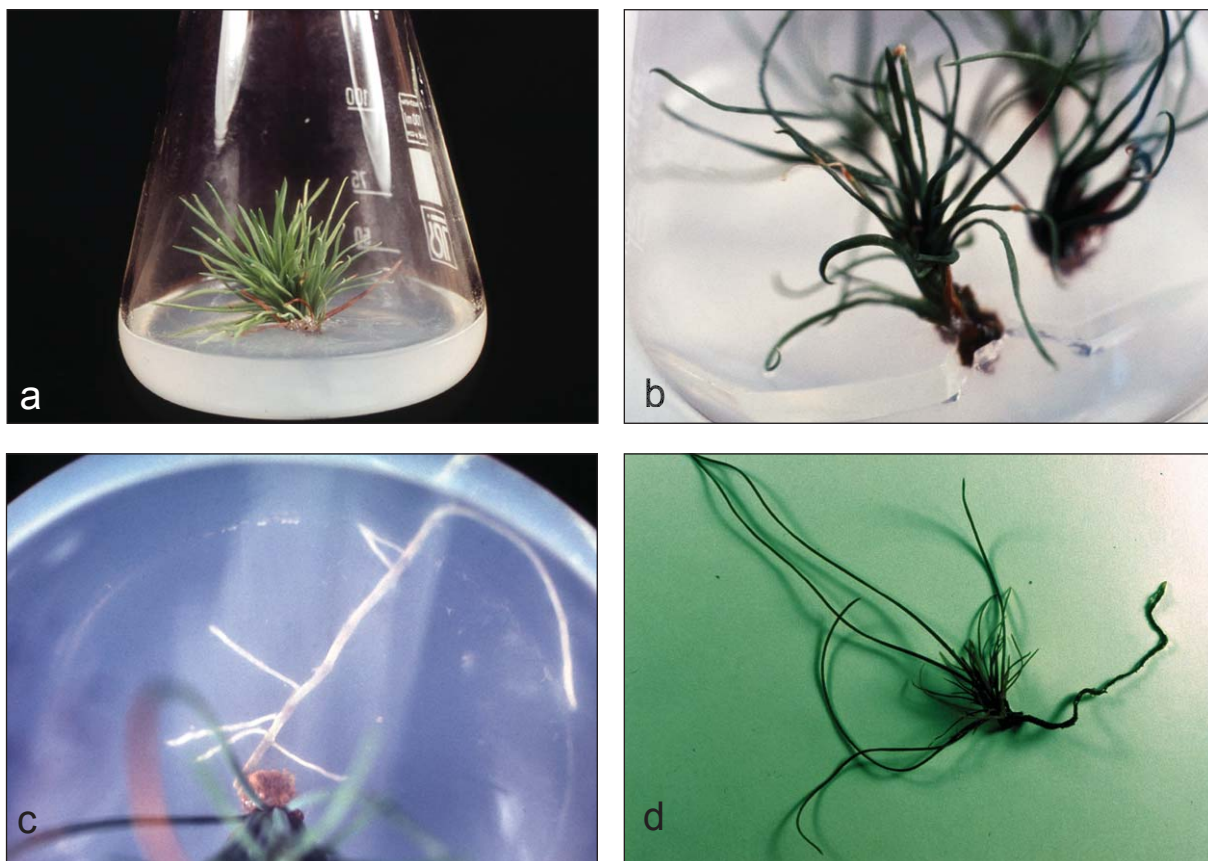
1. multiplikácie a vývinu axilárnych púčikov
2. indukcie adventívnych púčikov
3. somatickej embryogenézy

Axilárne púčiky sa vyvíjajú na izolovaných rastových vrcholoch semenáčikov alebo aj na brachyblastoch ihlíc, kde sú už založené meristémy. Na ich úspešné množenie a vývin sa používajú cytokiníny, ich pôsobenie je nevyhnutné v prvých dvoch až troch týždňoch kultivácie. V ďalšom období sa púčiky predlžujú, zakorenia a prenesú sa do pôdy. Je potrebná kratšia adaptačná fáza, po ktorej sa regenerované rastliny prenesú do prírodných podmienok. Veľkou výhodou rastlín, regenerovaných z axilárnych púčikov je ich genetická stabilita. Touto metódou sa dosiahla kompletná regenerácia rastlín pri viacerých druhoch ako sú, napr. smrek obyčajný (*Picea abies*), borovica čierna (*Pinus nigra*), borovica ťažká (*Pinus ponderosa*), smrekovec opadavý (*Larix decidua*), duglaska tisolistá (*Pseudotsuga menziesii*), ale je to technika vhodná najmä na mikropropagáciu listnatých druhov. Vývin axilárnych púčikov a regeneráciu rastliny ilustrujú obr. 10 a 11.

Adventívne púčiky sa indukujú na juvenilných explantátoch ako sú izolované embryá, segmenty semenáčikov (klíčne listy, hypokotyly) a zakladajú sa v explantátoch *de novo*. To znamená, že ich základy v explantáte nie sú prítomné v čase izolácie



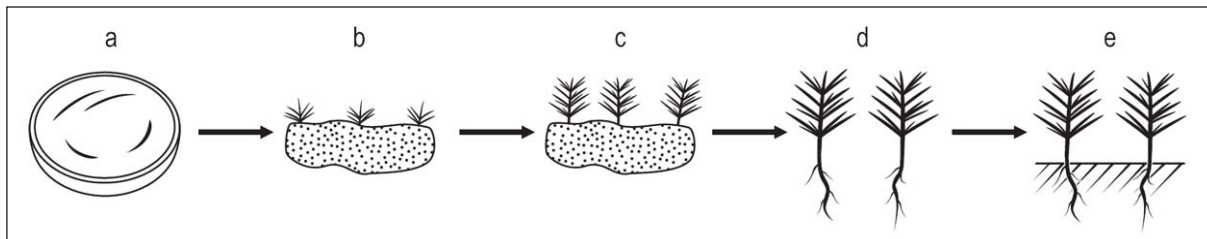
Obr. 10 - Schematické znázornenie regenerácie rastliny z axilárnych púčikov – rastový vrchol semenáča (a) uložíme na živné médium (b), po určitom čase, 2-3 týždne sa v pazuchách klíčnych listov objaví axilárne púčiky (b), ktoré sa postupne predlžujú a vytvárajú výhonky, ktoré oddelia sa od pôvodného explantátu (c), zakorenia sa (d) a v konečnej fáze sa prenású do pôdy (e).



Obr. 11 - Vývin axilárnych púčikov a regenerácia rastlín (obrázky *in vitro* kultivácie, borovica čierna)
a – indukcia axilárnych púčikov na živnom médiu, b – oddelený púčik na živnom médiu, c – indukcia koreňov *in vitro*, d – regenerovaný výhonok s koreňom

explantáty z materskej rastliny. V tomto prípade explantáty kultivujeme na živných médiách, ktoré okrem základných makro - a mikroelementov, vitamínov, sacharidov obsahujú rastové regulátory typu cytokinínov. Približne po troch až štyroch týždňoch kultivácie na živnom médiu sa na povrchu explantátov objavujú základy adventívnych púčikov ako hrboľčkové útvary, ktoré sa rýchlo vyvíjajú a nadobudnú tvar púčikov. Rastové regulátory sú potrebné v prvých fázach indukcie, približne po dobu troch týždňov. Po tomto čase sa explantáty s indukovanými púčikmi prenású na živné médium bez rastových regulátorov, kde sa ďalej vyvíjajú a predlžujú a postupne vytvárajú výhonok. Táto fáza vývinu zaberá približne dva mesiace. Ak výhonky dosiahnu vhodnú dĺžku zakorenia sa na živnom médiu s obsahom rastových regulátorov typu auxínov. Po zakorenení sa regenerované rastlinky prenású do pôdy a potrebujú ešte kratšiu adaptačnú fázu v podmienkach vysokej relatívnej vlhkosti vzduchu. Po adaptačnej fáze sa rastliny prenású do voľnej prírody (škôlky, les atď.). Úspeš-

ná, kompletná regenerácia rastlín metódou indukcie adventívnych púčikov/výhonkov sa uskutočnila pri druhoch - smrek obyčajný (*Picea abies* L. Karst), smrek biely (*Picea glauca*), borovica lúčovitá (*Pinus radiata*) borovica lesná (*P. sylvestris*), borovica Banksova (*P. banksiana*), borovica hladká (*P. strobus*), borovica čierna (*P. nigra*), jedľa biela (*Abies alba*), cyprušteľ nutkanský (*Chamaecyparis nootkatensis*). Proces diferenciácie a vývinu adventívnych púčikov ilustrujú obr. 12 a 13.



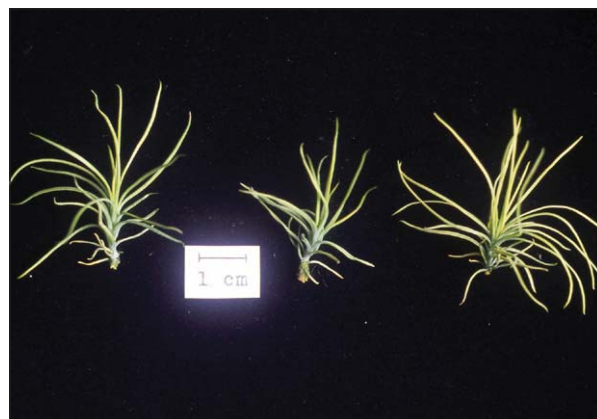
Obr. 12 - Schematické znázornenie regenerácie rastliny cestou adventívnych púčikov – pôvodným explantátom sú kľúčne listy izolované zo semenáčov a uložené na živné médium (a). Kľúčne listy na živnom médiu sa mierne zväčšia a postupne sa na nich objavujú adventívne púčiky (b). Po ich predĺžení (c) sa oddelia od pôvodného explantátu a zakorenia sa (d). Po kratšej adaptačnej fáze sa môžu preniesť do voľnej prírody (e).



a – indukcia adventívnych púčikov na kľúčnom liste,



b – vyvíjajúce sa výhonky oddelené od kľúčnych listov



c – predĺžené výhonky



d – regenerovaný výhonok presadený do pôdy

Obr. 13 - Indukcia adventívnych púčikov a regenerácia rastlín (obrázky *in vitro* kultivácie, borovica čierna).

Somatická embryogenéza je proces indukcie a vývinu embrya zo somatických pletív rastlinného organizmu bez fúzie gamét v podmienkach *in vitro*. Pri ihličnatých druhoch tento proces prvýkrát indukovali pri *Picea abies* v roku 1985 a odvtedy sa podarila indukcia pri veľkom počte ihličnatých drevín patriacich do rodov *Picea*, *Pinus*, *Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga*.

Proces somatickej embryogenézy zahŕňa štyri štádiá:

Štádium 1: Indukcia embryogénnych pletív a ich dlhodobé udržiavanie – explantáty (nezrelé a zrelé embryá, segmenty semenáčikov, ojedinele ihlice izolované z dospeľých stromov) sa kultivujú na živných médiách s obsahom rastových regulátorov (auxíny, cytokiníny). Približne po troch týždňoch sa na explantátoch objaví embryogénne pletivo. Je to zvláštne pletivo, ktoré sa odlišuje od iných druhov pletív. Je bielej farby, slizovitej konzistencie a relatívne rýchlo rastie. Mikroskopické pozorovania odhalili, že pletivo obsahuje zvláštne štruktúry – somatické embryá. Sú to bipolárne útvary na ktorých rozlišujeme tzv. embryonálnu časť zloženú z meristematických buniek a suspenzorovú časť, pozostávajúcu zo silne predĺžených vakuolizovaných buniek. Embryogénne pletivá prenášame na čerstvé živné médiá približne v dvojtrojtýždňových intervaloch. Pri prenose pletivá rozdelíme na viac častí a každú časť preniesieme na čerstvé živné médium. Týmto spôsobom pletivá v podstate aj rozmnožujeme. Embryogénne pletivá môžeme udržiavať v podmienkach *in vitro* dlhší čas a tieto pletivá sú stálym zdrojom somatických embryí.

Štádium 2: Dozrievanie somatických embryí – počas udržiavania sa somatické embryá v embryogénnom pletive rozmnožujú, ale ostávajú stále v počiatočnej fáze vývinu (bipolárne útvary). Ich dozrievanie stimulujeme prenosom na ďalšie živné médium so špecifickým rastovým regulátorom, kyselinou abscisovou. Kyselina abscisová zastaví rozmnožovanie skorých bipolárnych štruktúr a stimuluje ich vývin. Počas dozrievania somatické embryá prechádzajú podobnými vývinovými štádiami ako embryá v semenách. Meristematická embryonálna časť sa zväčšuje, nastáva syntéza zásobných látok (bielkoviny, tuky, škrob) a mení sa vnútorná organizácia somatického embrya, postupne sa diferencujú koreňový a vrcholový meristém a klíčne listy. V tomto štádiu sú somatické embryá v kultúrach viditeľné aj voľným okom.

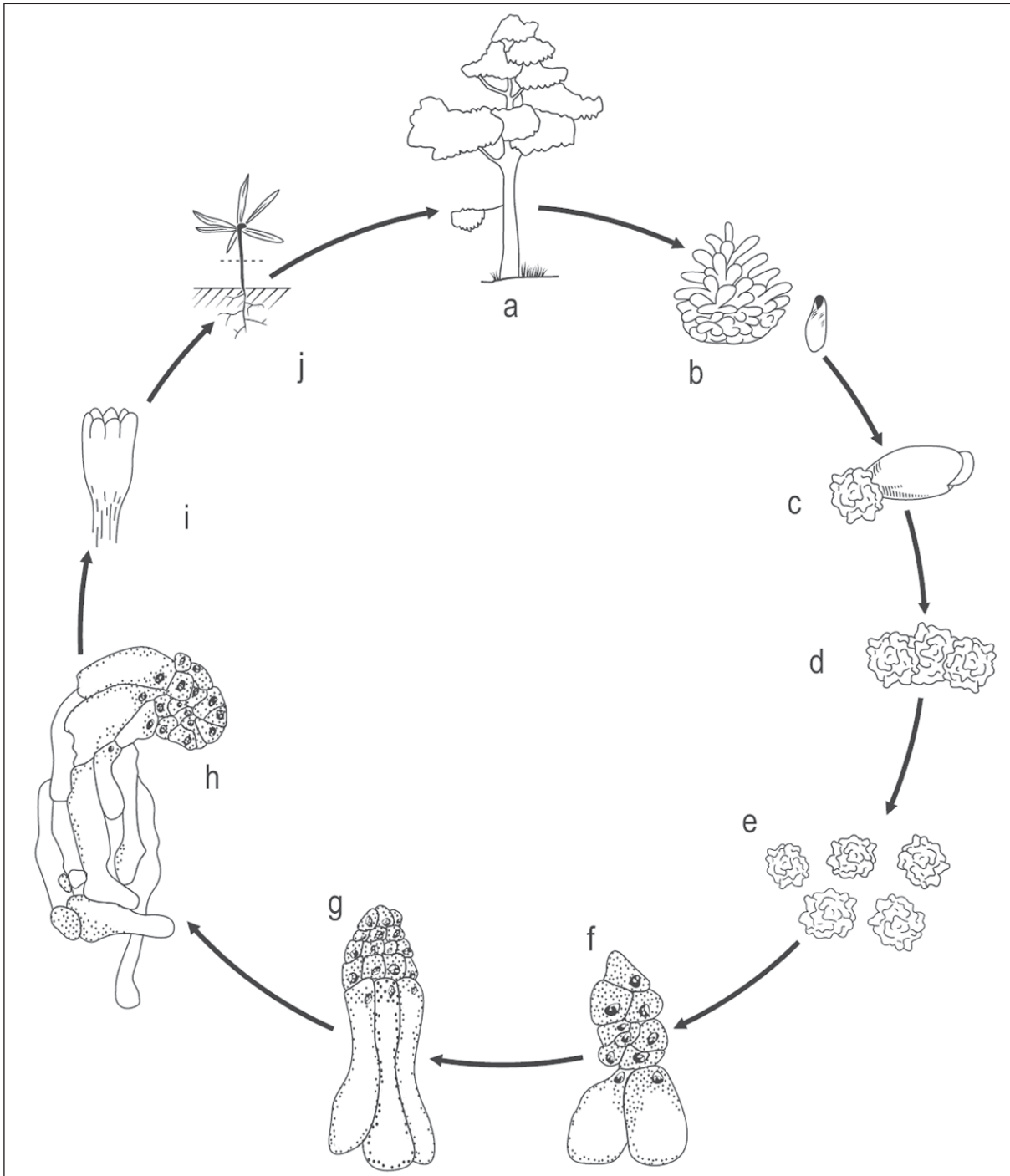
Štádium 3: Klíčenie somatických embryí – somatické embryá, ktoré dosiahnu kotyledonárne štádium vývinu sa môžu oddeliť z pôvodného pletiva a preniesť na ďalšie živné médium, na ktorom dochádza k predlžovaniu hypokotylu a klíčnych listov, objaví sa koreňok. Živné médium na klíčenie zvyčajne neobsahuje rastové regulátory. Klíčenie a vývin „somatických semenáčov“ znamená úspešnú kompletnú regeneráciu rastliny zo somatických pletív.

Štádium 4: Poslednou fázou procesu somatickej embryogenézy je *prenos* tzv. „somatických semenáčov“ do pôdy a po adaptačnej perióde do prírodných podmienok.

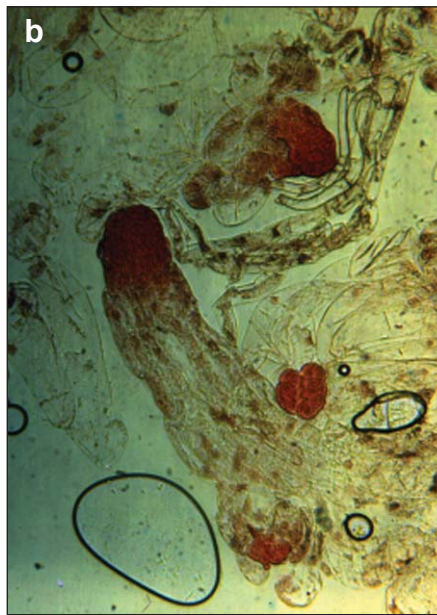
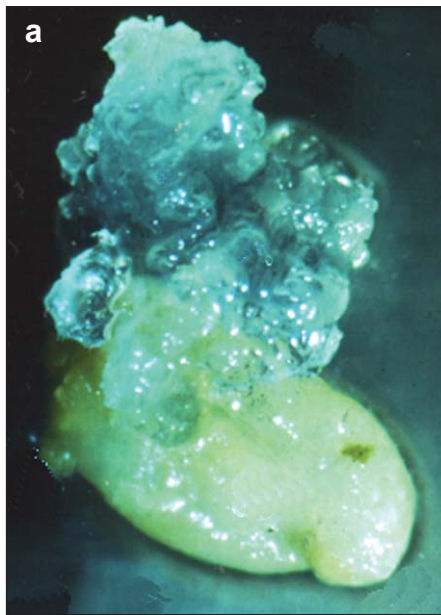
Proces somatickej embryogenézy a úspešná regenerácia „somatických semenáčov“ bola pozorovaná pri veľkom počte ihličnatých drevín. Ako príklady uvádzame smrek obyčajný (*Picea abies*), smrek biely (*P. glauca*), smrek čierny (*P. mariana*), borovica karibská (*Pinus caribaea*), borovica prímorská (*P. pinaster*), borovica lesná (*P. sylvestris*), borovica čierna (*P. nigra*), borovica hladká (*P. strobus*), jedľa biela (*Abies alba*), jedľa Nordmannova (*A. nordmanniana*), sekvoja vždyzelená (*Sequoia sempervirens*).

Výhodou embryogénnych pletív je, že v princípe sa môžu udržiavať neobmedzene dlho v *in vitro* podmienkach a sú stálym zdrojom somatických embryí a potenciálne stromov. Ich dlhodobá kultivácia má však aj tienisté stránky, ako je napr. strata regeneračnej schopnosti (charakteristická najmä pre druhy rodu *Pinus*) alebo kontaminácia pletív mikroorganizmami. Na prekonanie týchto problémov alternatívnym riešením je dlhodobá kultivácia metódou kryoprezervácie. Kryoprezervácia je uskladňovanie rastlinných explantátov (nie len embryogénnych pletív) v tekutom dusíku pri teplote -196 °C. Je to moderná metóda udržiavania genetických zdrojov rastlín, ktorá vyžaduje špecifické podmienky. Po uplynutí

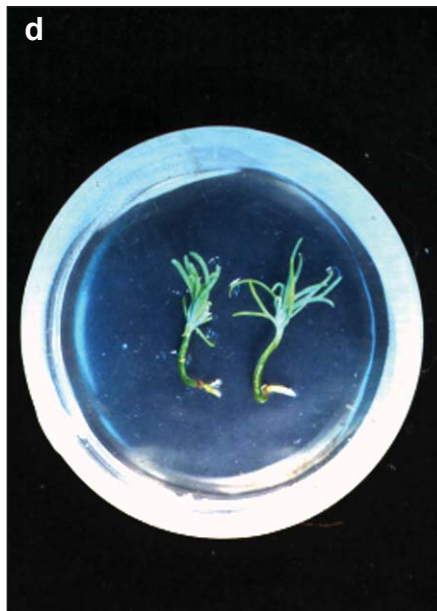
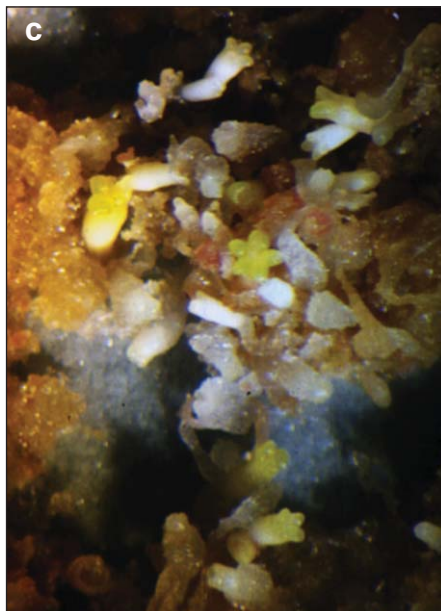
želanej doby kryoprezervácie sa pletivá rozmrazia a kultivujú *in vitro* až po kompletnej regenerácii rastliny. Somatická embryogenéza je schematicky znázornená na obr. 14 a v podmienkach *in vitro* na obr. 15.



Obr. 14 - Schematické znázornenie regenerácie ihličnatej rastliny cestou somatickej embryogenézy – z dospelého stromu (a) odoberieme šišky (b), z ktorých vyberáme semená (megagametofyty) a ukladáme na živné médium. Približne po 12 až 15 dňoch sa na megagametofytoch objaví embryogénne pletivo (c), ktoré sa oddelí od pôvodného explantátu (d) a ďalej sa udržiava rozdelením na menšie kusy (e). V tomto pletive sa nachádzajú bipolárne somatické embryá (f, g, h), ktoré sa postupne na tzv. maturačnom médiu vyvíjajú a silne pripomínajú embryá zo semien (i). Z takýchto útvarov sa vyvíjajú malé rastlinky tzv. „somatické semenáče“ (j), ktoré sa vysadia do pôdy a môžu vyrásť na dospelý strom (a) a týmto krokom sa uzatvára vývinový cyklus somatických embryí



a – indukcia embryogénneho pletiva
b – somatické embryo v skorom štádiu vývinu



c – vyvíjajúce sa somatické embryá na povrchu embryogénneho pletiva
d – regenerované „somatické semenáče“



e – rast „somatických semenáčov“ v pôde
f – „somatické semenáče“ (5 – 6 mesiacov od začiatku indukcie).

Obr. 15 - Indukcia somatickej embryogenézy a regenerácia „somatických semenáčov“ (obrázky *in vitro* kultivácie, borovica čierna)

Klonálne množenie čučoriedok, brusníc a ostružín *in vitro*

V minulosti prírodné porasty čučoriedok, brusníc a malín (*Vaccinium spp.*, *Rubus spp.*) zaberali rozsiahle plochy najmä v horských a podhorských oblastiach Slovenska. Zvýšený záujem spotrebiteľov o bobuľové ovocie a nedostatok tohto ovocia na trhu vyvolal jeho nekontrolovaný zber z pôvodných prírodných oblastí, čo sa odrazilo v ich devastácii. V súčasnosti sa nachádzajú už len na ťažšie prístupných lokalitách a na chránených územiach s rôznym stupňom ochrany, ktoré často predstavujú územia národného a európskeho významu, prirodzené stanovištia a genofondové plochy pre mnohé rastlinné a živočíšne spoločenstvá. Z uvedeného dôvodu ich využívanie musí byť v súlade s požiadavkami ochrany prírody a krajiny. Antropické zásahy a záujmy musia rešpektovať zásady ekologickej únosnosti daného priestoru. Zachovanie biodiverzity si preto vyžaduje hľadať alternatívy. Jednou z možností ako zachovať prirodzené porasty týchto druhov a pritom zaistiť efektívnu produkciu ovocia je pestovanie alternatívnych odrôd uvedených druhov bobuľovín plantážnickým spôsobom. Pre založenie produkčných výsadiieb je potrebné veľké množstvo kvalitného sadbového materiálu. Rýchle a ekonomicky výhodné získanie sadbového materiálu je možné dosiahnuť aplikáciou pletivových kultúr, ktoré predstavujú účinný a spoľahlivý spôsob klonálneho množenia mnohých rastlinných druhov.



Klonálne množenie čučoriedok, brusníc a ostružín *in vitro*

Alena Gajdošová, Gabriela Libiaková, Mária Gabriela Ostrolucká

Lesné hospodárstvo spolu s poľnohospodárstvom majú prioritný vplyv na funkčnú diferenciáciu krajiny, pretože ich pôsobenie má celoplošný charakter a rozhodujúcou mierou sa podieľajú na celkovom formovaní krajinej štruktúry. Vzhľadom k tomu, že lesy sú jedným z prírodných prvkov, ich plošný rozsah a územné vymedzenie pôsobí v krajinnom priestore vždy pozitívne. Z hľadiska tvorby krajinej štruktúry je v lesnej činnosti rozhodujúce vytváranie druhovej a vekovej rozmanitosti porastov zodpovedajúce členitosti územia a ekologické hospodárenie v lesoch, pri plnení všetkých mimoprodukčných funkcií lesov.

V minulosti zaberali prirodzené porasty divo rastúcich druhov čučoriedok, brusníc a malín (*Vaccinium* spp., *Rubus* spp.) rozsiahle plochy najmä v horských oblastiach Slovenska. V horských a podhorských oblastiach predstavujú tieto druhy významné komponenty lesných ekosystémov a preto je potrebné zachovať ich biodiverzitu, revitalizovať prirodzené porasty a to zvlášť v nadmorských výškach, kde vykazujú proti eróznym efektom a majú značný ekologický význam.



Čučoriedka chochlíkatá

Zvýšený záujem spotrebiteľov o bobuľové ovocie a nedostatok tohto ovocia na trhu vyvolal ich nekontrolovaný zber, čo sa odrazilo v devastácii pôvodných porastov. Tieto sa v súčasnosti nachádzajú už len na ťažšie prístupných lokalitách

a na chránených územiach s rôznym stupňom ochrany, ktoré často predstavujú územia národného a európskeho významu, prirodzené stanovištia a genofondové plochy pre mnohé rastlinné a živočíšne spoločenstvá. Z tohto dôvodu musí byť ich využívanie v súlade s požiadavkami ochrany prírody a krajiny a ľudské záujmy musia rešpektovať zásady ekologickej únosnosti daného priestoru. Zachovanie biodiverzity si preto vyžaduje hľadať alternatívy. Jednou z možností ako zachovať prirodzené porasty divorastúcich druhov a pritom zaistiť efektívnu produkciu ovocia je veľkoplošné pestovanie vybraných druhov a odrôd bobuľového ovocia, ktoré budú schopné svojou produkciou ovocia nahradiť prirodzene sa vyskytujúce druhy.

Pre založenie produkčných plôch je potrebné veľké množstvo kvalitného sadbového materiálu. Rýchle a ekonomicky výhodné množenie sadbového materiálu je možné dosiahnuť využitím pletivových kultúr, ktoré predstavujú účinný a spoľahlivý spôsob klonálneho množenia mnohých rastlinných druhov. Aktivita by mali byť nasmerované

na využitie regeneračného a multiplikačného systému *in vitro* pre vybrané druhy drevín, ktoré sú súčasťou lesných spoločenstiev a zároveň sú zaujímavé z hľadiska produkcie ovocia (čučoriedky, maliny, černice) za účelom dosiahnuť ich efektívne množenie. Alternatívou je množenie širokého sortimentu introdukovaných odrôd týchto a podobných druhov, ktoré sú schopné rásť v našich klimatických a ekologických podmienkach, s cieľom začleniť ich do produkčného systému.



In vitro kultivácia druhu *Vaccinum*

1. Mikromnoženie netradičných druhov bobuľových drevín

In vitro množenie (mikromnoženie) je spôsob množenia rastlinného materiálu využitím moderných metód pletivových kultúr za účelom produkcie veľkého počtu rovnakých rastlín. Je významnou súčasťou komerčného množenia mnohých druhov rastlín, vrátane prirodzene rozšírených druhov a vyšľachtených odrôd bobuľových drevín. Vyvinuté boli početné techniky množenia drevín *in vitro*, ktoré zahŕňajú tvorbu a predlžovanie výhonkov z existujúcich pazušných a vrcholových púčikov, spiach púčikov, regeneráciu adventívnych výhonkov alebo kultiváciu a regeneráciu rastlín z izolovaných meristémov. Ako primárny materiál pre založenie bunkových a pletivových kultúr *in vitro* sú používané malé kúsky rastlín - explantáty, ktoré sú podrobené povrchovej sterilizácii. Explantátmi môžu byť izolované spiace púčiky, stonkové segmenty nesúce spiace púčiky (nodálne segmenty), listy, stonky alebo ich časti. Všetky postupy zahrňujúce prácu s explantátmi a ich pestovaním musia byť uskutočnené v sterilnom prostredí pri definovaných podmienkach. To znamená, presne definované kultivačné médium so špecifickými typmi a koncentráciami rastových regulátorov, kontrolované podmienky svetla, teploty a relatívnej vlhkosti v kultivačnej miestnosti alebo v rastovej komore.

1.1 Štádia mikromnoženia

Proces mikromnoženia rastlín zahŕňa štyri definované štádia:

Štádium 1: Založenie sterilnej kultúry - uloženie povrchovo sterilizovaného rastlinného

materiálu na kultivačné médium a začiatok rastu výhonkov.

Cieľom tohto štádia je založiť sterilnú kultúru a poskytnúť rastlinnému materiálu kultivačné prostredie, ktoré podporuje iniciáciu a rast výhonkov. V závislosti na type rastlinného pletiva môže byť tvorba výhonkov iniciovaná z existujúcich meristémov vrcholových a pazušných púčikov, z adventívnych meristémov vznikajúcich *de novo* na explantátoch, ako sú časti výhonkov, listov, stoniek, kvetných stoniek alebo klíčnych listov (**priama organogenéza**), alebo z kalusu, ktorý sa vyvíja na reznom povrchu explantátu (**nepriama organogenéza**). Pre ukončenie tohto štádia je obvyčajne potrebných 4 - 6 týždňov. Niektoré druhy drevín vyžadujú dlhšie obdobie (12 mesiacov), vtedy hovoríme o “**stabilizácii**” kultúry. Kultúra je stabilizovaná vtedy, keď explantáty produkujú počas kultivácie stabilný počet normálnych výhonkov.

Štádium 2: Multiplikácia - predlžovanie, t.j. produkcia mnohopočetných výhonkov.

V tomto štádiu každý explantát produkuje početné výhonky a vytvára zhuk výhonkov. Výhonky sa neskôr oddelia a preniesú na nové kultivačné médium, na ktorom sa pestujú 2 - 8 týždňov. Materiál sa môže preniesť niekoľkokrát, aby sa maximalizovalo množstvo produkovaných výhonkov.

Štádium 3: Tvorba koreňov - predlžovanie výhonkov a ich zakoreňovanie.

Fáza zakoreňovania pripravuje rastliny získané v podmienkach *in vitro* pre ich prenos z laboratórnych do vonkajších (*in vivo*) podmienok v kontrolovanom prostredí, v skleníku a neskôr na ich konečnom stanovišti. Toto štádium môže zahŕňať nielen zakoreňovanie výhonkov, ale aj ich stabilizovanie smerujúce k zvýšeniu ich potenciálu pre aklimatizáciu a prežitie počas prenosu do pôdy. Indukcia adventívnych koreňov sa dosahuje buď v skúmavkách (*in vitro*) alebo v pôde (*ex vitro*) za prítomnosti rastových regulátorov. Výhodou zakoreňovania *ex vitro* je, že poškodenie koreňov počas prenosu rastlín do pôdy je menej pravdepodobné, hodnoty produkcie koreňov a kvalita koreňov sú vyššie.

Štádium 4: Aklimatizácia - prenos regenerovaných rastlín do pôdy v prirodzených podmienkach prostredia.

Prenos získaných rastlín do pôdy je často charakterizovaný nižším koeficientom prežívania. Pred prenosom rastlín na ich konečné stanovište, musia byť aklimatizované v kontrolovanom prostredí alebo v skleníku. Rastlinám prenášaným z *in vitro* do *ex vitro* podmienok sa postupne mení anatómia a morfológia listov. Prieduchy takýchto rastlín začínajú byť funkčné, pretože kým sú v kultúre *in vitro* majú zvyčajne otvorené prieduchy. Na povrchu listov sa vytvára ochranná epikutikulárna vosková vrstva. Týmto spôsobom sa regenerované rastliny postupne adaptujú na prežitie vo vonkajšom prostredí.

1.2 Mikropropagácia využitím spiacych púčikov alebo nodálnych segmentov

Pre komerčnú produkciu je v súčasnosti najviac využívanou technikou mikromnoženia rastlín predlžovanie výhonkov z izolovaných vrcholových alebo pazušných púčikov alebo stonkových segmentov, ktoré nesú jeden alebo viac bočných púčikov. Rast pazušných výhonkov je iniciovaný z existujúceho pletiva spiaceho pazušného púčika. Iniciácia rastu a následné zmnoženie výhonkov z púčikov sa uskutočňuje na kultivačných médiách obohatených o rastové regulátory, najmä vplyvom relatívne vysokej koncentrácie cytokinínu alebo kombináciou vyššej koncentrácie cytokinínu s nižšou koncentráciou auxínu. Optimálne zloženie kultivačného média a rastových regulátorov je potrebné pre každý rastlinný druh overiť experimentálne v laboratóriu. Druhou možnosťou je čerpať informácie z existujúcich postupov, dostupných pre

konkrétny rastlinný druh či odrodu.

1.2.1 Odber a sterilizácia rastlinného materiálu

Odber rastlinného materiálu:

Ako východzí materiál pre založenie *in vitro* kultúr sa používajú jednoročné výhonky so spiacimi vrcholovými a pazušnými púčikmi. Materiál je potrebné odoberať z dospe-
lých rastlín v mesiacoch január a február.

Sterilizácia rastlinného materiálu:

Na odstránenie povrchovej infekcie (huby, kvasinky a baktérie) je potrebná dezin-
fekcia púčikov pred ich vysadením na kultivačné médium. Povrchová sterilizácia musí
byť dostatočne účinná, aby odstránila kontaminanty, avšak s minimálnym poškodením
rastlinných buniek a pletív.

- 1) Pracovné náradie (skalpel, pinzeta, nožnice, podložka pre sterilné nástroje, sklené ka-
dičky, sklená Petriho miska s niekoľkými filtračnými papiermi, gáza) obalené v hliníkovej
fólii a fľaše s destilovanou vodou sa sterilizuje v parnom sterilizátore pri 120 °C a 18 kPa
po dobu 20 min.
- 2) Laminárny box sa sterilizuje ultrafialovým žiarením 3 hodiny a umytím vnútorného
povrchu boxu 95 % etanolom. Sterilizácia materiálu prebieha v laminárnom boxe.
- 3) Výhonky so spiacimi vrcholovými a pazušnými púčikmi sa nastrihajú na jednono-
dálne segmenty (s jedným púčikom), odstráni sa kôra a takto pripravené segmenty
sa premývajú 1 hodinu pod tečúcou vodou (pre uľahčenie manipulácie sú segmen-
ty zabalené v balíčkoch z gázy).
- 4) Po dvojminútovej sterilizácii v 70 % etanole sa segmenty prepláchnu v sterilnej
destilovanej vode a následne, za stáleho miešania, sa sterilizujú po dobu 6 minút
v 0,1 % roztoku HgCl_2 , do ktorého sa pridajú 3 kvapky zmäkčovadla (napr. Tween 20).
- 5) Následne sa sterilné odrezky premývajú 3 x 15 minút v sterilnej destilovanej vode.
Po sterilizácii sa z púčikov odstráni vrchné šupiny a nodálne segmenty sa pestujú
horizontálne alebo vertikálne na kultivačnom médiu, prípadne sa jednotlivé púčiky
oddelia od stonky a vysadia na médium.

1.2.2 Primárny explantát pre založenie *in vitro* kultúr

Ako primárne explantáty pre iniciáciu výhonkov sa používajú vysterilizované jed-
nonodálne segmenty, ktoré sa kultivujú horizontálne na médiu v sterilných plastových
Petriho miskách.

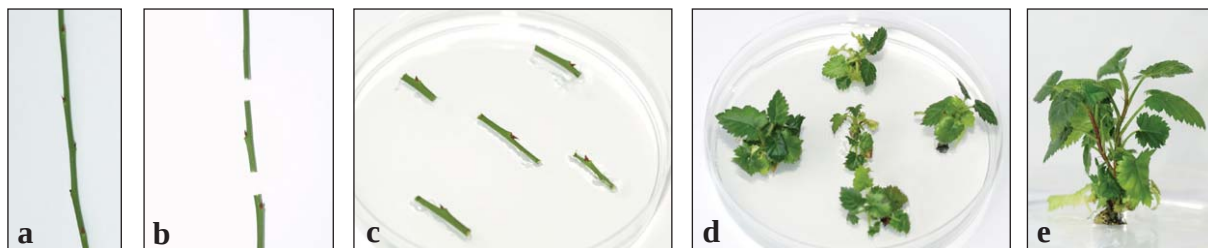
1.2.3 Zloženie kultivačného média pre *in vitro* multiplikáciu ostružiny černicovej

Ako modelový druh použijeme ostružinu černicovú (*Rubus fruticosus* L.) Pre
iniciáciu a multiplikáciu výhonkov ostružiny černicovej sa používa multiplikačné mé-
dium podľa Murashige a Skoog (tzv. MS médium), doplnené sacharózou (30 g.l⁻¹),
Plant agarom (8 g.l⁻¹), rastovými látkami BAP (1 mg.l⁻¹), IBA (0,1 mg.l⁻¹) a GA₃
(0,1 mg.l⁻¹). pH média sa upraví na hodnotu 5,6 - 5,8.

V súčasnosti sú dostupné komerčné základné kultivačné média, rastové regulátory
a ostatné komponenty médií v podobe prášku alebo roztoku vyrábané komerčnými
firmami ako sú Duchefa a Sigma.

Rastliny sa kultivujú pri teplote 22 – 24 °C, pri intenzite svetla 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
a fotoperióde 16 hodín svetlo a 8 hodín tma.

Po niekoľkých týždňoch kultivácie sa vytvorí trs mnohopočetných výhonkov. Výhon-
ky v dĺžke 2 - 3 cm sa oddelia, nasekajú na segmenty a opakovane kultivujú na rovna-
kom médiu (obr. 1).



Obr. 1 - *In vitro* multiplikácia ostružiny čiericovej (*Rubus fruticosus* L.) použitím jednonodálnych segmentov

- a) výhonok so spiacimi púčikmi
- b) primárny explantát – jednonodálny segment so spiacim púčikom
- c) nodálne segmenty vysadené na kultivačné médium
- d, e) formujúce sa trsy výhonkov

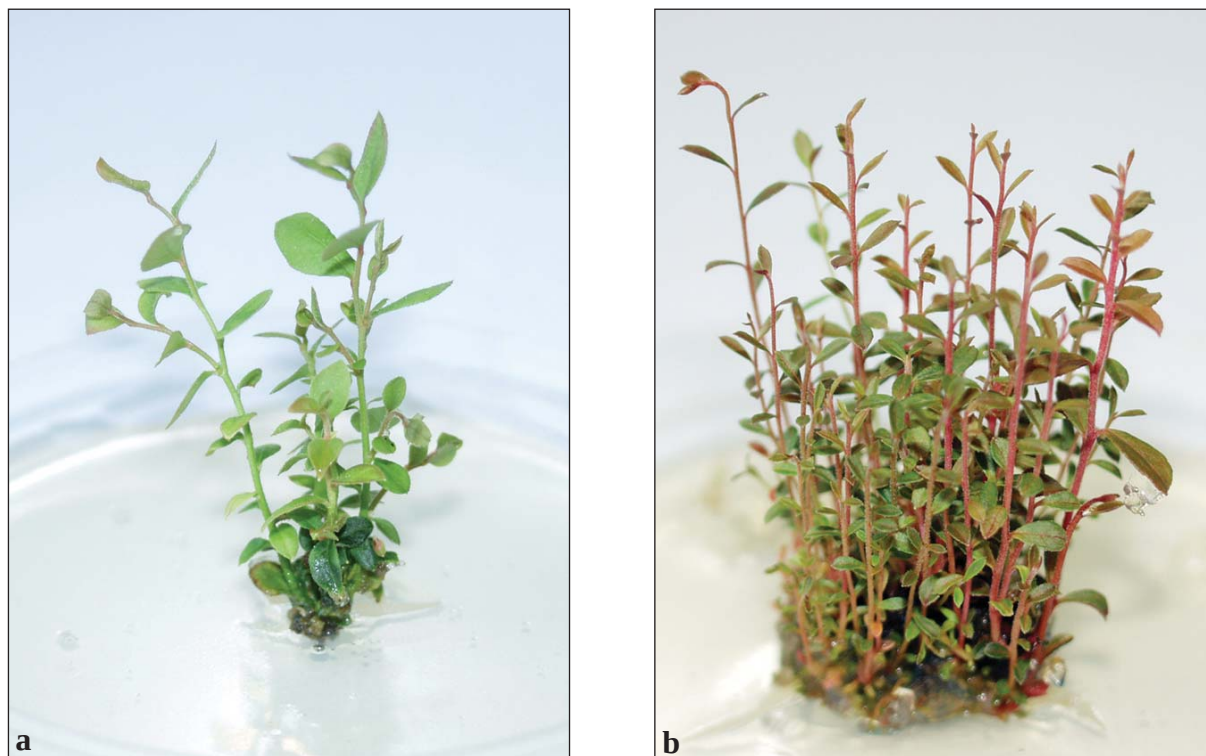
1.2.4 Zloženie kultivačného média pre *in vitro* multiplikáciu *Vaccinium* sp.

Pre iniciáciu a multiplikáciu výhonkov čučoriedky chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) a brusnice pravej (*Vaccinium vitis-idaea* L.) sa používa multiplikačné McCown Woody Plant Medium (tzv. WPM médium), doplnené sacharózou (25 g.l⁻¹), Plant agarom (8 g.l⁻¹), rastovými látkami zeatín (1 - 2 mg.l⁻¹) a IAA (0,2 mg.l⁻¹). Pretože druhy rodu *Vaccinium* patria medzi acidofilné rastliny (dobre znášajúce resp. vyžadujúce kyslú reakciu substrátu), pH média sa upraví na 4,5 - 4,8.

Rastliny sa kultivujú pri teplote 22 – 24 °C, intenzite svetla 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16 hodín svetlo a 8 hodín tma.

Po niekoľkých týždňoch kultivácie sa vytvorí trs mnohopočetných výhonkov (obr. 2).

Výhonky o dĺžke 2-3 cm sa oddelia, nasekajú na segmenty a opakovane kultivujú na rovnakom médiu (obr. 2). Pre dlhodobú multiplikáciu sa odporúča znížiť hladinu cytokinínu zeatín na koncentráciu 0,5 mg.l⁻¹, aby sa zabránilo potláčaniu predĺžovacieho rastu výhonkov.



Obr. 2 - *In vitro* multiplikácia *Vaccinium* spp. použitím jednonodálnych segmentov

- a) Čučoriedka chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) - trsy výhonkov v *in vitro* podmienkach
- b) Brusnica pravá (*Vaccinium vitis-idaea* L.) - trsy výhonkov v *in vitro* podmienkach

1.3 Mikromnoženie pomocou adventívnej regenerácie

Vytváranie nového tvaru a organizácie, kde predtým bol neprítomný, je nazývaný **morfogenéza** alebo **organogenéza**. Rastlinné pletivá alebo orgány, ktoré majú schopnosť morfogenézy/organogenézy sú označované ako morfogénne alebo organogénne. Regenerácia výhonkov (**caulogenesis**) a koreňov (**rhizogenesis**) prebieha oddelene. Novovzniknutým orgánom sa hovorí adventívne alebo vedľajšie. Adventívne meristémy sa vyvíjajú *de novo* a v podmienkach *in vitro* môžu vznikať priamo na stonkách, koreňoch, alebo listových explantátoch často po poranení pletiva alebo vplyvom exogénnych regulátorov rastu bez tvorby kalusu (*priama organogenéza*). Formovanie adventívnych púčikov a výhonkov na explantátoch je najčastejšie indukované rastovými regulátormi cytokinínmi. Obyčajne sa vyvíjajú blízko existujúcich vodivých pletív (cievných zväzkov), čo umožňuje spojenie ich cievneho systému s cievny systémom pôvodného explantátu. Explantáty, na ktorých sa vytvorili adventívne výhonky, je potrebné po 5 - 6 týždňoch kultivácie preniesť na médium s nižším obsahom cytokinínov aby sa podporil predlžovací rast výhonkov. Výhonky v dĺžke približne 2-3 cm sa oddelia a vysadia na multiplikačné médium pre ich ďalšiu proliferáciu.

Počas priamej organogenézy sa adventívne orgány často formujú v pletivách explantátu z jednotlivých buniek alebo z niekoľkých buniek. Existuje dôkaz, že jednoduchá pokožková bunka dáva rast meristematickým centrá, pričom z jedného môže vyrásť aj viac ako 22 identických výhonkov. Ak je meristém iniciovaný z viacerých buniek, vtedy sa môže pri získaných rastlinách v značnom rozsahu objaviť jav - tzv. **chimerizmus**

Adventívne orgány niekedy vznikajú aj z nešpecializovaných a neorganizovaných buniek kalusu, ktorý sa tvorí na reznom povrchu explantátov.

Počas adventívnej regenerácie môžeme niekedy pozorovať **somaklonálnu variabilitu**. Jedná sa o variabilitu pozorovanú na rastlinách získaných v *in vitro* podmienkach. Z hľadiska mikromnoženia identického klonálneho materiálu je somaklonálna variabilita nežiadúcim javom v kultúre.

Metódy indukcie priamej morfogenézy na kultivovaných pletivách sú optimalizované a využívané pri zvyšujúcom sa počte rastlinných druhov. Priama regenerácia výhonkov je dôležitý prostriedok, ktorým môže byť mnoho druhov rastlín množných pre komerčné účely. Adventívna regenerácia sa intenzívne využíva v rastlinných biotechnológiách, nielen pre mikropropagáciu, ale aj pre genetickú transformáciu, a pre štúdium vývinu rastlín.

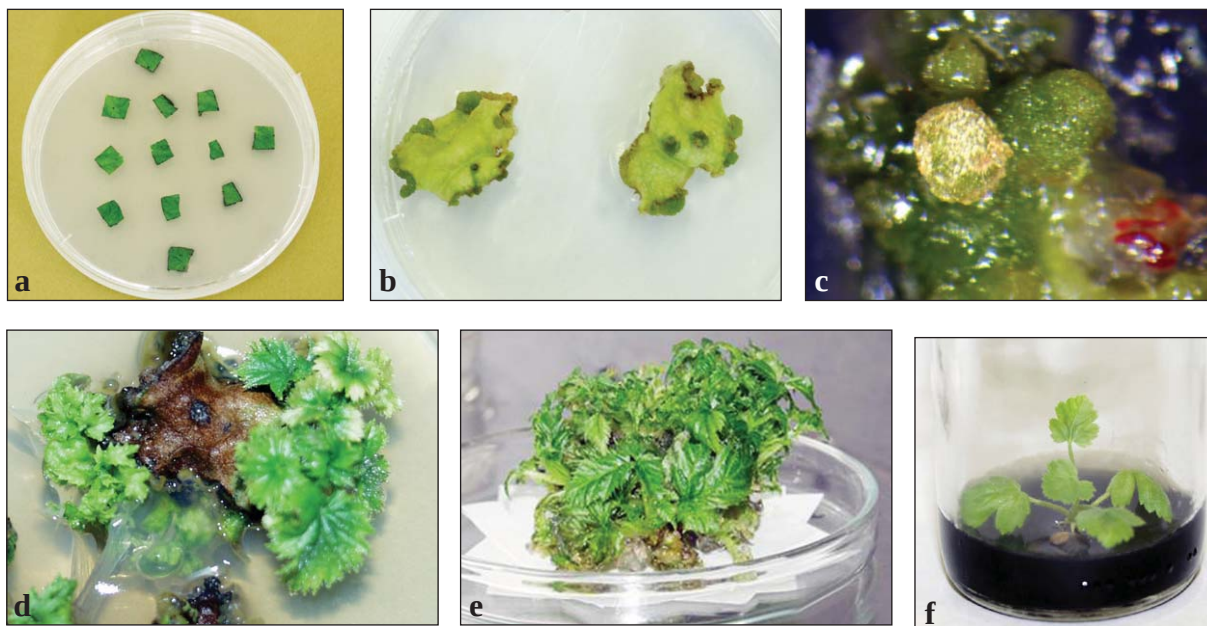
1.3.1 Primárne explantáty pre adventívnu regeneráciu *Rubus* a *Vaccinium* spp.

Ako primárne explantáty pre indukciu adventívnych výhonkov sa používajú napr. listy z *in vitro* rastlín odvodených z púčikovej kultúry a listové stopky z odoberaných listov. Explantáty je potrebné izolovať približne dva týždne od posledného prenosu na čerstvé kultivačné médium z multiplikačného média. Listová čepeľ sa priečne nareže skalpelom a spodnou stranou listu sa položí na médium tak, aby bola v tesnom kontakte s povrchom média. Kultivácia prebieha v sklených Erlenmeyerových bankách, do ktorých sa uloží približne 5 explantátov. Rastliny sa kultivujú pri teplote 22 – 24 °C, intenzite svetla 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16 hodín svetlo a 8 hodín tma.

1.3.2 Zloženie kultivačného média pre adventívnu regeneráciu ostružiny černicovej

Pre indukciu adventívnych výhonkov pri ostružine černicovej sa používa kultivačné médium podľa Murashige a Skoog (MS médium), doplnené sacharózou (30 g.l⁻¹), Plant agarom (8 g.l⁻¹), rastovými látkami TDZ (1 mg.l⁻¹) a IBA (0,05 mg.l⁻¹), pH média sa upraví na 5,6 - 5,8. Predlžovanie výhonkov sa dosiahne prenesením explantátov

s indukovanými výhonkami (po 5-6 týždňoch kultivácie) na médium so zníženou koncentráciou cytokinínu. Predlžovanie výhonkov môže byť podporené aj kultiváciou na médiách bez rastových regulátorov, prípadne na médiách s aktívnym uhlím (obr. 3).

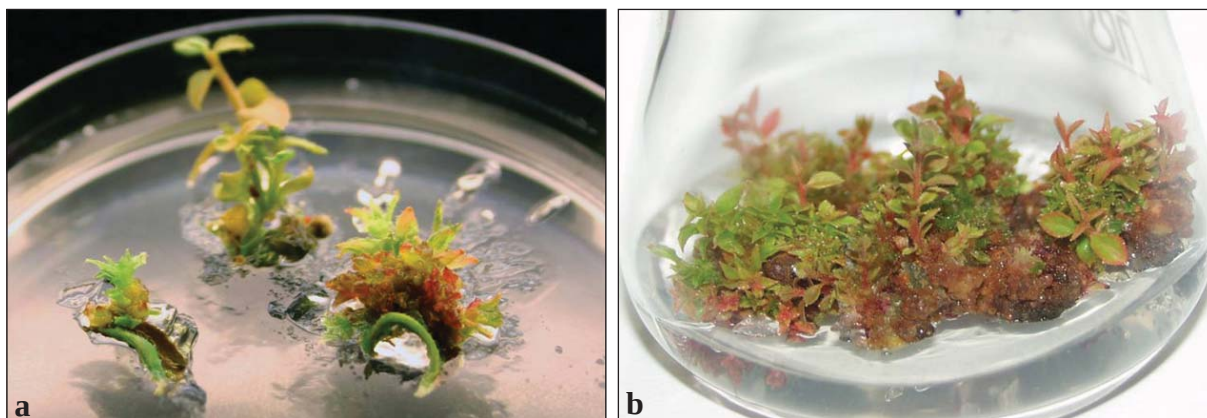


Obr. 3 - Regenerácia adventívnych výhonkov z listových explantátov ostružiny čiericovej (*Rubus fruticosus* L.)

a) primárny explantát – list odoberaný z *in vitro* rastliny, b) tvorba meristematických centier na explantáte, c) detail meristematických centier, d) regenerácia výhonkov z meristematických centier, e) trs adventívnych výhonkov, f) oddelený výhonok rastúci na predlžovacom médiu s aktívnym uhlím

1.3.3 Zloženie kultivačného média pre adventívnu regeneráciu čučoriedky a brusnice

Pre indukciu tvorby adventívnych výhonkov čučoriedky chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) a brusnice pravej (*Vaccinium vitis-idaea* L.) sa používajú listy odoberané z *in vitro* rastlín, ktoré sa kultivujú na kultivačnom McCown Woody Plant Medium (WPM médium), doplnenom sacharózou (25 g.l⁻¹), Plant agarom (8 g.l⁻¹), rastovými látkami TDZ (2 - 5 mg.l⁻¹) a IAA (0,2 mg.l⁻¹). Pretože druhy rodu *Vaccinium* patria medzi acidofilné rastliny, pH média sa upravuje na hodnotu 4,5 - 4,8. Po niekoľko týždňovej kultivácii na tomto médiu sa explantáty, na ktorých sa indukovali výhonky, preniesú na médium so zníženou koncentráciou cytokinínu (0,5 mg.l⁻¹ zeatínu), aby sa zabránilo potláčaniu predlžovacieho rastu výhonkov (obr.4).

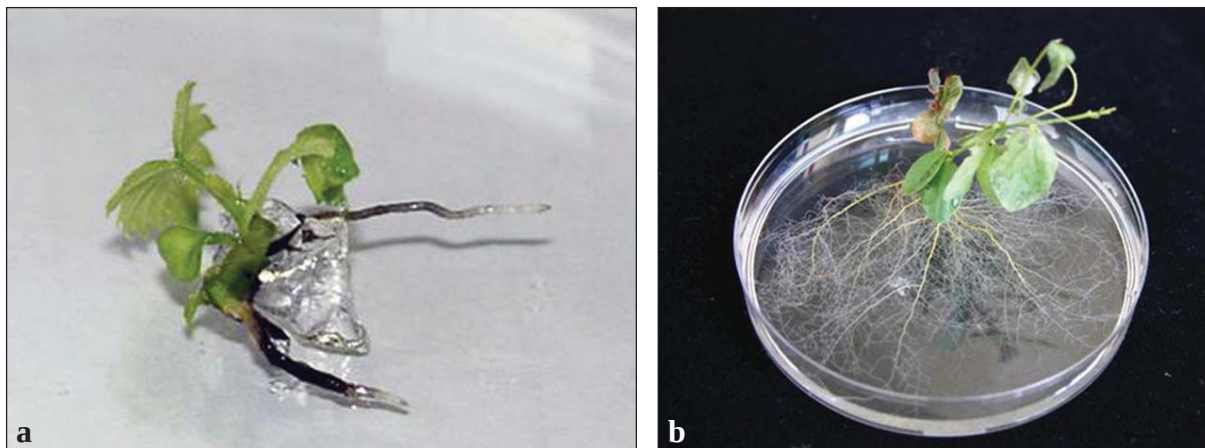


Obr. 4 - Regenerácia adventívnych výhonkov z listových explantátov čučoriedky

a) regenerácia adventívnych výhonkov z listu čučoriedky
b) trs adventívnych výhonkov čučoriedky

1.4 Zakoreňovanie výhonkov

Dôležitou etapou mikrorozmnožovania, zvlášť z praktického hľadiska, je navodenie tvorby koreňov. Zakoreňovanie výhonkov sa uskutočňuje 1) v podmienkach *in vitro* - na kultivačnom médiu s obsahom rôznych koncentrácií rastového hormónu auxínu, najčastejšie IBA (obr. 5), alebo 2) v *in vivo* - krátkym namáčaním výhonkov v roztoku auxínu s následným priamym prenosom do vhodného substrátu (obr. 6). Pre acidofilné rastliny, kam patria druhy rodu *Vaccinium*, je ako substrát potrebná rašelina, ktorej pH je 4 - 4.5. Adaptácia rastlín na podmienky *in vivo* prebieha pri regulovanej vlhkosti v skleníku alebo prikrytím kultivačných nádob priesvitnou fóliou a ich postupným otužovaním.



Obr. 5 - *In vitro* zakoreňovanie výhonkov ostružiny černicovej (a) a čučoriedky chocholíkatej (b)



Obr. 6 - *In vivo* zakoreňovanie výhonkov

- a) *In vivo* zakoreňovanie výhonkov čučoriedky chocholíkatej
- b) Aklimatizácia rastlín čučoriedky chocholíkatej
- c) Aklimatizácia rastlín brusnice pravej

1.5 Niektoré problémy pri *in vitro* kultivácii a ich riešenie

Niektoré rastlinné pletivá vylučujú do živného média tmavo sfarbené komponenty (fenoly alebo pigmenty), ktoré sa uvoľňujú z rezných plôch. Toto môže zapríčiniť **hnednutie pletiva** aj živného média a je často spojené so zníženou regeneračnou schopnosťou. Tento problém môže byť odstránený minimalizáciou poranenia explantátu počas izolácie a povrchovej sterilizácie. Iné prístupy ako zabrániť hnednutiu pletív zahŕňajú - odstránenie týchto látok premývaním explantátov v sterilnej vode 2-3 hodiny, častý prenos explantátov na čerstvé médium súčasne s odstraňovaním hnedého pletiva, počiatočnú kultiváciu v tekutom živnom médiu s následným prenosom na pevné médium, kultiváciu na poróznych substrátoch (papierové mostíky) a ich absorpciu pomocou aktívneho uhlia alebo polyvinylpyrolidonu (PVP), ktoré sa pridávajú do kultivačného média.

Na druhej strane napríklad aktívne uhlie môže absorbovať aj niektoré regulátory rastu alebo môže byť toxické pre niektoré pletivá. Zabrániť hnednutiu pletiva v kultúre môže tiež použitie antioxidantov ako kyselina askorbová, kyselina citrónová, L-cystein alebo merkaptóetanol. Nadmerné hnednutie môže zapríčiniť vážne problémy v rôznych štádiách regenerácie výhonkov.

Ďalším problémom, s ktorým sa v kultúre *in vitro* môžeme stretnúť je **hyperhydritita** (vitrifikácia). Jedná sa o fyziologickú poruchu, ktorá sa vyskytuje v rastlinných pletivových kultúrach, kedy vyvíjajúce sa štruktúry majú vodnatý, sklovitý vzhľad. Môže byť zapríčinená vysokou koncentráciou cytokínínov, vysokou kapacitou zadržiavania vody, keď je kultivačná nádoba príliš tesne uzavretá, alebo veľmi nízkou koncentráciou agaru v médiu.

Niekedy pozorujeme pri kultivácii tiež **pokles životaschopnosti *in vitro* kultúry, zastavenie rastu a predlžovanie výhonkov**. Príčinou môže byť niekoľko faktorov, akými sú nevhodná skladba kultivačného média, nedostatok niektorých živín a nedostatok vápnika, ktorý zapríčiňuje **nekrózu rastového vrcholu**.

Prítomnosť skrytej mikrobiálnej infekcie tak isto znižuje regeneračnú schopnosť a prežívanie kultúry. Po dlhom pestovaní rastlín na médiu s cytokínínom môžeme pozorovať tzv. **habituáciu kultúry** (návyk). Po prenose rastlín na médium bez cytokínínu sa prejavuje intenzívnym rastom krátkych výhonkov, neschopnosťou výhonkov predlžovať sa a zakoreňovať. Počas dlho trvajúcej kultivácie sa môže objaviť úplná strata regeneračnej schopnosti zapríčinená epigenetickou variabilitou a starnutím kultúry.

Počas *in vitro* regenerácie môžeme pozorovať aj jav **somaklonálnej variability**. Jej významným zdrojom sú chromozómové aberácie (chromozómové prestavby). Somaklonálna variabilita je typická pre rastliny regenerované z kalusu. Pre potvrdenie klonálnej identity vegetatívne množeného rastlinného materiálu sa používajú cytologické, biochemické a molekulárne analýzy. Takéto analýzy umožňujú účinné a rýchle testovanie nežiadúcej genetickej variability v porovnaní s tradičnými metódami založenými na morfológických a fyziologických pozorovaniach.

2. Aplikácia pletivových kultúr pre klonálne množenie netradičných druhov bobuľových drevín

Mikropropagácia je spôsob množenia rastlinného materiálu využitím moderných metód pletivových kultúr s cieľom produkcie veľkého počtu identických rastlín. Jej aplikácia je v množení rastlín, ktoré sa prirodzene vyskytujú v prírode, alebo rastlín, ktoré boli vytvorené šľachtením. Je taktiež využívaná pre rýchle a masové množenie vegetatívne rozmnožovaných rastlín alebo rastlín, ktoré neprodukujú semená. Za posledné desaťročia sa urobili zásadné pokroky pri *in vitro* regenerácii mnohých ekonomicky a ekologicky významných rastlín v poľnohospodárstve, záhradníctve, ale aj v lesníctve. Rôzne techniky *in vitro* regenerácie bobuľových drevín môžu ponúknuť určité výhody v porovnaní s tradičnými metódami rozmnožovania.

Hlavnými výhodami používania *in vitro* kultúr v lesníctve je najmä to, že poskytujú:

- 1) možnosť rýchleho masového množenia rastlín
- 2) kultivácia *in vitro* v prísne kontrolovaných podmienkach zaisťuje efektívnu klonálnu propagáciu geneticky identických jedincov
- 3) dosahuje sa vyšší množiteľský koeficient (až $1:10^9$) ako pri rezkovaní

- 4) množenie je nezávislé od ročného obdobia, vývinovej fázy rastliny, východzí materiál je dostupný nepretržite, pretože ako zdroj explantátov slúžia odvodené *in vitro* kultúry
- 5) možnosť pracovať v aseptickom a regulovateľnom prostredí
- 6) možnosť ozdraviť rastlinný materiál od patogénov, najmä vírusov, čo vedie k dosahovaniu vyšších úrod
- 7) možnosť dlhodobého udržiavania genetických zdrojov rastlín v *in vitro* kultúre
- 8) možnosť uplatnenia nových biotechnologických metód, najmä metód genetického inžinierstva, alebo produkciu sekundárnych metabolitov

Intenzívne veľkoplošné pestovanie bobuľového ovocia na plantážach je na Slovensku sústredené **v regiónoch Oravy a Liptova** (obr. 7, 8, 9). Extrémne kyslé pôdy horských oblastí sú využiteľné na pestovanie čučoriedok a brusníc v súlade s požiadavkami na environmentálne aspekty a ochranu pôvodného genofondu. Očakáva sa, že najmä pestovanie čučoriedok a brusníc by malo zabrániť devastovaniu prirodzených populácií druhov rodu *Vaccinium* a malo by prispieť k rozvoju efektívnych a environmentálne prijateľných foriem využitia a obhospodarovania problematických poľnohospodárskych pôd podhorských a horských oblastí severného Slovenska.

3. Závery a perspektívy

Vývoj *in vitro* techník umožnil rýchle mikromnoženie rôznych rastlinných druhov a tiež nových odrôd čučoriedok, brusníc a černíc. *In vitro* kultiváciou vrcholových a pazušných púčikov, adventívnou regeneráciou z listových explantátov je možné dosiahnuť efektívnu a masovú produkciu zdravých rastlín. Výsledky výskumov ukázali, že účinnosť regenerácie *in vitro* značne závisí na niekoľkých faktoroch, ako napríklad hormonálne a minerálne zloženie média (základné kultivačné médium, typ a koncentrácia rastlinných regulátorov rastu), vek a typ explantátov (spiace púčiky, nodálne segmenty, listy, listové stopky, atď.), pôvod explantátov (*in vitro* alebo *in vivo*), orientovanie explantátu počas regenerácie, ako aj podmienky pestovania (dĺžka pestovania, foto-periód, intenzita svetla, teplota). Avšak, vo všetkých prípadoch, účinnosť regenerácie široko varíruje medzi genotypmi, ktoré naznačujú potrebu optimalizovať podmienky *in vitro* kultivácie pre každý individuálny rastlinný druh alebo odrodu. Optimalizácia vplyvu jednotlivých faktorov, pôsobiacich v podmienkach *in vitro* a ich cielená regulácia bude viesť k vypracovaniu systémov reprodukcie pôvodných (autochtónnych), ako aj introdukovaných druhov. Napríklad produktívnych odrôd druhov rodu *Vaccinium* a *Rubus* so zaujímavými vlastnosťami (kvalita, veľkosť a chuť plodov), ktoré sú vhodné pre pestovanie v našich klimatických podmienkach. Využitie genetickej základne pôvodných druhov, so zámerom ich efektívnej reprodukcie v podmienkach *in vitro*, je významné nielen z hľadiska zachovania biodiverzity, ale aj revitalizácie prirodzených porastov, ktoré sú dôležité z hľadiska environmentálne prijateľného využitia veľmi kyslých a neúrodných pôd.

Mikromnoženie odrôd čučoriedky chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) môže mať aj spoločensko-ekonomický význam. Predstavuje prínos z hľadiska možnosti rozšírenia pestovateľskej základne a tým pádom obmedzenie dovozu odrôd zo zahraničia. K výhodám kultúr *in vitro* patrí možnosť dlhodobého uskladnenia a uchovania *in vitro* získaných rastlín produkčne výkonných odrôd, ako aj v prírode rastúcich druhov.

Podmienky *in vitro* vytvárajú možnosť imitácie vplyvu rôznych stresových faktorov na proces regenerácie za účelom testovania reakcie a tolerance vybraných druhov

na stres. Stresový faktor, ktorý je možné imitovať v podmienkach *in vitro* je napr. vplyv ťažkých kovov.

V teoretickej oblasti bude významným prínosom rozšírenie poznatkov o morfo-
génnych procesoch prebiehajúcich v kultúre *in vitro* uvedených druhov na bunkovej
a biochemických úrovni, ako aj charakteru a stupňa variability pri získaných ras-
tlinách.



Obr. 7

- a) Plantáž čučoriedky chocholíkatej (*Vaccinium corymbosum* L.) v Krivej na Orave
- b) Čučoriedka chocholíkátá
- c) Brusnica pravá



Obr. 8 - Príklad pestovania malín súkromnými hospodármi pre komerčné účely v horských oblastiach Srbska



Obr. 9 - Zakladanie veľkoplošných výsadiel brusníc na Orave

Transgénne dreviny

Dlhodobý zásah človeka do prírody spôsobuje pomaly, ale iste zmeny v klimatických podmienkach. Posledné štúdie naznačujú, že takéto zmeny môžu postupne vyústiť do zániku skoro polovice rastlinných druhov, nevynímajúc dreviny. Stromy, ktoré nazývame aj pľúca zeme, svojou prítomnosťou v prírode zohrávajú nezameniteľnú úlohu, preto je veľmi dôležitá ich adaptácia na meniace sa životné podmienky. Napriek tomu, že klasické šľachtenie stromov má dlhodobú tradíciu, v súčasnosti už nedokáže dostatočne pružne reagovať na meniace sa životné podmienky. Na rozdiel od klasického šľachtenia, kde sa umelou hybridizáciou môžu prenášať až desiatky génov, metódou genetickej modifikácie alebo transgenózy sa síce prenesie len jeden nanajvýš tri gény, avšak tieto gény už konkrétne dokážu vylepšiť vlastnosti. Génové inžinierstvo predstavuje jedinečný nástroj, ktorým dokážeme prekonať sexuálne bariéry, ovplyvniť samotný vývin drevín alebo kvalitu dreva. V porovnaní s plodinami, z ktorých mnohé sú už dnes dostupné v komerčnom prostredí, genetická modifikácia drevín zaostáva a vo väčšine prípadov sú geneticky modifikované stromy zatiaľ len v poľných pokusoch.



Cieľom tejto kapitoly je priniesť informácie o tom, čo sú to transgénne dreviny, ako sa pripravujú, ich výhody, ale aj riziká, ktoré prinášajú. Oboznámiť čitateľa ako sa využívajú poznatky genetického inžinierstva pri príprave transgénnych drevín. Prehľadným spôsobom uviesť, ktoré dreviny boli doteraz geneticky modifikované a za akým účelom.

Transgénne dreviny

Jana Libantová, Jana Moravčíková

Rozvoj technológie transgénnych stromov môže vylepšiť ich rastové charakteristiky, schopnosť zakoreňovať, kvalitu dreva, uľahčiť ich priemyselné spracovanie, zvýšiť ich toleranciu na herbicídy a odolnosť voči chorobám a škodcom.

Pilotné poľné pokusy s geneticky modifikovanými topoľmi tolerantnými ku herbicídum boli uskutočnené v Belgicku v roku 1988. Odvtedy bolo uskutočnených vo svete viac ako 200 poľných pokusov zahrňujúcich viac ako 15 lesných druhov.

Komerčné pestovanie transgénnych stromov sa datuje od roku 2002. Išlo o výsadbu transgénneho topoľa čierneho rezistentného voči škodcom v Číne. Súčasné šľachtenie drevín sa zameriava hlavne na zlepšenie efektívnosti, kvality, a mohutnosti stromov. Tradičné postupy zahrňujú vytypovanie dospelých jedincov s výnimočnými vlastnosťami, ktoré sa potom stanú súčasťou šľachtiteľského programu. Značnou nevýhodou je čas, ktorý dreviny potrebujú na to, aby dosiahli reprodukčnú zrelosť, čo často presahuje aj 20 rokov. Práve reprodukčný cyklus sa stáva limitujúcim faktorom pre kontrolované kríženie drevín. Navyše neexistuje garancia, že získané potomstvo bude mať vylepšené vlastnosti.



Prvé sofistikovanejšie postupy zamerané na získavanie kvalitných genotypov lesných drevín sa objavili v 80. rokoch minulého storočia. Tieto biotechnologické prístupy zahrňovali pletivové kultúry, mikropropagáciu, genetické markery a genetické inžinierstvo. Zo všetkých týchto metód, práve genetickému inžinierstvu sa dostalo najväčšej pozornosti zo strany nielen odbornej, ale aj laickej verejnosti. Je to dané tým, že prenos génov konvenčnými šľachtiteľskými technikami je limitovaný sexuálnou kompatibilitou jednotlivých druhov alebo ich blízkych príbuzných, zatiaľ čo pomocou genetického inžinierstva je možné prenášať gény aj zo vzdialených druhov, čo by za normálnych podmienok nebolo možné. Oba prístupy, či už klasické šľachtenie alebo genetické inžinierstvo, majú spoločný cieľ a to zlepšiť zdravie a adaptabilitu lesnej populácie, poprípade zlepšiť kvalitu dreva pre priemyselné využitie.

Vo všeobecnosti môžeme povedať, že postupy, ktoré využíva konvenčné šľachtenie alebo genetické inžinierstvo sa od seba striktne neodlišujú, oba zahrňujú techniky, ktoré sa navzájom prekrývajú. Tradičné šľachtenie využíva najmä sexuálne kríženie a sledovanie fenotypických zmien, zatiaľ čo genetické inžinierstvo alebo biotechnológie ako také, vyžadujú prácu hlavne v laboratórnych a skleníkových podmienkach. Využívanie týchto modernejších metód môže v porovnaní so selekciou uskutočňovanou len na základe fenotypických zmien priniesť kvalitnejšie poznatky a výstupy. To je dôvod, prečo v posledných 20-tich rokoch biológovia čoraz viac siahajú po metódach, ktoré šetria čas, náklady a umožňujú dosiahnuť nové ciele.

1. Čo je genetické inžinierstvo?

Neoddeliteľnou súčasťou génového inžinierstva ako aj samotnej genetiky sú gény. **Gény** sú úseky DNK, ktoré zodpovedajú za špecifické črty alebo vlastnosti každého živého organizmu. DNK je chemická molekula, ktorá obsahuje informáciu vytvárajúcu celý organizmus. Napríklad naša DNK nám dáva jedinečnosť, zodpovedá za to ako vyzeráme, akú máme farbu očí, vlasov, atď. DNK je ako „recept“ pre daný organizmus. Život, rast a unikátne črty organizmu závisia práve na jeho DNK.

Genetické inžinierstvo nám umožňuje manipulovať s jednotlivými génmi alebo ich úsekmi a prenášať ich cielene do iných organizmov, za účelom vylepšenia určitých ich vlastností tak, aby to bolo pre človeka osočné. Príkladom môže byť zlepšenie odolnosti poľnohospodársky významných plodín voči niektorým škodcom, poprípade rezistencia voči herbicídom.

Základom genetiky, z ktorej vychádza aj genetické inžinierstvo, sa stali poznatky Gregora Mendela, mnícha, ktorý žil v 19. storočí. Vďaka týmto objavom vedci mohli neskôr zistiť ako je to s dedičnosťou - či sa dá, a ako manipulovať s DNK. História genetického inžinierstva sa začala až omnoho neskôr a to v roku 1953 kedy Watson a Crick popísali štruktúru DNK. O 20 rokov neskôr molekulárni biológovia objavili vlastnosť enzýmov meniť štruktúru DNK v živých organizmoch. Niektoré z týchto enzýmov môžu štiepiť, iné zase spájať vlákna DNK. Tento poznatok umožnil využiť takéto enzýmy na vyštiepenie želaných génov, ich spojenie s inou DNK a vytvorenie tzv. **rekombinantnej molekuly DNK**. Pojmom žiadané alebo cielené gény nazývame gény, ktoré po prenose vylepšia vlastnosti danej rastliny či dreviny.

Prvý geneticky upravený organizmus (baktéria) bol vytvorený v roku 1973 a o 10 rokov neskôr bola pripravená aj prvá geneticky upravená plodina. Bolo len otázkou času, kedy sa poznatky genetického inžinierstva aplikujú aj pri drevinách. Prelom nastal v roku 1987, kedy bol v laboratórnych podmienkach prvýkrát takto vylepšený topoľ a o rok neskôr uskutočnené aj prvé pôdne testy. Genetické inžinierstvo sa tak stalo dôležitou súčasťou biotechnologických postupov aplikovaných na drevinách.

2. Čo nazývame genetickou modifikáciou?

Pojmom organizmus nazývame biologických jedincov (baktérie, rastliny, dreviny, atď.), ktoré sú schopné sa rozmnožovať alebo inak odovzdávať genetický materiál (svoje gény, teda DNK). Aby sa odlíšili organizmy, ktoré boli vylepšené pomocou genetického inžinierstva, zaviedol sa pojem **geneticky modifikovaný organizmus** (GMO) alebo aj **transgénny organizmus**. Takýmto označením nazývame všetky organizmy, ktorých genetická výbava (súbor génov) bola vylepšená iným spôsobom ako klasickým krížením. V prípade drevín, ktorých vlastnosti boli vylepšené pomocou génového inžinierstva, používame výraz geneticky modifikované alebo transgénne dreviny. Samotný proces prenosu génov do cudzej DNK nazývame **genetická modifikácia**, **transformácia** alebo aj **transgenóza**.

3. Metódy prenosu génov

Úlohou genetického inžinierstva je nielen hľadať, izolovať požadovaný gén a manipulovať s ním pomocou enzýmov, ale ho aj následne preniesť do cieľovej DNK (napr. DNK drevín). Na vývoji metód prenosu génov, ako ich poznáme v súčasnej podobe, sa začalo intenzívnejšie pracovať v 80. rokoch minulého storočia, kedy bolo po prvýkrát dokázané, že pôdna baktéria *Agrobacterium tumefaciens* môže byť využitá ako nástroj na prenos génov do buniek rastlín či drevín.

Metóda vychádza z prirodzenej vlastnosti tejto pôdnej baktérie napádať poranené časti rastlinných buniek a spôsobiť u nich nádorovité ochorenie (tumor). Unikátnosť tejto baktérie spočíva v tom, že má vlastný aparát, ktorým počas infekcie dokáže vniesť svoje vlastné gény do rastlinnej bunky a zabudovať ich do rastlinnej DNK, čo nazývame transformáciou alebo aj modifikáciou DNK. Nevýhodou tejto metódy je, že *Agrobacterium* infikuje prednostne dvojklíčnolistové rastliny (patria do jej hostiteľského radu), zatiaľ čo pri jednoklíčnolistových rastlinách a tiež drevinách sa objavujú problémy. Toto viedlo k hľadaniu iných možností prenosu génov, ktoré vychádzali z poznatkov výskumov živočíšnych buniek.

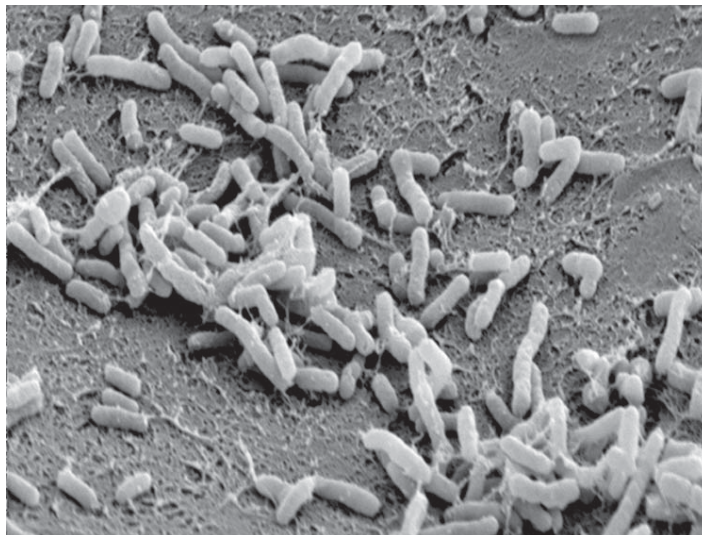
Alternatívu predstavuje metóda prenosu génov pomocou **bombardovania časticami kovov**, na ktoré je priľnutá DNK, ktorú chceme prenášať. Hoci v laboratórnych podmienkach bolo popísaných aj viacero iných metód, v súčasnosti sa pri drevinách na prenos génov využíva len *Agrobacterium tumefaciens* a bombardovanie.

3.1 Prenos génov pomocou *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je baktéria, ktorá sa bežne vyskytuje v pôde a v prítomnosti poranených rastlín sa dokáže presúvať smerom k nim a pritiahnuť k poraneným bunkám. Napriek tomu, že baktéria spôsobuje ochorenie, prejavom ktorého sú nádory (obr. 1), samotná baktéria do bunky nevstupuje, zostáva na povrchu takejto poranenej bunky (obr. 2).



Obr. 1 - Prejav ochorenia, ktoré spôsobuje v prírode *Agrobacterium tumefaciens*.



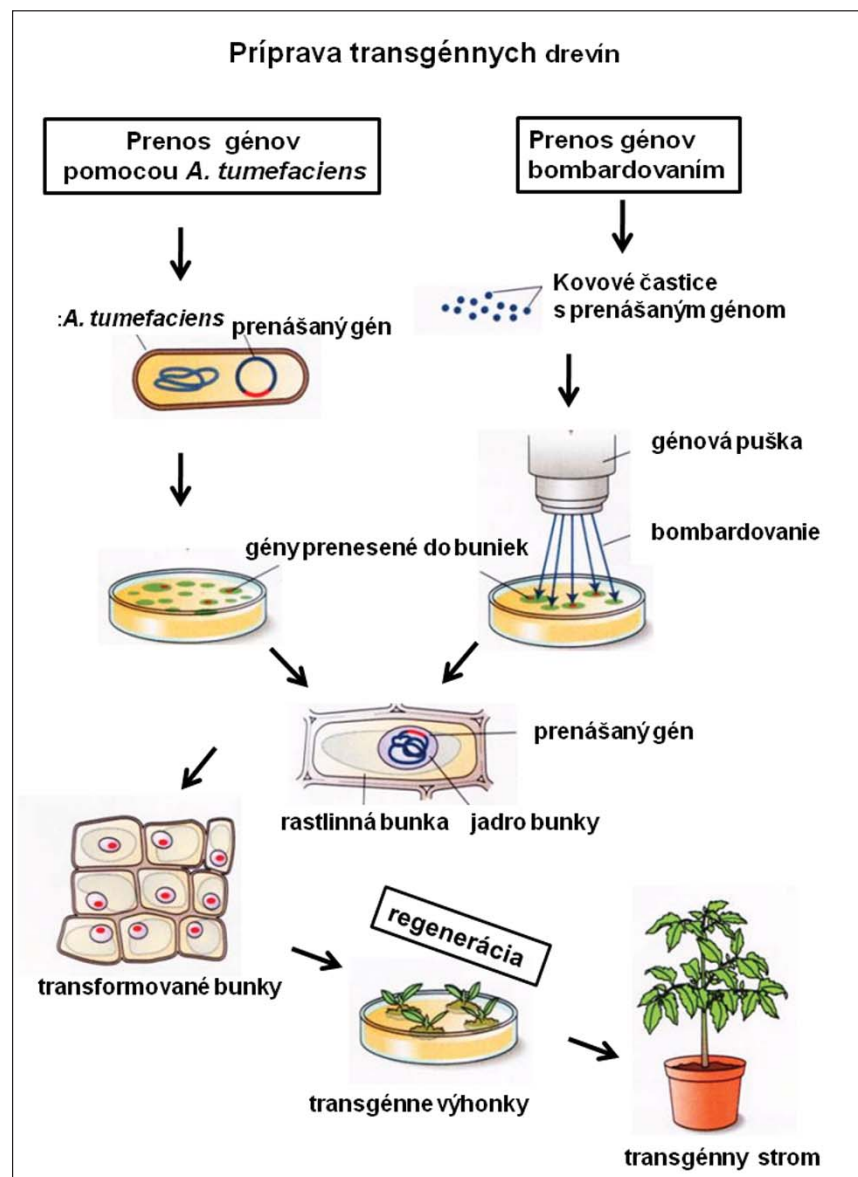
Obr. 2 - *Agrobacterium tumefaciens* zostáva počas infekcie na povrchu poranených buniek.

Prvé záznamy o existencii tejto baktérie siahajú do roku 1897, kedy bola prvýkrát izolovaná. Prelom nastal v roku 1977, keď vedci na základe poznatkov o štruktúre DNK dokázali objasniť mechanizmus, ktorý baktéria využíva pri infikovaní rastlín či drevín. Poznatok, že baktéria je schopná preniesť vlastné gény do rastlinnej bunky a zabudovať ich do rastlinnej DNK, prisúdil tejto baktérii jedinečné miesto v genetic-

kom inžinierstve. Napriek tomu, že baktéria sa v pôde vyskytuje bežne, len u malej časti jedincov sa ochorenie aj prejaví. Je to dané tým, že k infekcii môže dôjsť len u poranených jedincov. Baktéria teda musí rozoznať takéto poranené bunky. K tomu napomáha samotný poranený jedinec tým, že v mieste poranenia produkuje určité chemické látky, ktoré sú signálom pre baktériu, ktorá sa presunie k takýmto bunkám a priľne k nim (tzv. chemotaxia).

V ďalšom kroku dokáže pomocou svojho špeciálneho aparátu preniesť do rastlinnej bunky gény, ktoré sú príčinou tvorby nádorov. Rastlinná bunka sa stane zdrojom živín pre samotné *Agrobacterium*. Takéto nádory za normálnych okolností nie sú pre rastlinu resp. drevinu smrteľné, samozrejme ak nezačnú byť príliš objemné.

Genetické inžinierstvo využíva tento prirodzený mechanizmus na prenos želaných génov do rastliny a to tak, že sa z baktérie odstránia gény, ktoré sú zodpovedné za ochorenie a nahradia sa ich vlastnými génmi, ktorými chceme vylepšiť určité vlastnosti rastlín či drevín. Princíp metódy je založený na tom, že k poraneným bunkám (pletivám) rastliny, ktorú chceme modifikovať sa pridá baktéria obsahujúca želané gény a využije sa prirodzený mechanizmus baktérie na to, aby sa tieto gény dopravili do rastliny. Všetky tieto kroky sa uskutočňujú v sterilných laboratórnych podmienkach (obr. 3).



Obr. 3 - Príprava transgénnych drevín

3.2 Prenos génov bombardovaním

Bombardovanie, ktoré sa nazýva aj **biolistická transformácia** je univerzálna metóda, ktorou na základe fyzikálnych poznatkov dokážeme priamo preniesť želané gény do hostiteľskej DNK (obr. 3). Výhodou je, že na rozdiel od prenosu pomocou *A. tumefaciens*, kde svoju úlohu zohráva aj hostiteľský rad, túto metódu môžeme úspešne aplikovať na všetky druhy rastlín a hlavne drevín. V laboratórnych podmienkach sa na kovové častice, ktoré nazývame mikroprojektily, naviaže DNK (želané gény) a takto pripravené mikroprojektily sa pomocou špeciálneho zariadenia, ktoré nazývame génová puška vystrelia na pletivo (bunky), ktoré chceme transformovať. Mikroprojektily majú priemer okolo 1 µm a sú najčastejšie zo zlata, ale používa sa aj paládium, ródium alebo platina.

4. Gény vstúpia do bunky a čo ďalej...

Genetická modifikácia sa odohráva na úrovni bunky. Úspech závisí nielen od toho, či bunka dokáže prijať cudzie gény, ale samozrejme aj od regeneračnej schopnosti transformovanej bunky, aby sme v poslednom kroku dokázali získať celistvú transgénnu rastlinu či drevinu. Celý tento proces sa uskutočňuje v sterilných laboratórnych podmienkach, ktoré nazývame aj *in vitro*.

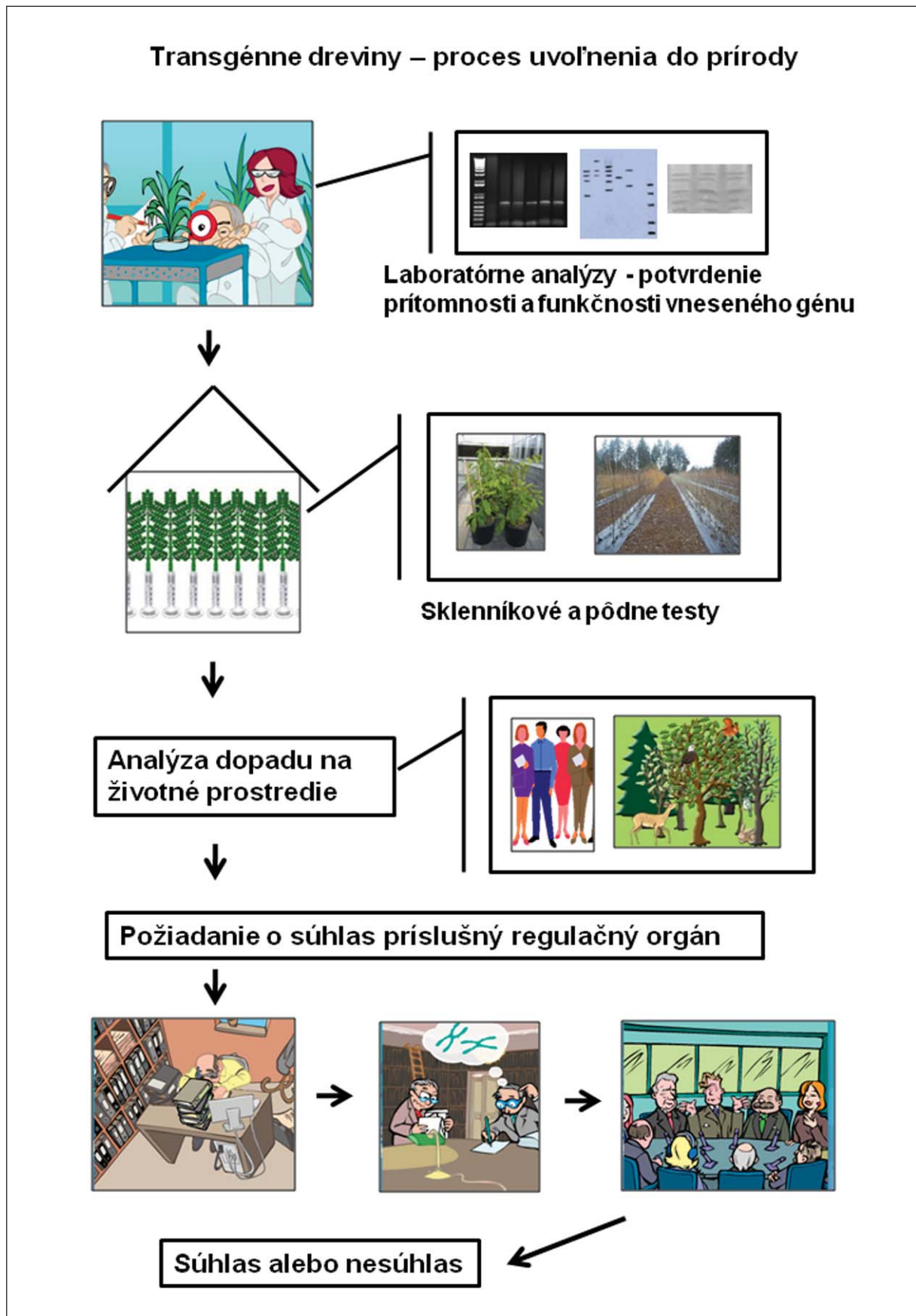
Proces regenerácie je založený na poznatkoch z oblasti pletivových kultúr a mikropropagácie. Regenerácia transformovanej bunky sa môže uskutočniť organogenezou alebo cestou somatickej embryogenézy (viď kapitolu 1). Vo všeobecnosti je známe, že jednotlivé druhy drevín sa navzájom líšia svojou schopnosťou regenerovať v podmienkach *in vitro*, čo môže byť v prípade genetickej transformácie neprekonateľná prekážka, pretože nedokážeme zregenerovať transformovanú bunku a získať tak transgénneho jedinca. V súčasnosti sa ako východiskový materiál na genetickú transformáciu drevín najčastejšie využívajú somatické embryá a embryogénne pletivá.

5. Pravidlá pri uvoľňovaní transgénnych jedincov do životného prostredia

Jedince, ktoré sme v podmienkach *in vitro* získali, považujeme za potenciálne transgénne. Zároveň však musíme priniesť aj dôkaz o tom, že transgénne skutočne sú a podrobiť ich analýzam. Analýzy sú zamerané na to, aby sa dokázalo, či došlo k prenosu želaných génov do genómu dreviny a ako ich prítomnosť ovplyvnila jej vlastnosti. V prípade, že došlo k požadovanému vylepšeniu nejakej konkrétnej vlastností či znaku, môže sa pristúpiť k pôdnym testom.

Pôdne testy sa uskutočňujú za presne kontrolovaných podmienok a simulujú podmienky v prírode. Skôr ako sa môžu takéto transgénne jedince dostať do pôdy, musí sa požiadať o súhlas príslušného regulačného úradu, ktorý posúdi predložené údaje o genetickej modifikácii, posúdi dopad na životné prostredie a možnosti neželaného úniku génov krížením do iných príbuzných druhov. Úspešné pôdne testy sú krokom k tomu, aby sa takéto transgénne jedince mohli využiť aj v komerčnom prostredí (obr. 4)

Všetko, čo súvisí s geneticky modifikovanými organizmami podlieha aj na Slovensku platným právnym predpisom a schvaľovaciemu konaniu. Každý, kto chce nejakým spôsobom pracovať alebo využívať akýkoľvek geneticky modifikovaný organizmus, musí požiadať o súhlas príslušný orgán, ktorými sú Ministerstvo životného prostredia SR a **Ministerstvo pôdohospodárstva SR**.



Obr. 4 - Proces znázorňujúci uvoľňovanie transgénnych drevín do životného prostredia.

6. Transgénne dreviny v praxi

Ako už bolo spomenuté pomocou génového inžinierstva je možné pripraviť genotypy drevín podľa vopred stanovených požiadaviek. Navyše, tam kde vznikajú bariéry pre súčasných šľachtiteľov, génové inžinierstvo na základe pokroku, ktorý nastal v biologických vedách za posledných 100 rokov, dokážu pomocou vhodných nástrojov génového inžinierstva prenášať gény naprieč rastlinnou ako aj živočíšnou ríšou. Výsledkom tohto sofistikovaného prístupu je prenos a zabudovanie jedného alebo niekoľkých génov do jadra rastlinnej bunky, čím jedinec môže získať novú vlastnosť. V maloplošných pokusoch sa v súčasnosti testuje celý rad geneticky upravených drevín, predtým ako získajú súhlas na komerčné uvedenie do životného prostredia.

Pilotné poľné pokusy s geneticky modifikovaným topoľom, tolerantným ku herbicídom, boli založené v Belgicku v roku 1988. Odvtedy bolo uskutočnených vo svete viac ako 200 poľných pokusov s geneticky modifikovanými drevinami zahrňujúcimi minimálne 15 lesných druhov. Najviac takýchto pokusov bolo a je uskutočňovaných v Spojených štátoch amerických. Čína však nečakane prebrala iniciatívu pri komerčnom zavádzaní geneticky modifikovaných drevín do životného prostredia a vysadila viac ako milión geneticky upravených topoľov, do ktorých bol prenesený gén, zodpovedný za zvýšenie odolnosti voči škodlivému hmyzu. Výsadba je súčasťou ambiciózneho plánu zalesniť viac ako 17 miliónov hektárov krajiny do roku 2012 a je podmienená „mäkšími“ pravidlami platiacimi pre uvoľňovanie GMO do životného prostredia. Čínsky počin bol prijatý vo svete rozpačito, keďže v mnohých krajinách sveta s rozsiahlym výskumom v oblasti GMO stále prebieha živá diskusia o pozitívach, či prípadných negatívach tejto technológie. Hoci v USA je tiež veľa odporcov geneticky modifikovaných plodín, od 1998 roku je do životného prostredia uvoľnená geneticky modifikovaná papája rezistentná voči vírusovému ochoreniu – krúžkovitosti papáje. Papája sa začala komerčne pestovať na Havaji okolo roku 1940 a v priebehu desiatich rokov vírus krúžkovitosti papáje spôsobil na porastoch značné škody. Od konca 80. rokov minulého storočia sa preto pozornosť upriamila na získanie geneticky upravených línií rezistentných voči danému ochoreniu.

V USA dostala v roku 2007 povolenie na uvedenie do životného prostredia za účelom komerčného využitia aj geneticky upravená slivka, odolná voči vírusovému ochoreniu nazývanému šárka sliviek.

Veľký záujem vo svete vzbudila genetická modifikácia eukalyptu, rýchlo rastúceho tropického stromu, ktorého biomasa sa využíva na produkciu bioenergie a výrobu papiera a buničiny. Tím tchajwanských a amerických vedcov pomocou genetického inžinierstva pripravil genotyp eukalyptu, ktorý je schopný asimilovať 3 krát viac oxidu uhličitého ako geneticky neupravený genotyp, čo by sa mohlo využiť pri znižovaní skleníkových plynov. Tieto stromy sú zároveň vhodnejšie na produkciu bioetanolu z celulózy, keďže v stromoch sa podarilo zvýšiť obsah celulózy na úkor lignínu. Navyše, zmena pomeru obsahu lignínu a celulózy technologicky zlacňuje celý proces spracovania dreva.

V máji 2010 získala najväčšia americká firma ArborGen zaoberajúca sa aj výskumom a produkciou geneticky upravených drevín povolenie na výsadbu 260 000 sadeníc geneticky upraveného eukalyptu v južných štátoch USA. Transgénne jedince by mali byť odolné proti chladu a mali by tvoriť redukované množstvo lignínu v drevnej hmote.

Iné projekty sú zamerané napr. na detoxikáciu zamorených pôd prostredníctvom geneticky upravených drevín. Príkladom je geneticky modifikovaný druh amerického topoľa, ktorý je pomocou jedného preneseného génu schopný viazať toxickú ortuť z pôdy vo forme dvojmocných iónov (Hg^{+2}) a premieňať ju na menej toxickú elementárnu

formu. Táto menej toxická forma ortuti sa podľa navrhnutého projektu buď uvoľňuje do atmosféry, alebo sa ukladá vo viazanej forme v kmeni stromu. Podobne boli pripravené transgénne hybridy topoľa, ktoré sú schopné lepšie prežívať na zasolených pôdach. Hospodársky znehodnotené pôdy môžu byť týmto spôsobom postupne rekultivované.

Na začiatku minulého storočia sa na americkom kontinente začalo v porastoch gaššana amerického šíriť hubové ochorenie, ktoré zničilo takmer 4 miliardy zdravých stromov a dramaticky zdecimovalo lesné porasty hlavne na východnom pobreží USA. K nástupu jednej z najväčších devastácií lesných porastov prírodným škodcom vôbec došlo v dôsledku infekcie vyskytujúcej sa na dovezenom dreve z Ázie. Paradoxne ázijské genotypy gaššana sú pomerne odolné voči škodlivej hube a americké genotypy extrémne citlivé. V rámci projektu záchrany gaššana amerického je snaha pripraviť pomocou genetického inžinierstva genotypy s vhodným génom (génmi) odolnosti voči tomuto devastujúcemu hubovému ochoreniu. V rokoch 2006 až 2007 už boli vysadené prvé transgénne jedince gaššana na poľné pokusy.

Z ihličnatých drevín boli nedávno pripravené transgénne genotypy borovice odolné voči škodlivému hmyzu, ktorých zvýšená odolnosť voči škodcom bude v blízkej budúcnosti testovaná aj v poľných podmienkach. V Tabuľke 1 udávame prehľad genetických transformácií drevín uskutočnených do roku 2009.

Tabuľka 1. Prehľad krajín, ktoré do roku 2009 realizovali výskum a poľné pokusy v oblasti genetických modifikácií.

Zdroj: http://www.wrm.org.uy/subjects/GMTrees/Information_sheets.html

Krajina	Objekt genetickej modifikácie	Cieľ genetickej modifikácie
Austrália	Eukalyptus	1. Rýchlejší rast 2. Zlepšenie kvality dreva 3. Sterilita
Belgicko	Topoľ	1. Modifikované zloženie lignínu a celulózy pre uľahčenie výroby bioetanolu 2. Rezistencia k herbicídom
Brazília	Eukalyptus	1. Rýchlejší rast 2. Zníženie obsahu lignínu a jeho modifikácia (pre procesy spracovania celulózy) 3. Zmena obsahu celulózy 4. Zlepšenie kvality dreva 5. Rezistencia ku herbicídom
Kanada	Topoľ	1. Genetická modifikácia vlastného génu
Čile	Borovica Eukalyptus	1. Rezistencia borovice ku <i>Ryacionia buoliana</i> 2. Rezistencia borovice ku <i>Fusarium circinatum</i> 3. Rezistencia eukalyptu k hube <i>Mycosphaerella</i> , ktorá atakuje listy stromu 4. Rýchlejší rast stromov eukalyptu 5. Vyšší obsah celulózy v drevnej hmote eukalyptu 6. Zvýšená odolnosť genotypov eukalyptu ku chladu
Čína	Borovica Eukalyptus	1. Rezistencia ku škodlivému hmyzu (Bt) 2. Modifikované zloženie dreva 3. Rezistencia eukalyptu k bakteriálnemu škodcovi <i>Ralstonia solanacearum</i>
Dánsko	Jedľa	1. Rezistencia voči škodlivému hmyzu, a zníženie opadavosti ihlíc (produkcia vianočných stromčekov)

Fínsko	Osika (hybridy) Breza	1. Stromy bez kvetov 2. Zvýšenie fixácie CO ₂
Francúzsko	Topoľ (hybridy) Kaučukovník	1. Zníženie obsahu lignínu (výroba etanolu a papiera)
Nemecko	Osika Topoľ (hybridy)	1. Sledovanie genetickej stability nových znakov 2. Dekontaminácia pôdy (ťažké kovy)
India	Eukalyptus	1. Zvýšenie tolerance k zasoleným pôdam
Izrael	Topoľ Eukalyptus Borovica	1. Rýchlejší rast 2. Zvýšený obsah celulózy 3. Zlepšenie kvality vlákien 4. Rezistencia eukalyptu k pôdnej baktérii <i>Ralstonia solanacearum</i>
Japonsko	Eukalyptus Kryptoméria Topoľ *Acacia mangium *Paraserianthes falcataria (*vysadené v Indonézii)	1. Tolerancia eukalyptu ku zasoleným pôdam 2. Tolerancia eukalyptu ku kyslým pôdam 3. Samičia sterilita u kryptomérie japonskej (redukcia peľu ako silného alergénu) 4. Redukcia obsahu lignínu 5. Zvýšená fixácia CO ₂
Nový Zéland	Borovica Smrek Eukalyptus a jeho hybridy	1. Tolerancia k herbicidom 2. Stromy bez kvetov 3. Upravené zloženie lignínu a celulózy 4. Rezistencia ku chladu 5. Rezistencia ku škodlivému hmyzu
Rusko	Osika Breza Borovica	1. Rýchlejší rast 2. Zmena zloženia drevnej hmoty
Švédsko	Topoľ Eukalyptus Smrek	1. Posun kvitnutia 2. Rýchlejší rast 3. Zvýšená dĺžka vlákien 4. Zmena zloženia drevnej hmoty (ľahšia extrakcia lignínu) 5. Zlepšenie hydrolýzy polysacharidov pre následnú produkciu bioetanolu)
Thajwan	Eukalyptus	1. Zvýšená fixácia CO ₂
Thajsko	Kaučukovník	1. Zvýšená produkcia latexu
Veľká Britá- nia	Brest Topoľ	1. Rezistencia k hubovému ochoreniu kôry brestu 2. Redukcia lignínu v drevnej hmote topoľa (produkcia bioetanolu)
USA	Topoľ Osika Eukalyptus Borovica Ambrovník Gaštan Brest Orech Smrek	1. Zmena obsahu lignínu v drevnej hmote 2. Zmeny vedúce k ľahšej konverzii polysacharidov na bioetanol 3. Rýchlejší rast 4. Zmena morfológických znakov (kratšie a silnejšie stromy) 5. Rezistencia ku škodlivému hmyzu (Bt) 6. Rezistencia k hubovým a vírusovým ochoreniam 7. Rezistencia na sucho, chlad a zasolené pôdy 8. Redukovaná tvorba kvetov 9. Sterilita drevín 10. Rezistencia k herbicidom 11. Zvýšená absorpcia CO ₂ 12. Zmena zloženia drevnej hmoty 13. Schopnosť viazať toxíny z pôd

7. Predstavujú transgénne dreviny hrozbu alebo riešenie pre meniacu sa životné prostredie?

Dreviny sa odlišujú od iných rastlinných druhov svojím dlhším životným cyklom. Počas dlhého obdobia, ktoré môže predstavovať desiatky až stovky rokov, sa dreviny musia vyrovnávať s rôznymi životnými podmienkami. Z tohto dôvodu je veľmi dôležité odhadnúť nielen pozitívny, ale aj možný negatívny dopad transgénnych drevín na prírodu.

Významnou motiváciou pre zapojenie genetického inžinierstva do procesu šľachtenia drevín boli nielen ekonomické dôvody, ale aj problémy s meniacim sa životným prostredím. Transgénne dreviny odolné voči herbicídom umožňujú lepšiu kontrolu nad burinami v lesných sadoch. Odolnosť voči škodcom znižuje poškodenie stromov a redukuje množstvo pesticídov, čím sa menej zaťažuje životné prostredie. Genetické inžinierstvo môže taktiež pomôcť pri obnovovaní lesa zasiahnutého škodcami. Genetickou modifikáciou je možné upraviť tiež kvalitu dreva pre potreby drevárskeho priemyslu.

Nemalým problémom pri pestovaní drevín je kvalita pôdy. Riešením môžu byť transgénne jedince, ktoré dokážu rásť aj v chudobných a zasolených pôdach. V neposlednom rade by sa transgénne dreviny, ktoré sú schopné rozkladať v pôde nežiaduce chemikálie, mohli využiť v procese ozdravovania pôdy (bioremediácia). Napriek týmto nesporným pozitívam, ktoré genetická modifikácia drevín prináša, je to pomerne nová technológia, ktorej treba venovať náležitú pozornosť a správne vyhodnotiť jej potenciálny environmentálny, kultúrny a socio-ekonomický účinok. Pri komplexnom hodnotení sa musia brať do úvahy aj také faktory ako napr. nové vlastnosti získané vnesením cielených génov, evolučná história modifikovaných drevín alebo veľkosť výsadby transgénnych drevín a ich umiestnenie v prírode. Tým, že pomocou genetického inžinierstva dokážeme prenášať gény aj z iných, nie príbuzných druhov, existuje určitá obava, že po vysadení transgénnych drevín by mohlo dôjsť k tzv. úniku génov, teda že takéto gény by sa mohli pomocou peľu alebo semien voľne šíriť do príbuzných a vzájomne krížiteľných druhov. To by mohlo viesť k strate genetickej diverzity. Navyše stromy majú dlhý životný cyklus, čo vyžaduje venovať veľkú pozornosť vyhodnoteniu rizík dopadu na životné prostredie. Prekročenie bariér vzájomnej krížiteľnosti vyvolalo u mnohých značné obavy, čo viedlo k rozvinutiu širokej diskusie medzi odbornou ale aj laickou verejnosťou. Jednou z možností ako zabrániť takémuto úniku génov, je pomocou genetického inžinierstva pripraviť transgénne dreviny s potlačenou schopnosťou sa rozmnožovať, tzv. sterilné transgénne dreviny.

Napriek tomu, že mnohokrát dochádza k emotívnemu odmietaniu transgénnych rastlín alebo drevín, je dôležité povedať, že genetickou modifikáciou môžeme nielen vylepšiť určité vlastnosti, ale vďaka nej dokážeme lepšie pochopiť funkciu génov a samotné procesy, ktoré v rastlinách a drevinách prebiehajú. Tieto poznatky je možné využiť aj pri klasickom šľachtení, ktoré sa tým dostáva na vyššiu úroveň.

8. Závery a perspektívy

Niektoré národy majú vo svojich symboloch strom. Napríklad na zástave Kanady si našiel svoje miesto javor, alebo céder zdobí vlajku Libanonu. Úcta k stromom pretrváva v národoch po celé generácie a tak symbolom Germánov sa stal dub, Japoncov – sakura či Slovanov – lipa. Slováci sú právom hrdí na Lipu Kráľa Mateja, ktorá rastie v parku Bojnického zámku a má viac ako 700 rokov. Patrí ku vzácnym pamiatkovým i botanicky dôležitým stromom a od roku 1962 je štátom chránená. Podobne bola aj

v USA spojená krása a monumentálnosť vzácných stromov sekvojí a úcta k národným činiteľom ako sú napr. Lincoln, Washington či Franklin. Spojenie vzácných solitérov a dejinných hrdinov je viac menej symbolické, avšak dreviny ako súčasť lesných porastov sú nielen „plúcami“ planéty, ale aj zdrojom dreva ako paliva, stavebnej suroviny, či suroviny na výrobu nástrojov, ozdobných predmetov, hlavne však papiera a celulózy. Vysoká spotreba dreva vedie v niektorých krajinách až k úplnému výrubu prirodzených lesných porastov. Ďalším nepriateľom súčasného lesa sú škodcovia a rýchlo sa šíriace vírusové, bakteriálne a predovšetkým hubové ochorenia, ktoré sa v súčinnosti s viacerými faktormi meniaceho životného prostredia zúčastňujú na poškodzovaní značného objemu drevnej hmoty.

Jedným zo spôsobov riešenia úbytku prirodzených lesných porastov je čoraz častejšie zakladanie lesných plantáží. Keďže dreviny majú obrovský genetický potenciál, možno ho využiť pri tvorbe nových genotypov produkujúcich viac drevnej suroviny s minimálnym negatívnym dopadom na životné prostredie. Biotechnológie môžu zohrávať kľúčovú úlohu pri tvorbe genotypov s vysokou úžitkovou hodnotou a zvýšenou odolnosťou voči škodcom a chorobám.

Priekopníci lesných biotechnológií tvrdia, že pomocou vhodných molekulárnych nástrojov je možné rýchlo a radikálne zmeniť spôsob, akým les rastie. Už nie je len utópiou pripraviť „strom na mieru“ - odolný voči škodcom a burinám či prípadne vrtochom počasia. Genetickou manipuláciou je možné zmeniť i zloženie dreva, predovšetkým pomer medzi lignínom a celulózou, čo je v súčasnosti naliehavou požiadavkou praxe. Lignín – bunkové lepidlo, drží drevné vlákna dohromady, avšak spôsobuje značné ťažkosti v technologických postupoch spracovania dreva. Genetické inžinierstvo však môže v prípade geneticky modifikovaných drevín ambiciózne vstupovať aj do riešenia problémov životného prostredia napríklad pri detoxikácii pôdy, zachytávaní skleníkových plynov z atmosféry, či ako obnoviteľný zdroj zelenej energie. Navyše neoceniteľnú úlohu môže génové inžinierstvo zohrať aj pri naliehavej záchrane najviac ohrozených druhov drevín. Podstatná časť výskumu sa v súčasnosti vo svete uskutočňuje na univerzitných pracoviskách, výskumných ústavoch, ale aj v limitovanom počte súkromných spoločností, pričom pri úspešnej realizácii prípravy transgénnych drevín podľa projektu génového inžinierstva je potrebné prekonať celý rad väčších či menších prekážok.

Genetické inžinierstvo drevín je pomerne nová disciplína a preto treba venovať veľkú pozornosť aj tomu, ako transgénne dreviny ovplyvnia ekologickú rovnováhu v prírode. Cieľom genetického inžinierstva nie je postupne vytlačiť klasické šľachtenie na okraj, prípadne ho nahradiť, ale skôr napomôcť šľachtiteľskému procesu, ktorý začína zaostávať v boji so súčasnými problémami lesov, aby sme dokázali zabrániť odumieraniu lesov a pomohli ich zachrániť.

Výkladový slovník

Adventívna regenerácia - tvorba a vývin štruktúr (meristémov, púčikov, výhonkov, koreňov prípadne somatických embryí), ktoré v pôvodnom pletive neboli. Štruktúry a orgány diferencované *de novo* sú považované za tzv. prídavné alebo adventívne.

Adventívne výhonky - výhonky vznikajúce na koreni, liste alebo na stonke, či hypokotyle mimo listovej pazuchy (v zásade bez vzťahu k vrcholovému a pazušnému meristému).

Agrobacterium tumefaciens - gramnegatívna baktéria, ktorá sa bežne vyskytuje v pôde a v prítomnosti poranených rastlín sa dokáže presúvať a pritiahnuť sa k poraneným bunkám pletív. Baktéria je schopná preniesť vlastné gény do rastlinnej bunky a zabudovať ich do rastlinnej DNK. Na tomto princípe je založený cielený prenos génov do rastlinných genómov.

Alela - jedna z viacerých alternatívnych foriem génu. Alely sa líšia poradím nukleotidov, ktoré ovplyvňujú aminokyselinové zloženie bielkovín.

Apikálny púčik - púčik/výhonok vyrastajúci z vrcholovej časti stonky alebo listu.

Axilárny púčik/výhonok - púčik/výhonok vyrastajúci v pazuche listu alebo listeňa.

Biodiverzita - biologická rozmanitosť všetkých foriem života, jeho hladín a kombinácií. Slovo *biodiverzita* je často používané k popisu všetkých druhov žijúcich v určitej oblasti. Ak vezmeme do úvahy túto oblasť vo svojom najväčšom rozsahu - celý svet - teda biodiverzitu možno zhrnúť ako „život na Zemi.“ Avšak, vedci používajú širšiu definíciu biologickej diverzity, ktorá má zahŕňať nielen živé organizmy a ich zložité interakcie, ale aj interakcie s abiotickými (neživými) aspektami ich životného prostredia. Z tohto hľadiska môže byť *biodiverzita* definovaná ako rozmanitosť života na Zemi na všetkých svojich úrovniach, od genetickej variability v rámci druhov k ekosystémom (genetická diverzita, druhová diverzita, ekologická diverzita) a ekologické a evolučné procesy, ktoré ju udržujú. Zachovanie vysokej hladiny biodiverzity je dôležité pre stabilitu ekosystémov.

Biochemické markery - kvalitatívne vlastnosti, ktoré sa prenášajú do ďalších generácií (dedičné markery) a na ich detekciu sa používajú biochemické metódy.

Bombardovanie (biolistická transformácia) - univerzálna metóda, ktorou na základe fyzikálnych poznatkov dokážeme priamo preniesť želané gény do rastlinnej DNK. Tie sa naviažu na kovové častice, ktoré nazývame mikroprojektily, ktoré sa pomocou špeciálneho zariadenia (génová puška) vystrelia na pletivo (bunky), ktoré chceme transformovať.

Caulogenesis - typ organogenézy, pri ktorej sa indukuje vývin adventívnych (prídavných) výhonkov z kalusu.

DNK (deoxyribonukleová kyselina) - chemická molekula, ktorá obsahuje informáciu vytvárajúcu celý organizmus. Je tvorená stavebnými jednotkami, ktoré sa nazývajú nukleotidy. Štyri druhy nukleotidov tvoriacich DNK organizmu sú adenín (A), guanín (G), cytozín (C) a tymín (T). DNK molekula je tvorená dvomi špirálovite stočenými

reťazcami nukleotidov. DNK sa nachádza v jadre, chloroplastoch a mitochondriách a každá bunka organizmu obsahuje rovnaké molekuly DNK.

Epikutikulárny vosk - vosková vrstva, ktorá je v pokožkových bunkách lokalizovaná na povrchu vlastnej pokožky (kutikuly).

Ex vitro - je odborný termín používaný v biológii a medicíne najčastejšie pre pokusy uskutočňované v laboratóriu, avšak mimo sklo či plast (mimo laboratórnu nádobu). Pokusy uskutočňované v nádobách sa nazývajú *in vitro*, teda „v skle“. Výraz pochádza z latinčiny a znamená doslova „mimo sklo“.

Explantát - odobratý orgán, skupina orgánov, časť pletiva alebo bunka pestované mimo organizmu. Časti rastliny vytrhnuté z korelačných vzťahov rastliny (spóry, zrelé a nezrelé zárodky, semená, orgány, pletivá, bunky) a pestované v podmienkach *in vitro* za sterilných špecifických podmienok na zvláštnych živných pôdach.

Fenotyp - súhrn všetkých (dedičných) vonkajších morfológických a fyziologických znakov a vlastností jedinca; realizácia genotypu.

Gén/gény - úseky DNK, ktoré zodpovedajú za jednotlivé špecifické črty alebo vlastnosti živého organizmu. Cielené (žiadané) gény sú gény, ktoré po prenose pomocou genetickej transformácie do rastlinnej DNK vylepšia vlastnosti danej rastliny, či drevinu, do ktorej sú za týmto účelom metódami genetického inžinierstva prenášané.

Genetická výbava (genóm) - súbor všetkých génov jedinca.

Genetická modifikácia (transformácia, transgenóza) - samotný proces prenosu určitej genetickej informácie do cudzej (rastlinnej) DNK.

Genetická štruktúra - nenáhodnú distribúciu alel alebo genotypov v priestore alebo čase, bez ohľadu na organizáciu genómu a meiotické procesy, ktoré tiež môžu ovplyvňovať frekvencie alel a genotypov. Táto priestorová a časová organizácia genetickej variability v rámci populácií rastlín vzniká spolupôsobením mutácií, migrácie, selekcie a genetického driftu.

Genetické inžinierstvo - umožňuje manipulovať s jednotlivými génmi alebo ich úsekmi a prenášať ich cielene do iných organizmov za účelom vylepšenia ich určitých vlastností tak, aby to bolo pre človeka užitočné.

Genetické markery - známe sekvencie DNK, ktoré je možné ľahko identifikovať. Ide o istý druh variability, ktorá môže byť spôsobená mutáciou, alebo zmenou pôvodnej sekvencie (poradia nukleotidov), ktorá sa pozoruje na vopred určenom úseku.

Geneticky modifikovaný (transgénny) organizmus - každý organizmus, ktorého genetická výbava bola vylepšená iným spôsobom ako klasickým krížením.

Genetický drift - usmernené alebo neusmernené zmeny vo frekvencii dedičných vlôh populácie; typ selekcie založený na náhode prenosu znaku pri produkcii potomstva a nezávisí od vlastností alebo prejavu daného znaku v danom prostredí.

Genotyp - súbor všetkých dedičných faktorov určitého organizmu; jedinec charakterizovaný dedičnými vlastnosťami. Termín genotyp sa používa pre celkovú

genetickú informáciu, ale genotypom sa nazýva aj časť genetickej informácie, ktorá sa týka sledovaného znaku.

Heterozygot - jedinec, ktorý vznikol splynutím dvoch gamét obsahujúcich pre daný znak nerovnaké vlohy a má teda rozdielne alely sledovaného génu (jednu alelu typu A a jednu alelu typu B - genotyp AB). Alely sa môžu odlišovať jedným nukleotidom alebo viacerými nukleotidmi.

Homozygot - jedinec, ktorý vznikol spojením dvoch gamét s rovnakou skupinou dedičných vlôh a má rovnaké alely sledovaného génu (napr. dve alely typu A – genotyp AA).

Hybridizácia - spôsob získavania nových rastlinných druhov. Z hľadiska hybridizácie sú rozlišované rôzne typy kríženia: vnútrodruhová hybridizácia, ktorá prebieha medzi jedincami rovnakého druhu, alebo medzidruhová hybridizácia, kde dochádza ku kríženiu rôznych druhov rovnakého rodu.

In vitro (latinsky „v skle“ alebo „v skúmavke“) - označuje v biológii procesy alebo pozorovanie systému mimo prostredia, v ktorom sa prirodzene nachádza, najmä v roztokoch a na živných pôdach.

In vitro techniky - metódy kultivácie rastlinných buniek, pletív a orgánov, izolovaných od materského organizmu a kultivovaných v umelých podmienkach. Princíp techník spočíva v izolácii určitej, teoreticky ľubovoľnej časti rastlinného organizmu (explantát) a v jej kultivácii na umelých živných médiách v simulovaných podmienkach v kultivačných miestnostiach.

In vivo (latinsky „zaživa“) - označuje v biológii procesy alebo pozorovanie správania sa systému v prostredí, v ktorom sa prirodzene nachádza. Pri pokusoch ide o **holistický** prístup (celostný) - predpokladá sa skúmanie živej hmoty ako celku, kedy sa bádateľ musí vysporiadať s faktom, že organizmus existuje v interakcii so svojim okolím a ako celok.

Izoenzýmy - bielkoviny, ktoré patrili v posledných desaťročiach k najčastejšie využívaným genetickým markerom v lesníckom výskume pre získanie informácií o genetickej štruktúre populácií lesných drevín. Majú rovnakú enzymatickú funkciu v organizme (katalyzujú rovnaké reakcie), ale líšia sa poradím aminokyselín. Výsledkom rozdielneho poradia aminokyselín môže byť zmena ich elektrického náboja, veľkosti a priestorového usporiadania molekuly. Tieto zmeny sa prejavujú po rozdelení bielkovín v špeciálnych škrobových alebo polyakrylamidových géloch a ich vizualizácii. Rozdelené bielkoviny pozorujeme ako farebné pružky nachádzajúce sa v géli v rôznej vzdialenosti od miesta, kde sa vzorka vložila do gélu.

Kalus (zával) - aktívne sa deliaca masa tenkostenných buniek s rôznym stupňom diferenciácie a schopnosťou spätnej tvorby organizovaných štruktúr, vytvorená buď po ovplyvnení rastovými regulátormi (auxínmi) alebo po poranení rastlín. V pletivových kultúrach je jeho tvorba indukovaná na rezných plochách pletív. Rastie neorganizovane bez zreteľnej polarity a usporiadania existujúceho vo vyvinutej rastline, ale dochádza k diferenciácii buniek. Kalus môžeme získať kultiváciou akéhokoľvek časti rastlinného organizmu ako napr. listu, stonky, stopky, koreňa, ale aj ich segmentov.

Klonálne množenie - nepohlavné množenie, vegetatívna reprodukcia, vegetatívne množenie, vegetatívne klonovanie je forma asexuálnej reprodukcie rastlín pomocou vegetatívnych (somatických) orgánov, pletív alebo buniek izolovaných z týchto orgánov. Prirodzené metódy vegetatívnej propagácie zahŕňajú napr. množenie zásobnými orgánmi alebo poplazmi (hlúzy zemiakov, šľahúne jahôd), rezkovanie, ponáranie, očkovanie, štepenie. Klonálne množenie môže byť dosiahnuté aj v podmienkach pletivových kultúr (*in vitro*) - použitím malých kúskov pletív alebo izolovaných buniek (explantátov) na umelých živných médiách s pridaním rastlinných rastových regulátorov (fytormónov). Vzniknuté rastliny definujeme ako „klon“ a sú geneticky identické s materským organizmom.

Koeficient množenia - počet získaných rastlín *in vitro* na primárny explantát.

Kutikula - vrstva kutínu pokrývajúca vonkajšie strany pokožkových buniek rastlín a zabraňujúca strate vody; ochranná sklerotínová vrstva na povrchu tela niektorých bezstavovcov, u hmyzu prestúpená chitínom alebo inkrustovaná minerálnymi látkami.

Kryoprezervácia (kryokonzervácia) - uskladňovanie, konzervácia napr. rastlinných explantátov v tekutom dusíku pri teplote - 196 °C. Je to moderná metóda udržiavania genetických zdrojov rastlín, ktorá vyžaduje špecifické podmienky.

Lokus - presná oblasť molekuly DNK, na ktorom sa nachádza gén, alebo skupina génov.

Meristém - nediferencované pletivo so schopnosťou aktívne sa deliť a diferencovať sa na špecializované rastlinné pletivá, také ako pletivá výhonkov či koreňov. Podľa uloženia delivých pletív rozlišujeme vrcholový (apikálny) meristém - nachádza sa na rastových vrcholoch rastlín (koreň, stonka); vmedzerený (interkalárny) meristém - je uložený medzi trvácimi pletivami napr. na bázach internódií (medzi uzlami) u tráv; postranný (laterálny) meristém - vyskytuje sa paralelne s osou orgánou, v ktorých sa nachádza (kambium); okrajový (marginálny) meristém - nachádza sa na okrajoch vyvíjajúcich sa listov.

Meristematické centrá - skupiny meristematických buniek, ktoré vznikajú v explantátoch kultivovaných *in vitro* dediferenciáciou špecializovaných buniek vplyvom rastových regulátorov (stratou ich špecializovanej funkcie a nadobudnutím schopnosti aktívne sa deliť). Ich delením a následnou diferenciáciou vznikajú nové pletivá a orgány.

Mikrorozmnožovanie (mikropropagácia) - alternatívna biotechnologická metóda vegetatívneho rozmnožovania rastlín v podmienkach *in vitro* (tzv. klonovanie *in vitro*), s cieľom produkcie veľkého počtu identických rastlín. Pri tomto spôsobe mikrorozmnožovania sa kultúry zakladajú z malých, často miniatúrnych kúskov pletív, z čoho je odvodený názov mikrorozmnožovanie. Jeho aplikácia je v rýchlom a masovom množení nových cenných genotypov, v množení vegetatívne rozmnožovaných rastlín alebo rastlín, ktoré neprodukujú semená.

Mikrosatelity - opakovania jednoduchých sekvencií (SSR, z angl. Simple Sequences Repeat) sú krátke sekvencie pozostávajúce zvyčajne z 2-6 nukleotidov, ktoré sa v genóme na istom úseku tandemovo opakujú. Počet opakovaných sekvencií medzi jedincami sa môže líšiť a variabilita v počte krátkych opakovaných sekvencií sa využíva ako DNK marker.

Morfogenéza - vytváranie organizovaných štruktúr rastliny.

Morfologické markery - genetické markery morfolologickej povahy, zvyčajne mutanty, ktoré sa spontánne vyskytujú v populácii. V prírode sa vyskytujú len vzácne, a preto je ich využitie značne obmedzené. Ako príklad možno uviesť albinizmus semenáčikov, alebo zmeny vo veľkosti a tvare semenáčikov.

Multiplikácia - efektívne množenie rastlín opakovanou kultiváciou *in vitro*. Prolifерácia a produkcia mnohopočetných výhonkov, ktoré sú neskôr separované a prenášané na nové kultivačné médium, na ktorom sa tvoria ďalšie výhonky. Materiál môže byť subkultivovaný (opakovane prenášaný a kultivovaný) niekoľkokrát, aby sa maximalizovalo množstvo produkovaných výhonkov. Vytvorené výhonky sa separujú a zakoreňujú na špeciálnych kultivačných médiách, čím vzniká kompletná rastlinka.

Mutácia - zmena genotypu jedinca. Môže prebehnúť spontánne, náhodne, t.j. bez vonkajšej príčiny, alebo pod vplyvom pôsobenia prostredia a vtedy ju označujeme ako mutáciu indukovanú.

Nodálne segmenty - segmenty, časti stonky nesúce jeden alebo viac púčikov (jedno-nodálne, viac-nodálne segmenty).

Organogenéza - vývoj a diferenciácia orgánov. V kultúre *in vitro* je to regenerácia rastlinných orgánov z kalusu alebo na explantátoch,

Populácia - skupina jedincov toho istého druhu obývajúcú presne definovaný areál, ktorí sa môžu v rovnakom čase medzi sebou náhodne krížiť.

Prolifерácia - novovytvorenie (bujnenie) buniek v organizme.

Protoplasty - rastlinné bunky bez bunkovej steny, ktoré je možné získať z rozličných pletív a orgánov ako napr. z listov, stoniek, vegetačných vrcholov, koreňov, najčastejšie sa však využívajú bunky mezofylu listov.

Rastové regulátory (rastové látky, fytohormóny) - chemické zlúčeniny, ktoré v značnej miere ovplyvňujú rast a vývin rastlinných explantátov a určujú smer regenerácie. Syntetizujú sa v určitej časti rastlinného organizmu a pomocou vodivých dráh (cievných zväzkov) sú transportované na miesto ich účinku.

Rastový vrchol - primárnou oblasťou výhonku, ktorá podmieňuje vznik celej rastliny.

Rhizogenesis - typ organogenézy, pri ktorej sa indukuje vývin adventívnych (prídavných) koreňov.

***Rubus fruticosus* L.** - ostružina černicová, ostružina krovitá, černica je ker z čeľade ružovité (*Rosaceae*). Tento druh rastie hojne v lesoch, je veľmi premenlivý a vytvára mnohé prechodné formy a krížence. Listy a plody sa používajú od mladšej doby kamennej proti krvácaniu, hnačkám a cukrovke. Drobné ovocie je populárne pre použitie v múčnikoch, džemoch, želé (bez kôstok) a vyrába sa niekedy z plodov aj víno. Černice sú pozoruhodné svojou vysokou nutričnou hodnotou (vlákniny, vitamínu C, vitamínu C, kyseliny listovej - vitamín B a základných minerálov, mangán). Černice

majú aj pomerne vysokú hodnotu ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity* - kapacita absorpcie kyslíkových radikálov).

Rubus spp. - ostružina predstavuje veľmi komplexný rod kvitnúcich rastlín patriaci do čeľade *Rosaceae* – ružovité. Ostružina patrí medzi cirkumpolárne druhy a je rozšírená všeobecne v subarktickej a miernej zóne severnej pologule. V južnejších územiach je jej rozšírenie obmedzené viac-menej na podhorské a horské oblasti. Celý rod je veľmi premenlivý a udáva sa pri ňom 300 až 800 druhov. Z týchto botanických druhov však len niektoré majú význam pre zber plodov a pre kultúrne pestovanie. Patria sem naše divorastúce a kultúrne pestované maliny, a to ostružina malinová *Rubus idaeus* L. ssp. *vulgatus* a černice (súborne označované ako ostružina černicová - *Rubus fruticosus* L.).

Somaklonálna variabilita - pri mikropopagácii rastlín je žiadúce zachovanie genotypu identického s pôvodným materským genotypom. Problémom pri *in vitro* produkcii rastlinného materiálu môže byť široký rozsah kvantitatívnej a kvalitatívnej variability medzi regenerovanými štruktúrami (orgánmi, somatickými embryami alebo rastlinami), ktorá vzniká počas kultivácie a regenerácie rastlinných pletív. Larkin a Scowcroft (1981) nazvali tento fenomén somaklonálnou variabilitou. Je definovaná ako genetická variabilita somatických buniek indukovaná pri rastlinách regenerovaných *in vitro*. Všetky tieto fenotypické zmeny môžu byť výsledkom modifikácie samotnej genetickej informácie bunky na úrovni zmien DNK, alebo môžu byť spôsobené zmenami v expresii génov, kedy hovoríme o **epigenetickej variabilite**, ktorá je zapríčinená mechanizmom iným, ako je zmena samotnej DNK.

Somatická embryogenéza - proces, pri ktorom somatické (telové) bunky rôznych pletív (zvlášť klíčnych listov zreých alebo nezreých zygotových embryí), ktoré za určitých špecifických podmienok kultivácie sú schopné diferenciácie a masovej tvorby bipolárnych štruktúr (so stonkovým – vegetačným vrcholom a radikulou – koreňovým pólom), tzv. **somatických embryí**, nazývaných aj vegetatívne embryá alebo embryoidy.

Vaccinium corymbosum L. - čučoriedka chocholíkatá, čučoriedka kanadská, introdukovaná ovocná drevina vhodná pre kultiváciu v podmienkach Slovenska, so širokým využitím v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Plody čučoriedok sú veľmi chutné, modrasté, veľmi bohaté na antioxidanty a ďalšie živiny, vhodné na priamu konzumáciu a na spracovanie. V porovnaní s plodmi čučoriedky obyčajnej sú plody čučoriedky chocholíkatej väčšie, v čerstvom stave nefarbia, obsahujú dvakrát viac cukrov, niečo menej minerálnych látok a vitamínov.

Vaccinium spp. - rod krov alebo zakrpatených krov v rastlinnej čeľadi *Ericaceae*. Plody viacerých druhov sú jedlé a niektoré sú komerčne významné, najmä brusnice a čučoriedky. Sú zvyčajne viazané na kyslú pôdu. Rod zahŕňa okolo 450 druhov, ktoré boli väčšinou nájdené v chladných oblastiach severnej pologuli, avšak patria sem aj tropické druhy z oblastí, kde sú veľmi rozšírené, a to Madagaskar a Hawai. Plody sú nepravé bobule, sú zvyčajne jasne sfarbené, často červené alebo modrasté s purpurovou šťavou a vysokou nutričnou hodnotou. Z mnohých zástupcov tohto rodu sú na Slovensku v prirodzených porastoch zastúpené tieto druhy: čučoriedka obyčajná (*Vaccinium myrtillus* L.), čučoriedka barinná (*Vaccinium uliginosum* L.), brusnica pravá (*Vaccinium vitis - idaea* L.) a kľukva močiarna (*Vaccinium oxycoccus* L.).

***Vaccinium vitis-idaea* L.** - brusnica pravá, rastie najmä na silne humózných a kyslých pôdach, na vyvrelinách, zriedkavejšie na vápencoch a dolomitoch od nížiny do alpínskeho stupňa. Najpočetnejšie sa vyskytuje v smrečinách a v porastoch kosodreviny, na holiach a lúkach subalpínskeho a alpínskeho stupňa. Na Slovensku je najrozšírenejšia v oblasti západokarpatskej flóry, najmä v Tatrách, Nízkych Tatrách, Fatre. Menej v ostatných okresoch karpatskej oblasti. V panónskej oblasti rastie na Záhorskej nížine a vzáčne v Slovenskom krase. Plody brusnice pravej sú obľúbené pre ich špecifickú chuť. Z minerálnych látok je v plodoch najviac zastúpený draslík, menej vápnik, horčík a fosfor. Obsahujú cukry, provitamín A, vitamín C, farbivá (flavonoidy, antokyány), triesloviny, organické kyseliny a glykozidy. Pôsobia dezinfekčne a protizápalovo, hlavne na močové ústrojenstvo. Používajú sa ako podporný prostriedok pri liečbe cukrovky a reumatizmu.

