



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

**Mikropropagace jasanu ztepilého (Fraxinus excelsior L.)**

Šedivá, Jana; Havrdová, Ludmila; Maršík, Petr  
2017

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-451234>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 19.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://nusl.cz) .

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV SILVA TAROUČY PRO KRAJINU A  
OKRASNÉ ZAHRADNICTVÍ, v. v. i.**

Průhonice



**MIKROPROPAGACE JASANU ZTEPILÉHO  
(*FRAXINUS EXCELSIOR* L.)**

Certifikovaná metodika č. 1/2017–057

Ing. Jana Šedivá, Ph.D.  
Ing. Ludmila Havrdová, Ph.D.  
Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

Průhonice 2017



**Autoři:**

**Ing. Jana Šedivá, Ph.D.**, Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. (VÚKOZ, v.v.i.), Průhonice, sediva@vukoz.cz

**Ing. Ludmila Havrdová, Ph.D.**, Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. (VÚKOZ, v.v.i.), Průhonice, havrdova@vukoz.cz

**Mgr. Petr Maršík, Ph.D.**, Ústav experimentální botaniky AV ČR (ÚEB ČR), Praha-Lysolaje, marsik@ueb.cas.cz

**Oponenti:**

Ing. Michaela Budňáková, Ministerstvo zemědělství České republiky, Těšnov 65/17,  
11 000 Praha

Ing. Marie Greplová, Ph.D., Laboratoř experimentálního šlechtění Výzkumný ústav  
bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o., Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod

**Vydal:**

Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i.  
Květnové nám. 391  
252 43 Průhonice

**ISBN:** 978-80-87674-24-6



## MIKROPROPAGACE JASANU ZTEPILÉHO (*FRAXINUS EXCELSIOR* L.)



*In vitro* kultury jasanu ztepilého (Foto: J. Šedivá)



# OBSAH

---

<b>1.</b>	<b>CÍL METODIKY.....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>VLASTNÍ POPIS METODIKY.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.</b>	<b>Metodický postup mikropropagace.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>Primární kultury.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Multiplikace <i>in vitro</i> kultur.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.3.</b>	<b>Zakořeňování a aklimatizace rostlin.....</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....</b>	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY.....</b>	<b>17</b>
<b>5.</b>	<b>EKONOMICKÉ ASPEKTY.....</b>	<b>17</b>
<b>6.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY.</b>	<b>17</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORŮ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....</b>	<b>19</b>
<b>8.</b>	<b>DEDIKACE.....</b>	<b>20</b>



## 1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout optimalizovaný postup mikropropagace jasanu ztepilého, který může podpořit produkci jeho elitních genotypů s vyšším stupněm tolerance vůči invaznímu houbovému patogenu *Hymenoscyphus fraxineus* způsobujícím našim domácím druhům jasanu (*Fraxinus excelsior* a *F. angustifolia*) tzv. nekrózu jasanů (v Evropě známá jako „ash dieback“). Metodika zahrnuje dva ucelené *in vitro* množitelské postupy, které vychází buď z juvenilního rostlinného materiálu (ze semen) nebo z dospělých stromů s použitím vrcholových pupenů.

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1. ÚVOD

Jasan ztepilý (*Fraxinus excelsior* L.) je dřevina, která díky svým ekologickým charakteristikám, vynikajícím vlastnostem dřeva a vysoké ekonomické hodnotě patří mezi cenné a významné listnaté dřeviny Evropy, včetně České republiky. Vyznačuje se značnou ekologickou valencí, díky které se uplatňuje v lesním hospodářství i v porostech mimo les. Vedle ekonomických parametrů tak lze vysoce hodnotit funkce jasanu ekosystémové, environmentální, ochranné vodohospodářské krajinné, rekreační, estetické a další (ČERNÝ et al. 2016). V lesním hospodářství je jasan cennou dřevinou především v údolních jasanovo-olšových luzích (biotop L2.2), v tvrdých luzích nížinných řek (L2.3) a v suťových lesích (L4, CHYTRÝ et al. 2010). V současné době se podílí na skladbě lesa 1,4 % a je spolu s javorem osmou nejčetnější lesní dřevinou (RIEDL et al. 2014). Mimo les, se uplatňuje především v břehových porostech, kde díky svým stabilizačním schopnostem a toleranci vysoké hladiny podzemní vody je dřevinou takřka nezastupitelnou. Podobně pak ve volné krajině (větrolamech, stromořadích, remízech a další roztroušené zeleni) kde díky schopnosti snášet environmentální stres je jedním z klíčových taxonů stromovitých dřevin (ČERNÝ et al. 2016). V sadovnictví bývá často vysazován jako solitér či alejový strom (SLAVÍK 1997). Má velmi kvalitní kruhovité pórovité dřevo, které patří mezi nejhledanější materiály k výrobě nábytku, dých, sportovního náradí, parket a hudebních nástrojů (URADNÍČEK et al. 2009).

Jasan ztepilý byl dlouhou dobu z hlediska zdravotního stavu a výskytu možných patogenů v ČR i Evropě shledáván jako relativně bezproblémová dřevina. Poté, co bylo od poloviny 90. let 20. století v severovýchodní Evropě pozorováno intenzivní chřadnutí jasanů (KOWALSKI et HOLDENRIEDER 2008) se tato situace zásadně změnila. Jako příčina nebezpečného hromadného odumírání jasanů, byl identifikován mikroskopický houbový organismus *Hymenoscyphus fraxineus* (anamorfnní stádium *Chalara fraxinea*, GROSS et al. 2014). Patogen se v ČR pravděpodobně vyskytuje od 90. let 20. stol., poprvé byl však potvrzen až v roce 2007 (JANKOVSKÝ et HOLDENRIEDER 2009). Tento invazní patogen se šíří vzduchem a primárně napadá listy a jejich řapíky, v důsledku následného rozvoje infekce pak dochází k nekrotizaci pletiv výhonů a větví (HAVRDOVÁ et ČERNÝ 2013). Patogen poškozuje jasanu všech věkových kategorií na různých typech stanovišť. Sazenice a mladé výsadby jasanů jsou nekrózou jasanu poškozovány rychleji (SKOVSGAARD et al. 2010) a ve větším rozsahu (mladé stromky mohou v důsledku napadení odumřít i během jedné vegetační sezóny) než výsadby plně vzrostlé

(HAVRDOVÁ et ČERNÝ 2012). V dnešní době pravděpodobně v ČR neexistuje porost s jasanem, který by nebyl alespoň do malé míry patogenem napaden. Škody lze identifikovat ve školkařství (školkařská produkce jasanu byla téměř zastavena), v okrasné zeleni, v nejrůznějších typech rozptýlené zeleně ve volné krajině (stromořadích, větrolamech, ochranných a zasakovacích pásech, roztroušené zeleni, atp.), v břehových porostech i v porostech lesních (HAVRDOVÁ et ČERNÝ 2013; ČERNÝ et al. 2016).

Vzhledem k významu choroby a rychlému rozvoji onemocnění se pěstování jasanu stává stále náročnějším a dochází i k upouštění od zakládání nových porostů (např. SKOVGAARD et al. 2017). Hlavní cestou boje s nekrózou jasanu je identifikace a využití tolerantních genotypů jasanu. Hlavní zdroj tolerance vůči chorobě byl zjištěn na úrovni jedince (genotypu) a je pravděpodobně polygenního původu (McKINNEY et al. 2011, 2014; KJAER et al. 2012; STENER 2013; ENDERLE et al. 2015; HAVRDOVÁ et al. 2016). Víceméně v každé populaci byly nalezeny výrazně odolné genotypy (Obr. A–B). Tyto genotypy je zapotřebí identifikovat, podpořit jejich rozvoj, uchovat je a případně využít ve šlechtitelských programech (ČERNÝ et al. 2016).

Vybrané tolerantní genotypy jasanu se mohou využít ke klonové produkci nebo k dalšímu křížení, neboť dědičnost získaných znaků k toleranci k této chorobě je vysoká. Výzkum v mnoha evropských zemích se v současnosti zabývá právě výběrem tolerantních genotypů jasanu vystavených dlouhodobému tlaku *H. fraxineus*, vykazujících vysokou toleranci k patogenu v průběhu několika let (DOUGLAS et al. 2017).

Jasany se množí převážně semeny, kultivary se roubojí a očkují (HARTMANN et al. 2011). Klasické řízkování je u tohoto rodu obtížné, zlepšení zakořeňování může být dosaženo s použitím polovyzrálých řízků. Roubování a mikropropagace jsou vhodné metody, které připadají v úvahu při klonovém množení jasanu (THOMPSON et al. 2001).

Pro namnožení elitních stromů nebo jejich jedinců se často využívají u listnatých dřevin mikropropagační techniky. Jedná se o metody vegetativního množení v aseptických podmínkách, které se osvědčily pro masové množení nových kultivarů a jejich rychlému uvedení na trh. Mikropropagace se stává běžným pěstitelským postupem především pro ty genotypy, které se množí obtížně nebo pomalu pomocí klasických metod množení (HARTMANN et al. 2011).

Morfogeneze probíhá dvěma způsoby, buď organogenezí nebo embryogenezí (PROCHÁZKA et al. 1998). Hlavními výhodami při tomto způsobu množení je malá náročnost na množství výchozího rostlinného materiálu, rychlost množení a vysoký množitelský koeficient (GEORGE et DEBERGH 2008). Nejúspěšnější metodou, která se osvědčila pro klonové množení zejména listnatých dřevin, je organogeneze (MALÁ et al. 1999).

Množitelský potenciál mnoha dřevin je silně ovlivněn juvenilitou donorové rostliny. Regenerace v *in vitro* podmínkách může pozitivně ovlivnit fyziologický stav *in vitro* kultury, která je odvozená z dospělých rostlin, jestliže je iniciace provedena z izolovaných vrcholů nebo ještě lépe, pomocí tvorby somatických embryí (PREECE 2008).

Proces rejuvenilizace je možné dosáhnout také roubováním. Odběr primárních explantátů z roubovanců se používá pro snadnější odvození primární kultury. Pro výzkumné účely (např. fyziologické studie), je vhodnější odvodit kultury přímo z donorové rostliny, kvůli případnému vlivu podnože na roub.

U jasanu ztepilého bylo publikováno několik výzkumných prací, které jsou zaměřeny na regeneraci *in vitro* s využitím organogeneze. Výhonové kultury byly odvozeny z různých částí zygotických embryí (TABRETT et HAMMAT 1992; MOCKELIUNAITE et KUUSIENE 2004), z *ex vitro* a *in vitro* semenáčků (CHALUPA 1990; MITRAS et al. 2009; HAMMATT et RIDOUT 1992; DANCHEVA et ILIEV 2015).

Pro klonové množení jsou tyto typy explantátů nevhodné, vzhledem k nejasnému původu výchozího materiálu. Pro klonové množení se hodí apikální listové pupeny odebrané z mladých stromků (SILVEIRA et COTTIGNIES 1994; NOUGAREDE et al. 1996). Literární zdroje týkající se odvození kultur z pupenů dospělých stromů (stáří do 20 let) jsou sporé a jsou soustředěny na práci THOMPSON et al. (2001) a SCHOENWEISS et MEIER-DINKEL (2005).

Založení primárních kultur u jasanu ztepilého z dospělých stromů s využitím vrcholových pupenů je kritickou fází mikropropagace, vzhledem k vysoké kontaminaci primárních kultur a pomalému růstu. ŠEDIVÁ et al. (2017) dosáhla uspokojivých výsledků se založením primárních kultur z dospělých stromů starých několik desítek let s použitím stonkového segmentu s vypreparovaným vrcholem a se základy listů. Zlepšení lze dosáhnout odběrem primárních explantátů z roubovanců (SCHOENWEISS et MEIER-DINKEL 2005) nebo odběrem z mladých výhonů, které vyrostly na bázi kmene dospělého stromu.

Zakořeňovací fáze se může provést dvěma způsoby, pouze v *in vitro* podmínkách nebo kombinovaně. Při prvním způsobu celý proces zakořeňování (iniciace a vývoj kořenů) probíhá v kultivačních nádobách na živných médiích (např. MITRAS et al. 2009) nebo je iniciace indukována *in vitro* a vývoj kořenů v nesterilních podmínkách *ex vitro* v substrátu (SCHOENWEISS et MEIER-DINKEL 2005). U obou způsobů jsou použity mikrořízky, které byly několik dní kultivovány na živném médium s růstovým regulátorem (auxin). Zakořeňovací schopnost je vyšší u mikrořízků, které pochází z kultur odvozených z juvenilních donorových rostlin a v případě, že vývoj kořenů probíhal nesterilně v půdě (SCHOENWEISS et MEIER-DINKEL 2005), tyto výsledky jsou v souladu s našimi provedenými experimenty. Podle DOUGLAS et al. (2017) jsou rostliny odvozené z *in vitro* podmínek vhodné jako matečné rostliny pro produkci řízků.

Pro úspěšnou aplikaci organogeneze v *in vitro* podmínkách je nezbytné zvládnutí všech fází mikropropagace (iniciace, multiplikace, zakořeňování a aklimatizace). Každá fáze vyžaduje specifické podmínky, co se týká chemického složení živných médií a pěstitelského substrátu, tak kultivačních podmínek (teplota, světlo).

Metodika zahrnuje dva ucelené *in vitro* množitelské postupy, které vychází buď z juvenilního rostlinného materiálu (ze semen) nebo z dospělých stromů s použitím vrcholových pupenů.



**Obr. 1 A–B** Příklady tolerantních genotypů jasanu s minimálním poškozením ve srovnání se silně napadenými jedinci patogenem *H. fraxineus* (Foto: L. Havrdová)

## 2.2. METODICKÝ POSTUP MIKROPROPAGACE

### 2.2.1. Primární kultury

#### *Založení primárních kultur z vegetačních pupenů*

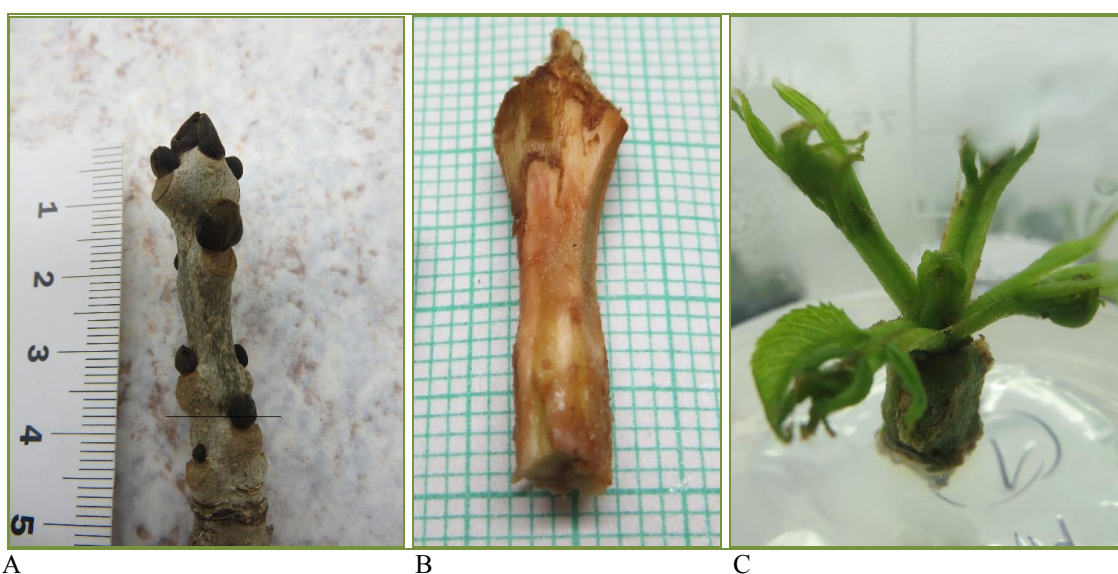
Pro získání identických jedinců z donorových stromů jasanu je vhodným iniciačním explantátem vrcholový pupen. U jasanu je sběr rostlinného materiálu pro založení *in vitro* kultur soustředěn na období leden až duben. Výhony z donorových jedinců se odebírají v délce 10–30 cm podle stáří donorového stromu. Výhony se odlistí, vloží do mikroténového sáčku a dopraví se do laboratoře v chladicí tašce. V případě, že rostlinný materiál není zpracován do 24 hod, je možné ho skladovat v chladničce při teplotě 5–7 °C po dobu 5 dnů.

Před povrchovou sterilizací se výhony zkrátí na 3–4 cm (Obr. 2A). Vlastní sterilizace probíhá tak, že se výhony ponoří na 1 min do 70 % etanolu, pak se vyjmou, nechají se okapat a následně se vysterylizují v 1% chloridu rtuťnatém ( $\text{HgCl}_2$ ) na 5 min. Pro větší účinnost se nádoba se sterilizačním prostředkem a rostlinným materiálem umístí na třepačku. Další manipulace s rostlinným materiálem se provádí sterilně. Po uplynutí sterilizace se nádoba přenesse do připraveného flow-boxu a výhony se pinzetou přemístí do nádoby se sterilní deonizovanou vodou a opět se materiál nechá třepat po dobu 10 minut. Tento úkon se opakuje 3 ×. Pro založení primárních kultur jsou vhodné pouze vrcholové vegetativní pupeny, sousedící jsou květní, a úžlabní jsou příliš malé. Pomocí skalpele se u výhonu odstraní postranní pupeny, vrcholový pupen se ponechá. Vypreparuje se vrchol s dvěma listovými primordií a nakonec se odstraní pokožka na zbývající části stonkového

explantátu (Obr. 2B). Nedoporučujeme použít pouze vypreparovaný pupen s malou částí stonku (2–3 mm), ten se nám pro založení primární kultury neosvědčil.

Stonkové explantáty (délka 20–28 mm) s vypreparovaným vrcholem a přisedlými základy listů se umístí jednotlivě ve vertikální poloze do 100 ml Erlenmayerových baněk na plné WPM médium s vitaminy (LLOYD et McCOWN 1980, Duchefa). Živné médium je doplněno o 0,5 mg.l<sup>-1</sup> metatopolinu, 20 g.l<sup>-1</sup> sacharózy a 2,5 g.l<sup>-1</sup> Phytagelu (Sigma-Aldrich). Pro potlačení endogenní kontaminace se do média přidá 0,2% přípravek PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology) s biostatickými a biocidními účinky. Před autoklávováním je živné médium upraveno na pH 6,0.

Kultivační nádoby s primárními explantáty se umístí do kultivační místnosti, s 16-hod fotoperiodou při intenzitě světla 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a teplotě 23  $\pm$  1 °C. Po 2–3 týdnech dochází k proliferaci výhonů (Obr. 2C). Explantáty se přenáší každé 3 týdny na čerstvé živné médium. Založení primární kultury je jednodušší z dřevin v juvenilní fázi v porovnání s dospělými stromy.



**Obr. 2** A–C Postup při založení primární kultury jasanu ztepilého pomocí vegetativních pupenů: A – výchozí materiál, B – úprava primárního stonkového explantátu, C prorůstající stonkový explantát (Foto: J. Šedivá)

### *Založení primárních kultur ze semen*

Izolace zygotických embryí se provádí z plodů v různé zralosti. Jestliže jsou zdrojem zralé nažky, a *in vitro* kultury nezakládáme ihned po sběru, je žádoucí je před uskladněním dosušit při pokojové teplotě přibližně 2–3 dny, a pak je uskladnit v papírovém sáčku v ledničce při teplotě kolem 5–7 °C. Plody musí být suché, aby nedošlo ke znehodnocení plísněmi. Před sterilizací se zralé nažky opatrně natrhnou, semena se vyjmou a povrchově sterilizují v 30% komerčním bělidle SAVO<sup>®</sup> (1,4 % chlorid sodný, Bochemie a.s., CZ) s 1–2 kapkami smáčedla Tweenu 20. Nádoba se sterilizačním roztokem a semeny se umístí na třepačku. Po dvou hodinách se semena pinzetou přemístí v připraveném flow-boxu do sterilní deionizované vody a nádoba se opět umístí na 10 min na třepačku. Tento úkon se opakuje 3 ×. Semena se po sterilizaci vyjmou, umístí na sterilní filtrační papír pro odsátí přebytečné vody a konce semen se odříznou, aby se lépe uvolnily dělohy. Postup je naznačen na obrázku 3A. Zygotické embryo se opatrně uchopí pinzetou a

umístí se horizontálně na plné WPM médium s vitaminy, doplněné o 20 g.l<sup>-1</sup> sacharózy a 2,5 g.l<sup>-1</sup> Phytagelu (Sigma-Aldrich), růstové regulátory jsou vynechány. Po 10 dnech se klíčící embrya opatrně pinzetou otočí do vertikální polohy a jemně zapíchnou se do média. Jestliže požadujeme dopěstování rostlin v *in vitro* podmínkách, po 5 týdnech *in vitro* kultivace umístíme sterilní semenáčky (Obr. 3B) do větších plastových nádob s ventilací (výška 140 mm, Duchefa Biochemie B.V.) na WPM médium stejného složení viz nahoře avšak s 1 g.l<sup>-1</sup> aktivního uhlí, které umožní lepší rozvoj kořenů (Obr. 3C, D).



**Obr. 3 A–D** Postup při založení primární kultury jasanu ztepilého pomocí zygotických embryí: A – postup při izolaci zygotického embrya, zleva semeno, vysterilizované semeno, vyizolované zygotické embryo, B – vývoj embrya v semenáček, C – *in vitro* rostlina, D – detail (Foto: J. Šedivá)

### 2.2.2. Multiplikace *in vitro* kultur

Prorůstající výhony z primárních explantátů (stonkové explantáty a zygotická embrya) se odřiznou, až stoněk dosáhne 2 cm. Explantáty se pasážují každé 3–4 týdny na čerstvé WPM médium s 0,5 mg.l<sup>-1</sup> metatopolinu, 20 g.l<sup>-1</sup> sacharózy a 2,5 g.l<sup>-1</sup> Phytagelu (Sigma-Aldrich). V případě, že se objeví kontaminace (bílý zákal) na bázi explantátu, přehodí se explantát na médium s PPM po dobu jedné pasáže. Rozdělení primárního explantátu po první pasáži se provede, až výhon začíná znova aktivně růst. Pro zvýšení

počtu nově vytvořených výhonů se výhony rozdělí na jednonodální segmenty a umístí se vertikálně na médium. Většinou se vytvoří 2–4 výhony v závislosti na genotypu (Obr. 4). Interval přenosu na čerstvé živné médium se pohybuje mezi 3–4 týdny.



**Obr. 4** Regenerace axilárních a adventivních výhonů z jednonodálního explantátu u jasanu ztepilého (Foto: J. Šedivá)

### 2.2.3. Zakořeňování a aklimatizace rostlin

#### *In vitro* zakořeňování

Pro zakořeňování se používají výhony (mikrořízky), které mají délku stonku minimálně 2 cm. Báze výhonu je seříznuta skalpelem hladkým šikmým řezem. Výhony jsou umístěny do kultivačních nádob vertikálně, na pevné WPM médium s vitaminy (Duchefa) v poloviční koncentraci makro i mikroprvků. Médium je doplněno o auxin v koncentraci 10 mg.l<sup>-1</sup> IBA (kyselina indolyl-3-máselná), 10 g.l<sup>-1</sup> sacharózy a zpevněno 2,5 g.l<sup>-1</sup> Phytagelu. Po devíti dnech na indukčním médiu s auxinem se výhony přemístí na médium stejného složení, ale s vyloučením auxinu. Po 3 týdnech kultivace, výhony začínají tvořit kořeny. Ošetření mikrořízek auxinem aplikovaným do média podstatně zvyšuje zakořeňování. Úspěšnost zakořeňování v podmínkách *in vitro* se pohybuje v rozmezí od 60 do 85 % v závislosti na použitém genotypu. Kultury jsou po celou dobu zakořeňování kultivovány v 16-hod fotoperiodě, při intenzitě světla 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a teplotě 23  $\pm$  1 °C.

Po 5–6 týdnech jsou zakořeňované výhony vyjmuty z kultivačních nádob (Obr. 5 A–B), zbytky agaru jsou odstraněny vodou z kohoutku a rostliny jsou přesázeny do květináčů (TEKU-TERRA,  $\varnothing$  8 cm) s propařeným rašelinovým substrátem (perlitem : rašelina, 1 : 1, v/v) a přemístěny do skleníku při teplotě 20–22 °C. Rostliny jsou bezprostředně ošetřeny fungicidním přípravkem Previcurem Energy (0,15 %). Rostliny musí být zastíněny a

udržovány při vyšší vzdušné vlhkosti, po 2 týdnech se vlhkost sníží větráním. Po 6 týdnech v *ex vitro* podmínkách se rostliny přesadí do rašelinového substrátu a ponechají se ve skleníku. Po dalších 6 týdnech se rostliny opět přesadí a přemístí se ven do pařeniště se stíněním, tím je proces aklimatizace ukončen (Obr. 6A–B).

Celý proces zakořeňování v *in vitro* podmínkách je vhodný pro experimentální využití z důvodů přesně definovaných kultivačních podmínek a sterilního prostředí.



**Obr. 5 A–B** Tvorba kořenů u jasanu ztepilého v *in vitro* podmínkách: A – na živném médiu s auxinem, B – detail rostlin před přenosem do nesterilních podmínek (Foto: J. Šedivá)



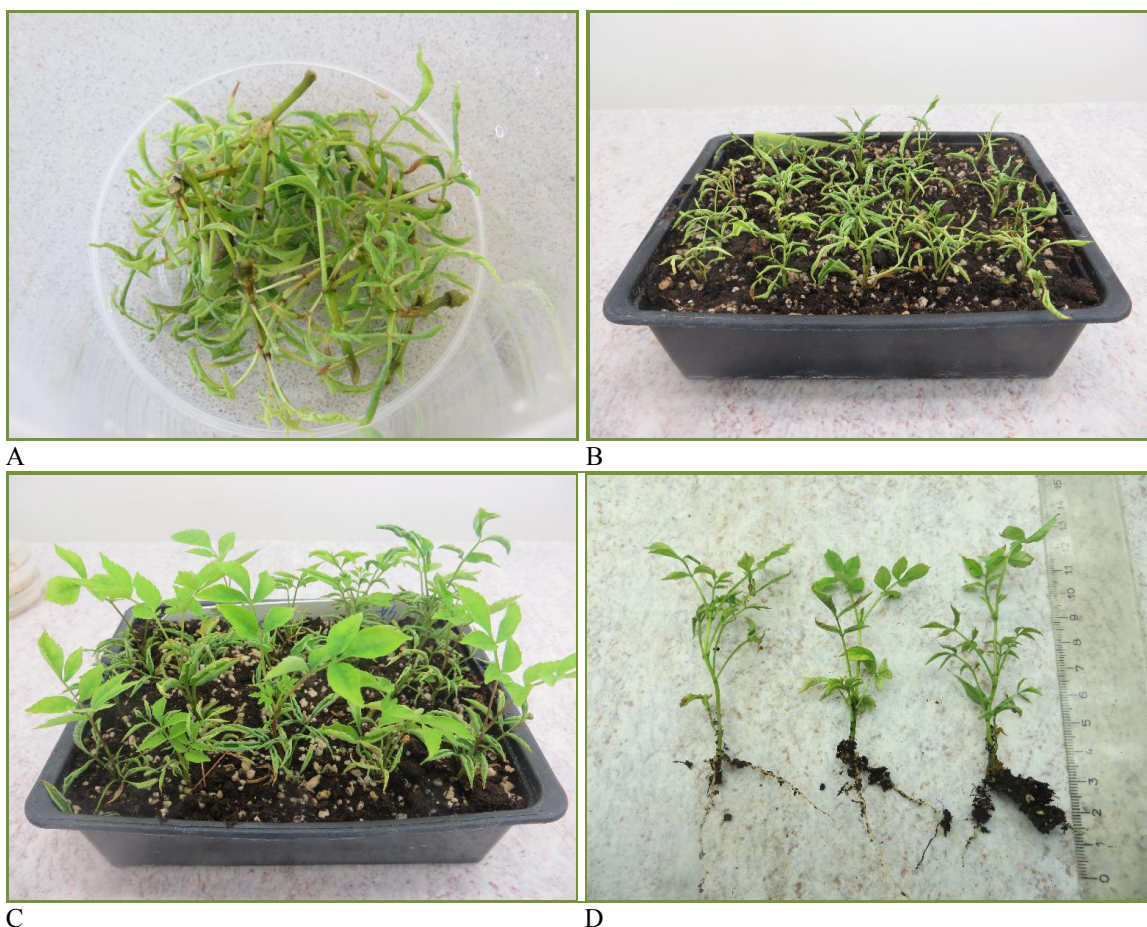
**Obr. 6A–B** Rostliny jasanu ztepilého v nesterilních podmínkách: A – adaptovaná rostlina na nesterilní podmínky ve skleníku, B – aklimatizované rostliny v pařeništi (Foto: J. Šedivá)

### *Ex vitro* zakořeňování

Tento způsob zakořeňování spočívá v tom, že indukce kořenových základů probíhá v *in vitro* podmínkách na živném médiu s auxinem viz odstavec *In vitro* zakořeňování a prorůstání kořenů se děje v *ex vitro* (nesterilních) podmínkách. Po devíti dnech na indukčním médiu s auxinem se výhony pinzetou vyndají z kultivačních nádob, soustředí se v plastické nádobě, ve které se propláchnou od agaru kohoutkovou vodou (Obr. 7A). Do připravených výsevních misek naplněných propařeným zvlhčeným množárenským



substrátem (rašelina + perlit, 1 : 1, Obr. 7B ) se píchají mikrořízky, které jsou následně ošetřeny proti houbovým patogenům přípravkem Previcurem Energy (0,15 %). Jednotlivé misky s řízků jsou po třech kusech vloženy do plastového boxu (Minipa Brno) a zakryty nízkým víkem bez otvorů. Provádí se pravidelná mírná zálivka, misky v boxech nesmí stát ve vodě. Mikrořízky se nechají zakořenit v kultivační místnosti při teplotě  $23 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$  /  $19 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$  při fotoperiodě 16 hod světlo/8 hod tma. Po 3 týdnech se víka vymění za vyšší s otvory, kvůli snížení vzdušné vlhkosti, aby se rostliny adaptovaly na přechod do skleníku. Po 6 týdnech se zakořenělé rostliny přemístí do skleníku (Obr. 7 C,D) a přesadí do QUICK POT 24T/16 do rašelinového substrátu. Pro produkci mladých rostlin je výhodnější tento způsob zakořeňování, neboť tvorba kořenů a adaptace na nesterilní podmínky probíhá v jednom kroku.



**Obr. 7 A–D** Tvorba kořenů u jasanu ztepilého v *ex vitro* podmínkách v množárenském substrátu (Foto: J. Šedivá)

### 3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost předložené metodiky množení spočívá ve vypracování mikropropagačního postupu pro jasan ztepilý z donorových rostlin jak v juvenilní, tak generativní fázi vývoje. V iniciační fázi byla nalezena taková úprava primárního explantátů, která umožní odvození *in vitro* kultury přímo z dospělého stromu nikoliv přes mezičlánek v podobě naroubované rostliny. Bylo optimalizováno složení kultivačního média pro produkci kvalitních výhonů

s vysokým potenciálem pozdější tvorby kořenů. V závěrečné fázi mikropropagace byl vypracován postup zakořeňování jak ve sterilních, tak nesterilních podmínkách zaručující vysoký stupeň aklimatizace a dalšího úspěšného vývoje mladých rostlin.

#### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena komerčním laboratořím a produkčním školkám, které se zabývají množením lesních a okrasných dřevin a dále výzkumným pracovištím, která jsou zaměřena na šlechtitelské programy, ochranu a fyziologické studie dřevin.

#### 5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Při mikropropagaci tolerantnějších genotypů jasanu ztepilého jsou významné především neekonomické aspekty, kdy v důsledku používání metodiky dojde ke zlepšení dosavadní nepříznivé situace v uplatnění jasanu ve výsadbách v lesním a vodním hospodářství a dojde k udržení a posílení ekologické stability krajiny a produkčních i mimoprodukčních funkcí lesa a stromových výsadeb v podmínkách biologické invaze *H. fraxineus*.

#### 6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

ČERNÝ, K., HAVRDOVÁ, L., ZLATNÍK, V., HRABĚTOVÁ, M. (2016). Pěstování jasanu v prostředí s výskytem *Hymenoscyphus fraxineus*. Certifikovaná metodika. Certifikace 30. 12. 2016 MZe (Osvědčení č. 73910/2016-MZE-16222/M140). VÚKOZ, v.v.i., Průhonice, ISBN 978-80-87674-18-5, ISBN 978-80-88184-05-8, 52 s.

DANCHEVA, D., ILIEV, I. (2015). Factors affecting adventitious shoot formation in *Fraxinus excelsior* L. Propagation of Ornamental Plants, 15: 10–20.

DOUGLAS, G. C., NAMARA, J. M., O'CONNELL, K., DUNNE, L., GRANT, J. (2017). Vegetative propagation of dieback-tolerant *Fraxinus excelsior* on commercial scale. In: R. Vasaitis & R. Enderle [eds.]: Dieback of European Ash (*Fraxinus* spp.): Consequences and guidelines for sustainable management, 288–299.

ENDERLE, R., NAKOU, A., THOMAS, K., METZLER, B. (2015). Susceptibility of autochthonous German *Fraxinus excelsior* clones to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is genetically determined. Annals of Forest Science, 72: 183–193.

GEORGE, E. F., DEBERGH, P. C. (2008). Micropropagation: Uses and methods. In George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J., [eds.], Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Volume 1. The background. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 29–64.

GROSS, A., HOLDENRIEDER, O., PAUTASSO, M., QUELOZ, V., SIEBER, T. N. (2014). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. Molecular Plant Pathology, 15(1): 5–21.

- HAMMATT, N. AND RIDOUT, M.S. (1992). Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior*). Plant Cell, Tissue and Organ Cult., 13: 67–74.
- HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES, F. T., GENEVE, R. L. (2011). Hartmann & Kester's Plant Propagation. Principles and practices. Eighth edition. Prentice Hall, New York, pp. 915.
- HAVRDOVÁ, L., ČERNÝ, K. (2012). Invaze *Chalara fraxinea* v CHKO Lužické hory – předběžné výsledky výzkumu. Acta Pruhoniciana 100: 137–145.
- Havrdová, L., Černý, K. (2013). Nekróza jasanu – přehled současných znalostí. Zpravodaj ochrany lesa 17: 56–63.
- HAVRDOVÁ, L., NOVOTNÁ, K., ZAHRADNÍK, D., BURIÁNEK, V., PEŠKOVÁ, V., ŠRŮTKA, P., ČERNÝ, K. (2016). Differences in susceptibility to ash dieback in Czech provenances of *Fraxinus excelsior*. Forest Pathology, 46: 281–288.
- CHALUPA, V. (1990). Micropropagation of hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and ash (*Fraxinus excelsior* L.). Biol. Plant. (Praha), 32: 332–338.
- CHYTRÝ, M., KUČERA, T., KOČÍ, M., GRULICH, V., LUSTYK, P. [eds.] (2010). Katalog biotopů České republiky. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha, druhé vydání, 445 s.
- JANKOVSKÝ, L., HOLDENRIEDER, O. (2009). *Chalara fraxinea* – Ash Dieback in the Czech Republic. Plant Protection Science 45, 74–78.
- KJÆR, E. D., MCKINNEY, L. V., NIELSEN, L. R., HANSEN, L. N., HANSEN, J. K. (2012). Adaptive potential of ash (*Fraxinus excelsior*) populations against the novel emerging pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Evolutionary Applications, 5(3): 219–228.
- KOWALSKI, T., HOLDENRIEDER, O. (2008). A new fungal disease of ash in Europe (in German). Schweiz. Z. Forstwes., 159: 45–50.
- LLOYD, G., McCOWN, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. International Plant Propagators' Society Proceedings, 30: 421–427.
- MALÁ, J., CVRČKOVÁ, H., MÁCHOVÁ, P., ŠÍMA, P. (1999). Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých lesních dřevin. Zprávy lesnického výzkumu, 44/4: 6–11.
- McKINNEY, L. B., V., NIELSEN, L. R., HANSEN, J. K., KJÆR, E. D. (2011). Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (*Oleraceae*) to *Chalara fraxinea* (*Ascomycota*): an emerging infectious disease. Heredity, 106: 788–797.
- McKINNEY, L. V., NIELSEN L. R., COLLINGE D. B., THOMSEN I. M., HANSEN J. K. A KJÆR, E. D. (2014). The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. Plant Pathology, 63: 485–499.
- MITRAS, D., KITIN, P., ILIEV, I., DANCHEVA, D., SCALTSOYIANNES, A., TSAKTSIRA, M., NELLAS, CH., ROHR, R. (2009). *In vitro* propagation of *Fraxinus excelsior* L. by epicotyls. J. of Biological Research-Thessaloniki, 11: 37–48.
- MOCKELIUNAITE, R., KUUSIENE, S. (2004). Organogenesis of *Fraxinus excelsior* L. by isolated mature embryo culture. Acta Universitatis Latviensis, Biology, 676 :197–200.

- NOUGARÉDE, A., SILVEIRA, C. E., RONDET, P. (1996). In nature dormant buds and *in vitro* dormant-like buds of *Fraxinus excelsior* L. Protoplasma, 190: 16–24.
- PREECE, J. (2008). Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J. [eds.]: Plant propagation by tissue culture, the background, 3<sup>rd</sup> edition. Volume 1. Springer, Dordrecht, 403–422.
- PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J. et al. (1998). Plant Physiology (Fyziologie rostlin), Academia, Praha, The Czech Republic, pp. 484.
- RIEDL, M. et al. (2014). Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České republiky v roce 2013. MZe, ISBN 978-80-7434-153-3, 134 s.  
[http://eagri.cz/public/web/file/337394/Zprava\\_o\\_stavu\\_lesa\\_2013.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/337394/Zprava_o_stavu_lesa_2013.pdf)
- SCHOENWEISS, K., MEIER-DINKEL, A. (2005). *In vitro* propagation of selected mature trees and juvenile embryo-derived cultures of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Propagation of Ornamental Plants, 5: 137–145.
- SILVEIRA, C. E., COTTIGNIES, A. (1994). Period of harvest, sprouting ability of cuttings, and *in vitro* plant regeneration in *Fraxinus excelsior*. Can. J. Bot., 72: 261–267.
- SKOVSGAARD, J. P., THOMSEN, I. M., SKOVGAARD, I. M., MARTINUSSEN, T. (2010). Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). For. Path., 40: 7–18.
- SKOVSGAARD, J. P., WILHELM, G. J., THOMSEN I. M., METZLER, B., KIRISITS, T., HAVRDOVÁ, L., ENDERLE, R., DOBROWOLSKA, D., CLEARY, M., CLARK, J. (2017). Silvicultural strategie for *Fraxinus excelsior* in response to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*. Forestry, přijato.
- SLAVÍK, B. [eds.] (1997). Květena České Republiky 5. Academia Praha, 447–450.
- STENER, L. G. (2013). Clonal differences in susceptibility to the dieback of *Fraxinus excelsior* in southern Sweden. Scan. J. of Forest Research 28(3), 205–216.
- ŠEDIVÁ, J., HAVRDOVÁ, L., MARŠÍK, P. (2017). Micropropagation of common ash clones resistant to fungus *Hymenoscyphus fraxineus*. Acta Horticulturae, in print.
- TABRETT, A. M., HAMMAT, N. (1992). Regeneration of shoots from embryo hypocotyls of common ash (*Fraxinus excelsior*). Plant Cell Rep., 11: 514–518.
- THOMPSON, D., HARRINGTON, F., DOUGLAS, G., HENNERTY, M.J., NAKHSHAB, N., LONG, R. (2001). Vegetative propagation techniques for oak, ash, sycamore and spruce. COFORD, Dublin, p. 54.
- ÚRADNÍČEK, L., MADĚRA, P., TICHÁ, S., KOBLÍŽEK, J. (2009). Dřeviny České republiky. Lesnická práce, Kostelec n. Č. l., druhé vydání, 368 s.

## 7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- ČERNÝ, K., HAVRDOVÁ, L., ZLATNÍK, V., HRABĚTOVÁ, M. (2016). Pěstování jasanu v prostředí s výskytem *Hymenoscyphus fraxineus*. Certifikovaná metodika. Certifikace 30. 12. 2016 MZe (Osvědčení č. 73910/2016-MZE-16222/M140). VÚKOZ, v.v.i., Průhonice, ISBN 978-80-87674-18-5, ISBN 978-80-88184-05-8, 51 s.
- HAVRDOVÁ, L., NOVOTNÁ, K., ZAHRADNÍK, D., BURIÁNEK, V., PEŠKOVÁ, V.,

- ŠRŮTKA, P., ČERNÝ, K. (2016). Differences in susceptibility to ash dieback in Czech provenances of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology*, 46: 281–288.
- HRDOUŠEK, V. (ed.), KRŠKA, B., SPÍŠEK, Z., BAKAY, L., ŠEDIVÁ, J. (2014). *Oskeruše, strom pro novou Evropu (The service tree, a tree for a new Europe)*, Brázda, ISBN: 978-80-87387-28-3, 237 s.
- ŠEDIVÁ, J., VLAŠÍNOVÁ, H., MERTELÍK, J. (2013). Shoot regeneration from various explants of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *Scientia Horticulturae*, 161: 223–227.
- ŠEDIVÁ, J., HAVRDOVÁ, L., MARŠÍK, P. (2017). Micropropagation of common ash clones resistant to fungus *Hymenoscyphus fraxineus*. *Acta Horticulturae*, in print.
- ŠEDIVÁ, J., VEJSADOVÁ, H., MERTELÍK, J. (2004). Využití metody meristémového množení *in vitro* v kombinaci s termoterapií pro ozdravení vybraných druhů rostlin od virových infekcí a metody mikropropagace *in vitro* pro klonové namnožení vybraných rezistentních taxonů. Závěrečná zpráva projektu 0441 výzkumného záměru VÚKOZ, v. v. i., Průhonice, 11 s.
- ŠEDIVÁ, J., VEJSADOVÁ, H., VLAŠÍNOVÁ, H., MERTELÍK, J., KLOUDOVÁ, K. (2011). Způsoby *in vitro* regenerace u *Aesculus hippocastanum* L. *Acta Pruhoniana*, 99: 127–130.
- ŠEDIVÁ, J., VLAŠÍNOVÁ, H., KLEMŠ, M., VEJSADOVÁ, H., MERTELÍK, J., KLOUDOVÁ, K., HAVEL, L. (2011). Behaviour of resistant and non-resistant clones of *Aesculus hippocastanum in vitro*. *Acta Horticulturae*, 988: 123–128.
- ŠEDIVÁ, J., VLAŠÍNOVÁ, H., MERTELÍK, J. (2013). Shoot regeneration from different explants of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.), *Scientia Horticulturae*, 161: 223–227.
- VEJSADOVÁ, H., ŠEDIVÁ, J., VLAŠÍNOVÁ, H., HAVEL, L., MERTELÍK, L., KLOUDOVÁ, K. (2009). Indukce organogeneze u jírovce maďalu (*Aesculus hippocastanum* L.). *Zprávy lesnického výzkumu*, 54/4: 286–292.
- VLAŠÍNOVÁ, H., KLEMŠ, M., ŠEDIVÁ, J., MERTELÍK, J., HAVEL, L. (2012). Morfologické reakce dvou klonů jírovce maďalu s odlišnou odolností vůči klíněnce jírovcové. *Úroda, vědecká příloha*, 9: 74–79, ISSN: 0139-6013.

## 8. DEDIKACE

Metodika byla zpracovaná v rámci projektu COST LD 14078 Metabolické interakce jasanu ztepilého a nového invazního houbového patogenu *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky).

Osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky č. j. 25899/2017-MZE-17221 bylo vydáno Ministerstvem zemědělství ČR, Odborem rostlinných komodit MZe Praha dne 21. 4. 2017.