

Karel Pešina:

Umělá indukce polyploidie u topolů

Úvod

Podnětem k experimentálnímu získání triploidní osiky byly objevy klonů triploidní osiky ($3x = 57$) v přírodě švédskými genetiky (NILSSON-EHLE 1935—36, MÜNTZING 1935—36, TOMETORP 1937, MELANDER 1938). Triploidní osiky měly znaky gigantismu, osika objevená NILSSON-EHLEM měla o 36 % více hmoty než okolní diploidní.

Vlastní práce byla zaměřena dvěma směry: 1. získání neredukovaného gamétu (diploidního) a po oplození vznik triploidní zygoty, 2. získání auto-tetraploidní rostliny zdvojením somatických chromosomů. V prvním případě je nutno, aby kolchicin zasáhl buď sporogenní pletivo nebo meiotické dělení. Při zasažení PMC v meiosi nenastane typická redukce a neproběhne homeo-typické dělení. Při tom mohou vznikat haploidní, diploidní až tetraploidní mikrospóry (DERMEN 1938).

Experimentálně snažší je získání polyploidních buněk somatických (DERMEN 1940, EIGSTI 1957). Pro aplikaci kolchicinu je nejvhodnější buď meristém vegetačního vrcholu nebo celá semena. Metodiky aplikace jsou vyčerpávajícím způsobem popsány DERMENEM 1940 a EIGSTIM 1957. Doba máčení je dána jednak difuzí kolchicinu do pletiva, jednak mitotickým cyklem meristému. Zpravidla se jedná o dobu 24 i více hodin. Kratší doby a efektivnějších výsledků lze dosáhnout použitím vakua (OLDÉN 1954, ILLIES 1956, BRAAK a ZEILINGA 1957).

Získat úplně tetraploidní pletivo je obtížné. Kontinuitu primárních histogenetických vrstev vegetačního vrcholu udržují 1—3 buňky. Každá histogenetická vrstva se dělí nezávisle na ostatních a kromě toho iniciály primárních histogenetických vrstev mohou být během růstu posunuty a jejich místo zaujmou jiné buňky (SATINA a spol. 1940, DERMEN 1945). Výsledkem působení kolchicinu na vegetační vrchol jsou pak sektorální, axiální a periklinální chiméry (BLAKESLEE a spol. 1939, SATINA a spol. 1940, DERMEN 1947, 1951, 1952, 1953, DERMEN a BAIN 1944). Ty se pak projevují různým morfologickým tvarem listů, tloušťkou jednotlivých orgánů a anatomickou stavbou. Z hlediska selekčního jsou cenné ty typy chimér, ve kterých je polyploidní druhá histogenetická vrstva, ze které vzniká pletivo kortikální (vnitřní). Z toho totiž vzniká pletivo sporogenní a z něho pohlavní buňky.

Materiál a metodika

K indukci polyploidie sloužil materiál dvojího druhu:

1. Květonosné větve z výběrových stromů (*Populus alba* L., *P. tremula* L., *P. canescens* SM. a *P. nigra* L.), případně květní rostliny v květináčích (na semenáčky osiky naroubované plodné větvičky z výběrových stromů).

2. Semena sebraná z výběrových stromů (*P. tremula* L., *P. alba* L., a *P. nigra* L.).

Květonosné větve (květní rostliny) byly jednak různým způsobem ošetřovány kolchicinem, jednak sloužily jako otec nebo matka pro křížení s kolchicinovanými partnery. Po sebrání byly květonosné větve uloženy v chladném sklepě (nejdéle 7—10 dní). Před započítáním pokusu byla dělána cytologická kontrola vývoje pylových mateřských buněk (PMC) případně semeníků. Poté byla báze větve znovu seříznuta, redukován počet květenství, zvláště na samičích exemplářích. Větve pak byly dány do lahví s vodou do teplého skleníku. Voda v lahvích byla vyměňována, přesto se nepodařilo zabránit růstu řas a bakterií. V těchto vodních kulturách větve květly a dozrávalo semeno. Květní větve měly ztráty způsobené padáním jehněd. Lepší průběh zrání jehněd byl u roubovaných květních rostlin v květináčích.

Semena sebraná z výběrových stromů byla běžným způsobem vyluštěna. Klíčivost semeno byla za zpravidla vysoká.

Indukce polyploidie byla dělána na dvojím druhu dělicích se buněk: na pylových mateřských buňkách (PMC), případně mateřských buňkách zárodečného vaku (EMC) a na meristému vegetačního vrcholu. Ten byl buď v klidu (semena) nebo na dělicím se meristému (klíčící rostlinky). V prvním případě byl vodní roztok kolchicinu aplikován na jehnědy a to několikerým způsobem:

1. Pod jehnědou byl vymodelován disk z plastelíny, do něho byla zapíchnuta široká skleněná trubička a do ní byl nalit roztok kolchicinu. Jehněda byla před tím zbavena šupin a chmýří. Případně byla jehněda obalena vatou, na kterou byl kapán roztok kolchicinu. Doba působení 24 až 48 hodin, koncentrace kolchicinu 0,2; 0,1 a 0,05 %.

2. Injekční stříkačkou byl roztok kolchicinu vpraven do dutiny osy květenství. Koncentrace kolchicinu 0,5 a 0,1 %.

3. Kratší větvičky s jehnědami (zbavenými šupin a chmýří) byly máčeny v roztoku kolchicinu ve vakuu (8 mm Hg po dobu 15, 30 a 40 minut, koncentrace 0,25 a 0,1 %).

Rovněž na vegetační vrcholy byl kolchicin aplikován několikerým způsobem:

1. Semena botnala v roztoku kolchicinu ve vakuu 10, 20, 40 a 80 minut. Během 5—10 min. bylo dosaženo vakua 2—10 mm Hg. Koncentrace kolchicinu 1; 0,1; 0,01 a 0,001 %.

2. Vegetační vrcholy klíčících rostlin byly máčeny v roztoku kolchicinu ve vakuu. Rostlinky staré 3 až 7 dní byly opatrně vyjmuty ze země, kořinky obaleny želatínou aby nevyschly, rostlinky postaveny na rozevřené dělohy do Petriho misky s filtračním papírem a roztokem kolchicinu (0,1 a 0,01 %) po dobu 10 minut. Rostlinky pak byly opět zasazeny do země.

3. Kapání roztoku kolchicinu na vegetační vrcholy klíčících rostlinek s přidáním Adhezínu (0,1 %). Roztok byl kapán v určitém stupni vývoje, pomocí injekční stříkačky, aby mohla být odměřena malá kapka (konec kolchicinu 0,1 %).

4. Opakovaná indukce na vegetačních vrcholech. Buď kombinace způsobu 1 a 3 (bez Adhezínu), nebo kapán roztok kolchicinu 0,1 % se smáčedlem Tween 80 (Tw) v koncentraci 0,02%, během určité doby.

Pokusy s kolchicinováním květenství byly dělány v únoru a v březnu v teplém skleníku. V roce 1958 ve skleníku Brožkovy genetické zahrady GUÚK v Praze, kde maxima teplot kolísala od 15 do 30° C a minima od 5 do 13° C; v roce 1959 a 1960 ve skleníku VÚLHM ve Strnadlech, kde maxima teplot kolísala od 15 do 25° C a minima od 5 do 13° C. Pokusy se semeny a klíčními rostlinkami byly dělány rovněž ve skleníku ve Strnadlech, v červnu a červenci 1959 a 1960. V této době maxima teplot ve skleníku vystupovala až na 33° C, minima se pohybovala mezi 15—20° C. Semeno bylo vyséváno do upravených klíčidel se sterilizovanou zemí a před vysetím moženo oxychinolátem mědnatým.

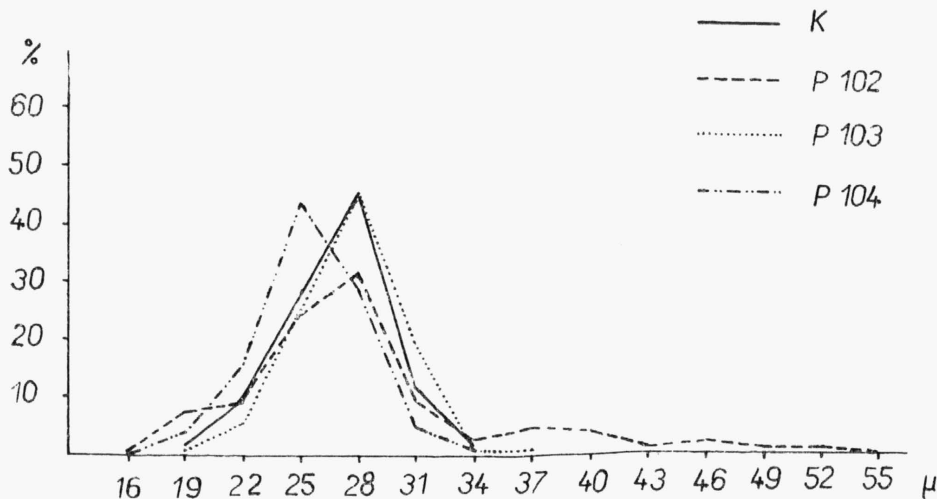
Ke každému pokusu uvolněnému roztokem kolchicinu byly příslušné kontroly kolchicinem neošetřené. Tyto jsou v dalším označeny jako K. V pokusech bylo použito kolchicinu zn. Merck. Pokusné rostliny byly veelku zdravé. Ve sterilizované zemi a u mořených semen se padání semenáčků prakticky neprojevovalo. Toprve později (zvláště v pařnících) byly rostliny napadeny *Fusarium*. Byly proto stříkány Bordeauxskou jichou. Přesto se nákaza přenesla částečně i do školky.

Cytologická kontrola (PMC, báze mladých listů) byla dělána roztakovými preparáty, barvení acetokarmínem. Biometrické hodnocení týkalo se pouze velikostí průduchů. Listy byly odebrány z rostlin jednak z dolní jednak z horní části. Z dolní části bylo vynecháno několik (6 až 8) nejspodnějších malých listů, morfologicky odlišných od listů normálních. Za první list byl považován první volký list a od něho počítáno směrem vzhůru. Od vrcholu bylo počítáno od prvního úplně rozvitého listu včetně, směrem dolů. Průduchy byly měřeny na epidermis ze spodu listů. Epidermis byla odebrána na dvou místech v dolní třetině listů po obou stranách hlavního žebra. Měřeno bylo celkem 50 průduchů z každého listu a to délka a šířka. Velikost průduchů byla vyjádřena jako plocha elipsy ($E = \pi ab$).

V ý s l e d k y p o k u s ů

1. Indukce polyploidie na pylových mateřských buňkách a mateřských buňkách zárodečného vaku.

Pokusy s polyploidisací PMC (EMC) byly dělány v roce 1958, 1959 a 1960. Účinek kolchicinu na pletiva jehněd byl ve většině případů patrný. Jehnědy zůstaly zkrácené a někdy i spirálovitě zkroutené. Zrání prašníků v takovýchto jehnědách bylo nepravidelné a v pokusech v roce 1960 velká část prašníků nedozrála a pyl v nich obsažený musel být získán jejich rozdrcením. Kolchicinované prašníky měly pylu podstatně méně než odpovídající kontroly. Stav PMC před započítáním pokusů byl zjištěn cytologicky. Většinou byly PMC v leptoteniím stadiu. Po aplikaci kolchicinu nastalo zdržení meiose, ale nebylo možno spolehlivě konstatovat C-meiosi, nebo C-mitosu v ostatních somatických pletivech. V některých případech se sice objevily shluky (chomáčky)



Obr. 1. — Variabilita velikosti pylových zrn z kolchicinovaných květenství. P 102–104 = jednotlivé pokusy, K = kontrola, měřeno vždy 300 pylových zrn.

Fig. 1. — Variability of pollen grain size from the colchicined flowers. P 102–104 = individual trials, K = check, measured always 300 pollen grains.

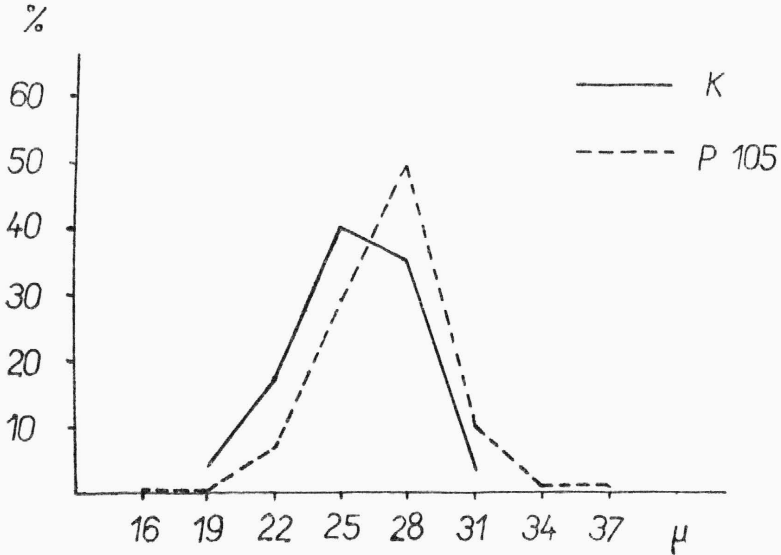
chromosomů v profázi, což by odpovídalo Dermenovu a Bainovu (1944) C-efektu, avšak takováto profáze byla nalezena i v kontrole i když méně často. Ve většině buněk však probíhala I. a II. anafáze. V pokusu P 26 byly vedle tetrad zjištěny také monády, podobně v P 68 byly monády s exinou a jedním jádrem na periferii. V pokusech P 106 a P 107 byla jádra po ukončeném homeotypickém dělení nestejně velikosti a nebyly vytvořeny přehrádky. Ovšem spolehlivě zjistit C-meiosi se nepodařilo. Variabilita velikostí pylu z kolchicinovaných květenství je patrná z grafů č. 1 a 2. V pokusech P 102, P 103 a P 104 bylo použito materiálu (květních větví) z výběrového stromu osiky Ostrovačice 004, působení kolchicinu ve vakuu. V pokusu P 105 to byly květní rostliny v květináčích, roubový materiál byl vzat ze stromu osiky Velký Domášov, kolchicin byl vpraven do dutiny květní stopky. Pouze pokus P 102 vykázal větší variační šíři, zatím co ostatní byly více méně shodné s kontrolou. Podobně nebylo možno spolehlivě zjistit účinek kolchicinu na EMC.

Pyl i vajíčka byla fertillní, neboť jimi bylo dosaženo kontrolovaného opylení. Méně úspěšné bylo dozrávání jehněd s embryi. Květní větve často jehnědy shazovaly, takže některé pokusy (zvláště v roce 1958) nebyly dokončeny. Semeno z květních větví dozrávalo velmi brzy. Bylo menší než semeno sbírané na stromech. Většina však na klíčidech dobře vyklíčila. Na vyklíčených rostlinkách byla dělána morfologická selekce a cytologická kontrola. Nebyla nalezena rostlina, která by se nápadně a svým vzrůstem odchylovala od normálních kontrolních rostlin. Také cytologická kontrola mohla konstatovat jen diploidní rostliny.

2. Indukce polyploidie na vegetačních vrcholech.

a) Kolchicinování semen ve vakuu.

Pokusy byly dělány v roce 1959 až 1960. V roce 1959 se semenem osiky a topolu černého, v roce 1960 také se semenem topolu bílého. Kolchicinovaná semena vyklíčela až do stadia vzpřímená rostlinka s rozloženými dělohami během asi 6 dnů, kontrola během dvou dnů. Koncentrace kolchicinu 1 a 0,1 % způsobovaly C-efekt (morfologický) prakticky 100%ní. V pokusech s koncentrací 0,01 % bylo rostlin s C-efektem méně než 5 %. Koncentrace 0,001 % byla bez účinku. Asi za 10 dnů se začaly u kolchicinovaných rostlinek vyvíjet první dva listy, u kontroly se vyvinuly za 6 dní. S vývojem prvních dvou listů nastala také diferenciacce mezi rostlinkami. U některých C-efekt trval, část rostlin však začala vytvářet normální pletiva. Asi po 30 dnech byla již diferenciacce normálních a polyploidních rostlin velmi zřetelná. První dva listy měly u pokusů s koncentrací kolchicinu 1 a 0,1 % tvar kopistovitý, druhé dva listy, které se po 30 dnech



Obr. 2. — Variabilita velikosti pylových zrn z kolchicinovaných květenství. P 105 = pokus, K = kontrola, měřeno vždy 300 pylových zrn.

Fig. 2. — Variability of pollen grain size from colchicined flowers. P 105 = trial, K = check, measured always 300 pollen grains.

začly vyvíjet, měly tvar nepravidelný, listy různě zastřižované. Část rostlin, která ještě zůstala ve stadiu rozevřených děloh (bez dalšího růstu) začala hynout, což se projevilo nekrotisací pletiva na vegetačním vrcholu. Většina rostlin však měla normální pletiva. Zde se již také projevilo vliv koncentrace a doby, po kterou semena botnala v roztoku kolchicinu va vakuu. Vývoj rostlin ze ze silnějších koncentrací byl zpožděnější (1 % oproti 0,1 %) a rovněž uvnitř jedné koncentrace při delší expozici ve vakuu byl vývoj zpožděnější. Koncentrace 0,01 a 0,001 % vyhlížely v té době stejně jako kontrola, byly již značně vzrostlé s vyvinutým pátým a šestým listem. Asi po 60 dnech byly kolchicinované rostliny a kontrolní přesazeny do paňniku. Při srovnání semeno ze dvou výběrových stromů osik (1959) byl vývoj polyploidních rostlin rovnoměrnější u osiky Ostrovačice 003 než Skalica 004. Také množství polyploidních rostlin bylo u Ostrovačické osiky větší.

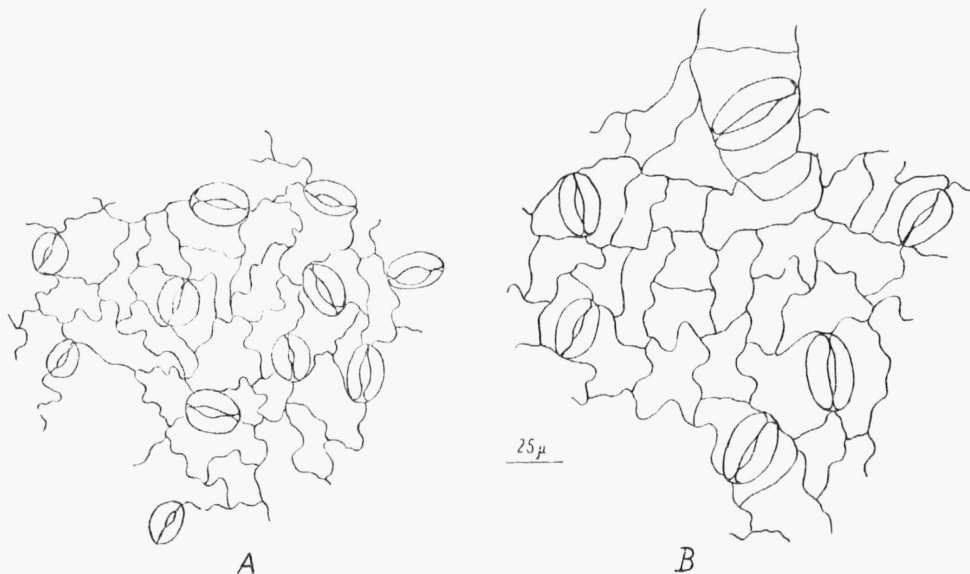
V roce 1959 bylo kolchicinováno semeno topolu černého. Vývoj rostlin s C-efektem byl zvláště u koncentrace 1 % velmi pomalý. U těchto rostlin se vůbec nevyvinul kořen, rostliny musely být stále chráněny pod poklopem. Většina těchto rostlin zahynula. U koncentrace 0,1 % bylo normálních rostlin asi 50 %, ostatní s C-efektem, se stejným způsobem vývoje jako u koncentrace 1 %. Do paňniku bylo přesazeno jen málo rostlin se znaky polyploidů, ty se však v průběhu vývoje ukázaly normální.

b) Kolchicinování vegetačních vrcholů ve vakuu.

Vyklíčené rostlinky ve stadiu rozevřených děloh (třetí den po vysetí) a 4., 5. a 6. den po vysetí máčeny svými vegetačními vrcholy v roztoku kolchicinu (0,1 a 0,01 %) ve vakuu. Ve 4. dni svého vývoje měly rostlinky znatelný základ prvních dvou listů. V 5. dni byly již první dva listy znatelné, 6. den měly tvar kornoutků. Po 10 dnech nebyl C-efekt ještě znatelný, později se projevil asymetrií čepelí listové.

c) Kolchicinování vegetačních vrcholů roztokem kolchicinu a smáčedla.

S pokusem bylo opět započato třetí den po vysetí, tj. ve stadiu rozevřených děloh, dále pak byl roztok kolchicinu + Adhesin kapán na vegetační vrcholy ve 4., 5., 6. a 7. dni vývoje. Kapáno bylo po dva dny za sebou 3 × denně. Asi po 10 dnech se projevil C-efekt nerovnoměrným růstem



Obr. 3. — A — Průduchy diploidní rostliny osiky. Semeno z výběrového stromu Ostrovačice 003. (Zvětšeno 650 ×.) — B — Průduchy polyploidní rostliny osiky (Ostrovačice 003). (Zvětšeno 650 ×.)

Fig. 3. — A — Stomata of the diploid aspen plant. Seed from plus tree Ostrovačice 003. — × 650. — B — Stomata of the polyploid aspen plant (Ostrovačice 003). — × 650

prvních dvou lístků, ale také účinek Adhesinu. Některé rostlinky začly hynout, dělohy byly ohnuté nazpět, někdy i listy. Při selekci v následujícím roce nebyla v tomto pokusu nalezena žádná polyploidní rostlina. Asi po 40 dnech byly rostliny z obou pokusů vysazeny do paňniku.

d) Opakovaná indukce na vegetačních vrcholech (rok 1960).

Semena osiky a topolu bílého botnala nejdříve v roztoku kolchicinu 0,1 % ve vakuu 9 mm Hg 20 minut. Pak byla vyseta na klíčoví. Klíčení a vývoj rostlinek přibližně stejný jako v obdobných pokusech v odst. a). Po 14 dnech měla kontrola první dva listy. Rostliny kolchicinované vykazovaly C-efekt buď na hypokotylu, který byl ztlustlý, nebo hypokotyl normální, ale C-efekt na prvních dvou listech. Po 20 dnech, kdy se u rostlinek s C-efektem vyvíjel třetí případně i čtvrtý list byl aplikován znovu roztok kolchicinu 0,1 % a smáčedlo Tw 0,02 %. Injekční stříkačkou byla nanášena kapka roztoku na vegetační vrchol, 3 × ve dvou dnech. Asi po 30 dnech byly rostlinky přesazeny do paňniku. e) Na klíčení rostlinky osiky a topolu bílého byl opětovně kapán roztok kolchicinu 0,1 % se smáčedlem Tw 0,02 %.

Rožtok byl kapán 1 až 2 × denně. Po prvé osmý den po vysetí semen. Rostlinky (osika a topol bílý) v té době měly rozestálé dělohy a patrně první dva listy. Poté bylo kapáno 9., 15., 16.,

22. a 25. den. V 15. dnu se u prvních dvou listů objevil C-efekt i když ne u všech. Ve 23. dnu pokusu se vyvíjel 4. list. Na listech byl patrný C-efekt: asymetrie a odchylný tvar listů oproti kontrole, tmavší zeleň, zakrslý vzrůst. Asi po 35 dnech byly rostliny přesazeny do paňniku.

3. Selektce autopolyploidních rostlin.

Po přesazení do paňniku vyvíjely se autopolyploidní rostliny velmi pomalu oproti rostlinám kontrolním. Charakteristickým znakem autopolyploidů bylo především utváření čepele listové. Listy byly zpravidla silnější, kožovité, nápadně pilovité až nepravidelně zastříhané, čepel často asymetrická. Také barva čepele listové byla zpravidla tmavší. Osa byla v některých případech nápadně silnější. Vzhledem k pomalému růstu a vývoji rostlin nebyla v tomto stadiu pokusu dělána cytologická kontrola. Vývoj mladých lístků na vrcholu byl velmi pomalý a jeho odebrání bylo často spojeno s nebezpečím, že bude spolu odříznut i vegetační vrchol. Proto byla udělána pouze selektce morfologická spojená s měřením průduchů. Popsaným morfologickým znakům odpovídaly zpravidla větší průduchy (listy odebírány od báze vzhůru). Průduchy kontrolních rostlin měly velikost v rozmezí 300–380 μ^2 , rostliny se znaky autopolyploidů 400–700 μ^2 .

Popsané morfologické odchylky odpovídají zřejmě rostlinám polyploidním. Podlé těchto odchylných typů byly vybrány rostliny, které byly vysazeny v následujícím roce ve školce v Přerově n. L. a na Baních. V průběhu růstu v druhém roce diferencovaly se v C_0 generaci určité morfologické typy, které se opakovaly ve všech pokusech (viz Tab. X).

Byly to zejména tyto typy (jedná se o osiku):

- falcata — listy srpovitě zahnuté, osy silné, průduchy velké
- crispa — čepel listová vlnovitě zprohýbaná až kadeřavá, ostře pilovitá, listy malé, osy slabé, průduchy velké
- grandifolia — listy velké, široce srdčité, 1 až 2 \times pilovité se zářezy hlubokými, osy silné, průduchy malé
- prunifolia — listy menší, čepel zpravidla asymetrická, tmavě zelená, osy silné, průduchy velké
- urticifolia — listy 1 až 2 \times pilovité, dlouhé
- nigra — listy tmavě zelené
- canescens — habitus *P. canescens*
- tremula — habitus *P. tremula*

Tyto typy byly zkoumány cytologicky a měřeny průduchy. Počet chromosomů nemohl být pro veliký počet a malou velikost stanoven vždy přesně. Zpravidla bylo počítáno blízko tetraploidnímu číslu ($4x = 76$). Vedle buněk tetraploidních se vyskytovaly v roztakových preparátech i buňky diploidní, což odpovídá předpokládané chimérické stavbě autopolyploidních rostlin. V několika případech byl zjištěn počet chromosomů mezi 50–56. To je počet blízký triploidnímu stavu. Zřejmě však šlo v těchto případech o buňky aneuploidní. Tetraploidní meta-anafáze se na první pohled lišily od diploidních svojí šířkou [viz mikrofotografie, Tab. XI¹⁾]. Podle frekvence polyploidů v jednotlivých typech, bylo možno tyto rozdělit do dvou skupin. Typy nigra, canescens a tremula byly většinou diploidní. V ostatních typech byly tetraploidní rostliny přítomny. U nejčastější se vyskytujících typů falcata, crispa a grandifolia bylo tetraploidních rostlin cytologicky zjištěno zpravidla okolo 50 %. Typ prunifolia se vyskytl pouze 3 \times . Z toho byly dvě rostliny kontrolovány cytologicky, obě byly tetraploidní.

Podle těchto polyploidních typů byly vybrány 263 rostliny ze kterých byla založena semenná plantáž. Autotetraploidní rostliny budou použity ke křížení s diploidními.

Rostliny topolu bílého i po opětovné indukci zůstaly vesměs diploidní.

D i s k u s e

Úspěšné byly pokusy získat rostliny autopolyploidní máčením semen v roztoku kolchicinu ve vakuu (koncentrace 1 a 0,1 %). Koncentrace 0,01 % způsobovala C-efekt asi v 5 % případů, koncentrace 0,001 % byla bez účinku.

¹⁾ Nesrovnalosti ve zvětšení mikrofotografií a kreseb chromosomů jsou způsobeny různým stářím materiálu a tudíž i různou velikostí buněk.

Během dalšího vývoje rostlin nastala diferenciacie v primárních histogenetických vrstvách a rostliny vytvářely buď normální, nebo polyploidní (chimérická) pletiva. Prakticky vznikala polyploidní pletiva pouze u koncentrací 1 a 0,1 %. Rostliny vyrostlé ze semen máčených v koncentraci 0,01 % vytvářely jen pletiva diploidní. Vznik různých morfologických typů byl zřejmě podmíněn různou chimérickou stavbou rostlin. DERMEN (1947) rozlišuje (za předpokladu tří primárních histogenetických vrstev) podle morfologických znaků celkem pět chimérických typů, jimž odpovídají určité kombinace ploidie v primárních histogenetických vrstvách. Podle této klasifikace odpovídá typ *crispa* (velké průduchy, malé listy, slabé osy) konstituci $4x-2x-2x$ primárních histogenetických vrstev (tetraploidní epidermis, ostatní pletiva diploidní). Typ *grandifolia* konstituci $2-4-4$, typ *prunifolia* pravděpodobně $4-4-4$. Typ *falcata* je nejspíše chimérou sektoriální nebo axiální. Jednotlivé typy vykazovaly mezi sebou více méně souvislé přechody. Tak zvláště typy *crispa* a *falcata* a *falcata* a *grandifolia*. Rovněž mezi kontrolními rostlinami a chimérickými typy byla řada přechodů.

Průduchy některých polyploidních rostlin byly větší než u kontrol. Ovšem průkazné rozdíly byly zjištěny i mezi rostlinami kontrolními. Srovnávány byly odpovídající si listy bazální a apikální. Vzhledem k předpokládané chimérické stavbě rostlin však velikost průduchů nemůže být rozhodujícím faktorem při selekci. Podobně i cytologická kontrola roztlakovými preparáty bazí listových při sektoriálních a axiálních chimérách může dát klamné výsledky. Proto při selekci byly vybrány všechny rostliny těch typů, ve kterých byly polyploidní rostliny zjištěny.

Při indukci polyploidie na vegetačních vrcholech jevíly genomy použitých druhů (*Populus tremula*, *P. alba* a *P. nigra*) rozdílnou reaktivitu. Největší měly osiky, zatím co u topolu bílého a topolu černého nebyla získána žádná tetraploidní rostlina. U topolu černého většina rostlin z kolchicinovaných semen zahynula. Nejvíce polyploidních rostlin a také nejstálejších vznikalo z materiálu sebraném na výběrovém stromě osiky Ostrovačice 003.

S o u h r n

Ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti ve Zbraslavi-Strnadedech byla dělána řada pokusů indukce polyploidie u gametů a na vegetačních vrcholech osiky, topolu bílého, topolu šedého a topolu černého. Cílem těchto pokusů bylo získání auto(allo)-triploidních a autotetraploidních rostlin.

1. Při aplikaci roztoků kolchicinu na květenství v době těsně před meiosis nebyla zjištěna inhibice I. nebo II. anafáze. Ve velké většině kolchicinovaných květenství se vytvořily v prašníkách tetrády.

2. Na kolchicinovaných květenstvích byl patrný morfologický C-efekt, osy květenství byly ztlustlé, jejich prodlužovací růst byl brzděn. Také jejich vývoj byl zpožděný a prašníky obsahovaly málo pylu.

3. Křížením pomocí makro- a mikrospór z kolchicinovaných květenství s normálními bylo získáno potomstvo vesměs diploidní.

4. Z metod použitých při indukci polyploidie na vegetačních vrcholech byly nejúčinnější metody, při kterých bylo použito vakua.

5. Autotetraploidní rostliny byly získány pouze u osiky, nikoliv u topolu bílého a topolu černého.

6. V C_0 generaci se objevila řada morfologických typů, které se opakovaly. Uvnitř typů odehlných od typu tremula, byly zastoupeny rostliny tetraploidní.

7. Průduchy autotetraploidních rostlin byly v některých případech podstatně větší než průduchy rostlin kontrolních (diploidních). U některých tetraploidních rostlin však průduchy svou velikostí odpovídaly průduchům rostlin diploidních. Tento fakt jakož i vznik řady morfologických typů lze vysvětlit chimérickou stavbou rostlin.

8. Při selekci autotetraploidních rostlin vzniklých umělou indukci, je nutno uplatnit všechny tři aspekty kontroly, a to jak cytologický, tak měření velikosti průduchů a konečně morfologický.

Literatura

- BRAAK, J. P. and ZEILINGA, A. E. (1957): Production of a colchicine-induced tetraploid asparagus. — *Euphytica* 6 : 201—212.
- BLAKESLEE, A. F., BERGNER, A. D., SATINA, A. and SINNOTT, E. W. (1939): Induction of periclinal chimeras in *Datura stramonium* by colchicine treatment. — *Science* 89 : 402.
- DERMEN, H. (1938): A cytological analysis of polyploidy induced by colchicine and by extreme temperatures. — *J. Hered.* 29 : 211—229.
- DERMEN, H. (1940): Colchicine polyploidy and technique. — *Bot. Rev.* 6 : 599—635.
- DERMEN, H. (1945): The mechanism of colchicine — induced cytological changes in cranberry. — *Am. Jour. Bot.* 32 : 387—394.
- DERMEN, H. (1947): Periclinal cytochimeras and histogenesis in cranberry. — *Am. Jour. Bot.* 34 : 32—43.
- DERMEN, H. (1951): Ontogeny of tissues in stem and leaf of cytochimeral apples. — *Am. Jour. Bot.* 38 : 753—760.
- DERMEN, H. (1952): Polyploidy in the apple. — *J. Hered.* 43 : 7—8.
- DERMEN, H. (1953): Periclinal cytochimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach. — *Am. Jour. Bot.* 40 : 154—168.
- DERMEN, H. and BAIN, H. F. (1944): A general cytological study of colchicine polyploidy in cranberry. — *Am. Jour. Bot.* 31 : 451—463.
- EIGSTI, O. J. (1957): Induced polyploidy. — *Am. Jour. Bot.* 44 : 272—279.
- ILLIES, Z. M. (1956): Veränderungen der Pollengröße bei Lärche nach Blütenbehandlung mit Colchicin. — *Ztschr. Forstgen. u. Forstpflanzenzüchtung* 5 : 112—115.
- JOHNSSON, H. (1942): Cytological studies of triploid progenies of *Populus tremula*. — *Hereditas* 28 : 306—312.
- JOHNSSON, H. (1954a): The triploid progeny of the cross diploid \times tetraploid *Populus tremula*. — *Hereditas* 31 : 411—440.
- LEVAN, A. (1938): The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. — *Hereditas* 24 : 471—486.
- LEVAN, A. (1942): The macroscopic colchicine effect a hormonal action. — *Hereditas* 28 : 244.
- MACKEVIČ, N. V. (1959): Eksperimentalnaja poliploidija u *Populus tremula* L. — *DAN SSSR* 126 : 183—186.
- MELANDER, Y. (1938): A new giant *Populus tremula* in Norbotten. — *Hereditas* 24 : 189—194.
- MÜNTZING, A. (1935/36): The chromosomes of a giant *Populus tremula*. — *Hereditas* 21 : 383—393.
- NILSSON-EHLE, H. (1935/36): Über eine in der Natur gefundene Gigasform von *Populus tremula*. — *Hereditas* 21 : 379—382.
- OLDÉN, E. J. (1954): Giant pollen grains in fruit trees from colchicine treatment in vacuum. — *Hereditas* 40 : 526—528.
- SATINA, S., BLAKESLEE, A. F. and AVERY, A. G. (1940): Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. — *Am. Jour. Bot.* 27 : 895—905.
- TOMETORP, G. (1937): The chromosome numbers of new giant *Populus tremula*. — *Bot. Notiser, Lund*, s. 285—290.

Experimental Induced Polyploidy in poplars

The author carried out in the Forestry and Game Management Research Institute in Zbraslav-Strnady a series of trials on the induction of polyploidy of gametes and on vegetative shoot apex of the aspen (*Populus tremula* L.), Grey poplar (*P. canescens* Sm.), White poplar (*P. alba* L.) and Black poplar (*P. nigra* L.). The studies were designed to provide auto(allo)-triploid plants and autotetraploid plants.

For obtaining unreduced gametes, male and female flowers were treated shortly before meiosis with a solution of colchicine. Flowers were either put for a certain time in colchicine solution or the solution was dropped or the diffusion in tissue was used. The concentrations 0,01 up 1 % of colchicine were used. The scales and hairs of catkins were removed before the treatment. Cytological control was carried out before the starting and ending of trials. In no case the author found that the colchicine blocked the I. anaphase. Most cases recorded normal tetrads in anthers. In a few cases diads and monads were found. After controlled crossing and ripening, seeds were sown. Neither the morphologic nor the cytologic control of plants — showed the triploid ones.

Autotetraploid plants were mainly gained by the method of seed swelling in vacuum. Further method was the soaking of small seedlings by their vegetative shoot apices in vacuum and dropping of colchicine solution on seedling vegetative shoot apex. Also these trials used a series of colchicine concentrations (0,001 up 1 %) and various time expositions. Seed swelling in colchicine solution in vacuum (5–8 mm Hg) in concentration of 0,1 and 1 % gave the starting morphological C effect practically in a value of 100 %. Later, during the development, plants began to be differentiated into normal and polyploid ones. Polyploid plants showed notably reduced development, thicker hypocotyl and axis, asymmetrical formation of leaf, conspicuous dentate leaves etc. These anomalies manifest themselves also in the larger stomata. To the end of the growing season these characters serve as basis for the first selection of the autopolyploid plants. The second selection was carried out in the following year. Plants showed a series of morphological types (different from tremula) which occurred repeatedly. Cytological investigations revealed that to the morphological types correspond tetraploid or chimerical plants with tetraploid tissues. Selection of chimerical tetraploids not only on the cytological basis but also in the morphological and anatomical basis (size of stomata) was carried out with respect to the supposed chimerical structure of plants.

From the species used only aspen gave tetraploids plants. White poplar showed after starting C-effect a return of somatic tissue back into diploid one. Black poplar showed also C-effect after the colchicine treatment, but tissue of these plants displayed later necrosis and most plants died.

Selected polyploid plants of aspen were planted into the seed orchard and will be later used for crossing in order to obtain triploid plants.

Vysvětlivky k tabulím — Explanation of plates

Tab. X. A — Polyploidní chimérická rostlina osiky — typ falcata.

Aspen chimerical polyploid — falcata type.

B — Polyploidní chimérická rostlina osiky — typ grandifolia.

Aspen chimerical polyploid — grandifolia type.

C — Normální diploidní rostliny osiky.

Normal diploid aspen plants.

Tab. XI: 1 — Diploidní somatická metafáze. Roztlakový preparát buňky z pletiva listové báze osiky (zvětšeno 2100×).

2 — Diploidní metafáze ze strany (zvětšeno 2280×).

3 — Tetraploidní somatická metafáze (zvětšeno 2100×).

4 — Tetraploidní metafáze ze strany (zvětšeno 2280×).

1 — Diploid somatic plate. Squash preparation of aspen leaf base. — ×2100.

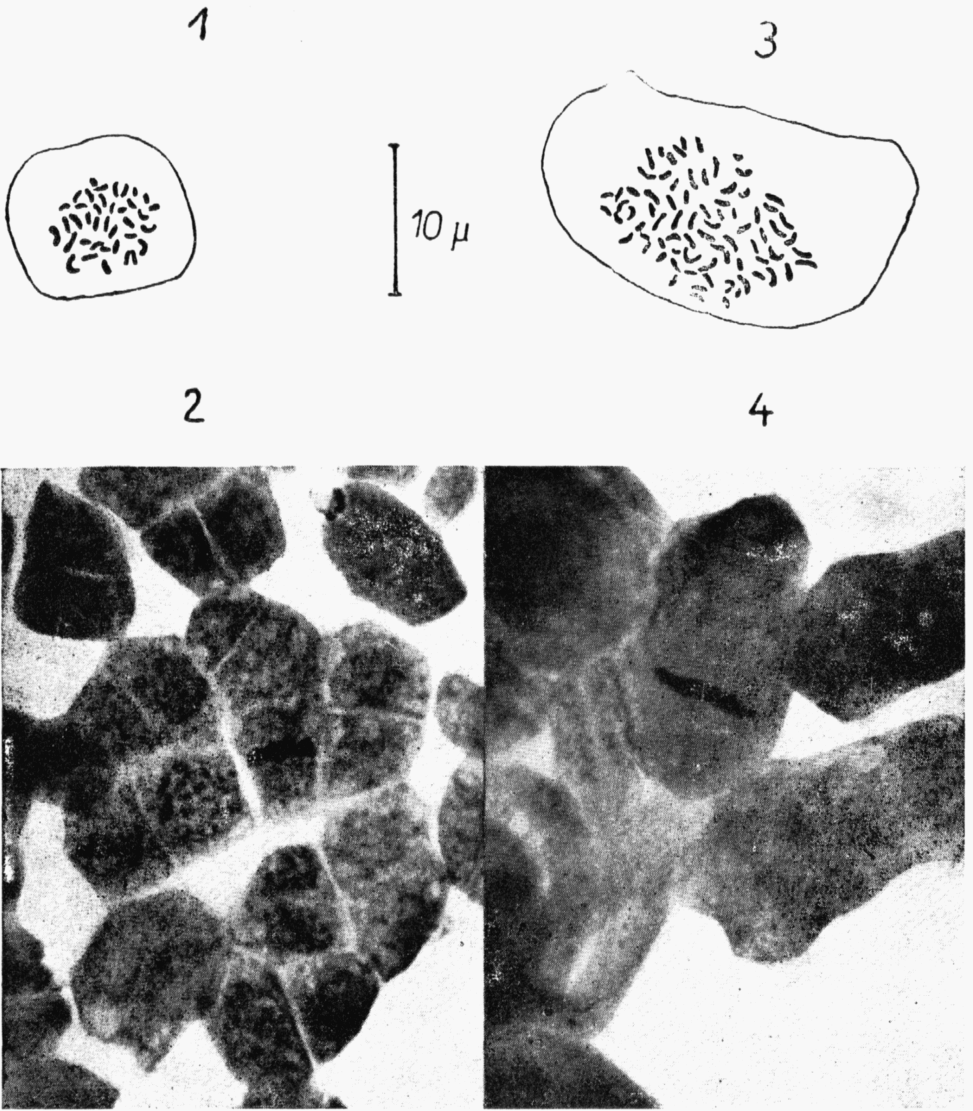
2 — Diploid metaphase from side view. — ×2280.

3 — Tetraploid somatic plate. ×2100.

4 — Tetraploid metaphase from side view. — ×2280.



K. Pešina: Umělná indukce polyploidie u topolů



K. Peš i n a: Umělá indukce polyploidie u topolů