

REPRODUKCE SINOKVĚTU CHRPOVITÉHO (*JURINEA CYANOIDES* (L.) Rchb.) V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

IN VITRO REPRODUCTION OF *JURINEA CYANOIDES* (L.) Rchb.

HELENA CVRČKOVÁ - JANA MALÁ - PAVLÍNA MÁCHOVÁ

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady

ABSTRACT

Protocol for *in vitro* propagation of critically endangered species *Jurinea cyanoides* (L.) Rchb. in the Czech Republic was established. The explant cultures were derived from vegetative shoots and seeds of endangered donor plants growing in open vegetation on the sandy dune in the isolated locality near Tišice in the Central Bohemia. The present number of these species individuals is so low that their natural reproduction is not guaranteed. *In vitro* cultivation is recognized as one of the important tools in the *ex situ* conservation. The induction of organogenesis and multiplication was successful on the modified MS medium (MURASHIGE, SKOOG 1962) with the concentration of substances 0.2 or 0.5 mg.l⁻¹ of BAP and 0.1 mg.l⁻¹ of IBA, 200 mg.l⁻¹ of glutamine, 200 mg.l⁻¹ of casein hydrolysate, 2 mg.l⁻¹ of glycine, 30 g.l⁻¹ of sucrose, 6 g.l⁻¹ of agar, pH adjusted to 5.8. Rooting of microcuttings was reached on the 1/3 concentration of basal MS with enhanced concentration of auxin 3 mg.l⁻¹ of IBA. The aim of this study was to initiate *in vitro* cultures to obtain large numbers of regenerated plantlets without disturbing the natural population. The preservation program was running in the cooperation with the Agency of Nature Protection.

Klíčová slova: sinokvět chrpovitý, kriticky ohrožený druh, reprodukce *in vitro*, organogeneze

Key words: *Jurinea cyanoides*, critically endangered species, reproduction *in vitro*, organogenesis

ÚVOD

S rostoucí civilizační zátěží klesá počet živočišných i rostlinných druhů, na druhou stranu se vyvíjí úsilí o zachování vymírajících jedinců a hledají se opatření pro jejich přežití a namnožení. Jedním z ohrožených rostlinných druhů je i sinokvět chrpovitý *Jurinea cyanoides* (L.) Rchb., který je na území České republiky silně ustupujícím druhem. Ochrana ohrožených druhů rostlin je právně zakotvena v zákoně o ochraně přírody a krajiny (zákon č. 114/92 Sb.) a příslušná vyhláška MŽP 395/1992 Sb. stanovuje ve třech kategoriích výčet chráněných druhů. Sinokvět chrpovitý je zařazen do nejohroženější kategorie mezi kriticky ohrožené druhy. Z botanického hlediska se jedná o vytrvalou bylinu, patřící do čeledě hvězdnicovitých, s výškou od 25 cm do 60 cm, s dlouhým vřetenovitým nebo křulovitým, málo větveným kořenem, sahajícím do hloubky až 2 m a vytvářejícím podzemní výběžky. Lodyhy jsou přímé, jednoduché nebo chudě větvené, podélně rýhované. Přízemní listy jsou dlouze řapíkaté, čepel je přenosečná s 5 – 6 páry čárkovitých úkrojků, na líci řídce pavučinatá, na rubu šedobíle plstnatá, dolní lodyžní listy jsou podobného tvaru, horní často jen s 1 – 2 páry úkrojků nebo celistvé. Úbory jsou kulovité, o velikosti 2 – 3 cm v průměru, jednotlivé na konci lodyhy. Květy mají červenofialovou korunu a plody jsou žltobíle ochmýřené nažky. Roste na výslunných písčinatech v místech s nezapojeným až velmi chudým porostem bylin. Souvisle je rozšířen v oblasti Běloruska, Ukrajiny, jihu Sibíře až po Altaj. V Evropě jsou to pouze izolované lokality reliktního charakteru. Ještě koncem 19. století se v České republice vyskytovaly

početné populace na písčinatech středního Polabí, především na Nymbursku. Ústup tohoto druhu je však pozorován již od 30. let minulého století. Ubývání tohoto druhu souvisí též s omezenou možností generativního rozmnožování, z důvodů malého množství životaschopných semen, poškozování květů a semen fytofágním hmyzem a nevhodnými podmínkami pro klíčení. Vegetativní rozmnožování podzemními výběžky je v posledních letech pravděpodobně jediný způsob reprodukce (KUBÁT 2004). HRČKA (2008) uvádí, že opakovaně je ověřována pouze jediná lokalita v přírodní památce Písčina u Tišic, kde přežívá v izolované populaci pouze několik rostlin (obr. 1).

Z důvodu neustálého poklesu zbývajících rostlin byl pro tento druh vypracován speciální záchranný program. Jedním z možných způsobů záchrany ohroženého druhu je jeho zachování v podmínkách *in vitro*. Práce se zaměřila na studium biotechnologických postupů mikropropagace sinokvětu chrpovitého od založení primární kultury po získání kompletní zakořeněné rostliny. Formou explantátových kultur lze konzervovat genové zdroje a odvozené výpěstky mohou sloužit jako výchozí reprodukční materiál pro zpětnou introdukci do jejich původních ekosystémů. Pro založení množitelé populace *in vitro* byla z mikropropagačních postupů zvolena metoda organogeneze, která byla ověřena při reprodukci cenných populací listnatých dřevin (MALÁ et al. 1999), ohrožených bylin, např. hořce jarního (MALÁ et al. 2003a) nebo nízkého keře lýkovec vonného (MALÁ, BYLINSKÝ 2004). Při organogenezi vznikají orgány nebo jejich soubory, nevzniká však bezprostředně celistvá rostlina. Zajištěním vhodných kultivačních pod-



Obr. 1.
Sinokvět chrpovitý (*Jurinea cyanooides* (L.) Rchb.) na lokalitě Písčina u Tišic (foto J. Dostál)
Fig. 1.
Jurinea cyanooides (L.) Rchb. in the locality Písčina near Tišice (photo J. Dostál)

mínek – nejdůležitější je složení a poměr fytohormonů – se indukuje regenerace axilárních nebo adventivních pupenů, které prorůstají ve výhony. Abychom získali kompletní rostlinu, musíme určitým postupem nechat výhony zakořenit (PROCHÁZKA et al. 1998). Namnožení explantátových kultur probíhá v tzv. multiplikační fázi a je především ovlivněné nutričními a hormonálními podmínkami kultivace. U některých druhů jsou tyto podmínky stejné jako při zakládání primárních kultur, u jiných je nutná pasáž na média jiného složení. Optimalizací kultivačních podmínek, především vhodným poměrem fytohormonů, lze dosáhnout vysokého množitelského koeficientu výhonů.

Cílem této práce bylo založit *in vitro* kultury z kriticky ohrožených rostlin sinokvětu chrpovitého pro posílení stávající populace, jejíž existence je vzhledem k omezené možnosti přirozeného rozmnožování a negativního dopadu nepříznivých vlivů okolí silně ohrožena. Významnou předností mikropropagací je, že při zakládání explantátových kultur se vychází z malého množství rostlinného materiálu a nedochází k poškozování přírodní populace.

MATERIÁL A METODIKA

Pro založení explantátových kultur byly odebrány v jarním období ze čtyř různých rostlin po jednom kusu vegetační výhony asi 4 cm dlouhé a na konci léta (srpen) semena (10 ks). Výhony byly sterilizovány v dezinfekčních prostředcích 10% Sekusept[®]forte (Farmak joint company, CR) 5 minut a v 1% NaClO (Savo, Bochemie CR) 10 minut, následně byly třikrát promyty ve sterilizované destilované vodě. Semena byla sterilizována v přípravku Bacillol[®]plus (Bode Chemie Hamburg) 5 minut a 1% NaClO (Savo, Bochemie CR) 15 minut, poté také třikrát promyta ve sterilizované destilované vodě. Takto ošetře-

né výhony a semena byly umístěny na agarové živné médium (50 ml média v Erlenmeyerově 100ml baňce). K indukci organogeneze byly testovány základní komponenty kultivačních médií MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) a WPM (LLOYD, McCOWN 1981) doplněné 30 g.l⁻¹ sacharózou, 6 g.l⁻¹ agarem, pH bylo upraveno na 5,8 a experimentálně byly odzkoušeny různé modifikace koncentrací cytokininu BAP, auxinu IBA, aminokyseliny glutaminu a bílkoviny hydrolyzát kaseinu. Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24 °C, 16hodinové světelné fotoperiodě, s osvětlením o intenzitě 30 μmol.m⁻².s⁻¹. Proliferace nasazených explantátů v prýty trvala přibližně 8 – 12 týdnů. Po úspěšném založení primárních kultur byly narostlé listové růžice přesazeny na multiplikační médium, které indukuje namnožení výhonů. Experimentálně se ověřovalo složení multiplikačního média, především koncentrace a poměr rostlinných hormonů, pro získání vyššího počtu explantátových kultur. Interval mezi pasážemi se pohyboval mezi 4 – 7 týdny. Kultivační podmínky (teplota, režim a intenzita osvětlení) při multiplikaci byly stejné jako při indukci organogeneze primárních explantátů. Vícevrcholové kultury byly použity pro kultivaci v explantátové bance a pro pokusy se zakořeňováním. Pro získání kompletních rostlin byly listové růžice přesazeny na agarové živné médium MS s třetinovou koncentrací mikroelementů a makroelementů, se sníženým obsahem sacharózy (10 g.l⁻¹), bez cytokininů a byly testovány zvýšené koncentrace auxinů (IBA – kyselina indolyl-3-máselná, NAA – α-naftyloctová kyselina). Kultury byly umístěny ve stejných kultivačních podmínkách jako při zakládání kultur a následně multiplikaci, pouze prvních 7 dní byly zakořeňované výhony umístěny ve tmě za účelem zvýšení procenta zakořenění. Poté byly rostliny přesazeny na médium stejného složení bez fytohormonů a vystaveny 16hodinové světelné fotoperiodě. Rostliny, u kterých se vytvořily kořínky, byly přesazeny do sadbovačů s perlitem a pravidelně dvakrát týdně zalévány bazálním médiem MS

Tab. 1.

 Efektivnost mikropropagace sinokvětu chrpovitého
 Efficiency of *Jurinae cyanoides* micropropagation

Odvozené linie/ Derived lines	Počet namnožených kultur po 4 měsí- cích kultivace/Number of propagated cultures after 4-months cultivation	Počet namnožených kultur po 16 měsí- cích kultivace/Number of propagated cultures after 16-months cultivation
S1	4	20
S2	5	22
S3	7	17
S4	6	17
S5	7	25

 Poznámka: Linie S1, S2, S3, S4 založeny z vegetativních výhonů, linie S5 založena ze semen (10ks)
 Note: Lines S1, S2, S3, S4 derived from vegetative shoots, line S5 derived from 10 seeds

Tab. 2.

 Vliv rozdílných koncentrací cytokininu BAP (6-benzylaminopurin) na multiplikaci sinokvětu chrpovitého
 Influence of different concentrations of cytokinin BAP (6-benzylaminopurine) on multiplication of *Jurinae cyanoides*

Odvozené linie/ Derived lines	Průměrný počet výhonů na kulturu ± SD na médiu s BAP 0,2 mg.l ⁻¹ /Avera- ge number of shoots per culture ± SD on medium with 0.2 mg.l ⁻¹ of BAP	Průměrný počet výhonů na kulturu ± SD na médiu s BAP 0,5 mg.l ⁻¹ /Avera- ge number of shoots per culture ± SD on medium with 0.5 mg.l ⁻¹ of BAP
S1	6,2 ± 2,4	4,6 ± 1,8
S2	5,8 ± 1,9	4,4 ± 1,9
S3	3,9 ± 1,7	4,8 ± 2,1
S4	4,2 ± 1,8	5,4 ± 1,9
S5	7,2 ± 2,6	4,4 ± 2,2

 Poznámka: Linie S1, S2, S3, S4 založeny z vegetativních výhonů, linie S5 založena ze semen (10ks)
 Note: Lines S1, S2, S3, S4 derived from vegetative shoots, line S5 derived from 10 seeds

ředěným 1 : 10 destilovanou vodou. Kultury byly v této fázi vývoje kultivovány při teplotě 20 °C, stálé intenzitě osvětlení 30 μmol.m⁻².s⁻¹ a z důvodu uchování vyšší vzdušné vlhkosti zakryty průhledným boxem. Po čtyřech týdnech byly kořenní rostliny přesazeny do nesterilního substrátu tvořeného směsí zeminy, rašeliny, perlitu a postupně aklimatizovány na 70% relativní vzdušnou vlhkost.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Zachování genových zdrojů mikropropagací bylo již úspěšně využito u řady ohrožených druhů rostlin i lesních dřevin (MALÁ et al. 2002, 2003b, 2005, 2007, 2009; MÁCHOVÁ et al. 2009, 2011; NOVOTNÝ et al. 2008) a získané explantátové kultury jsou uchovávány v bance explantátů Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Pro záchranu sinokvětu chrpovitého metodou *in vitro* byla použita metoda organogeneze a podařilo se založit 4 linie explantátových kultur z vegetativních výhonů, které byly označeny S1 až S4 a linii ze semen označenou S5. Úspěšnost namnožení kultur je znázorněna v tab. 1. Procento úspěšnosti zakládání kultur je velmi ovlivněno možností sterilizace primárních explantátů z důvodu různé citlivosti rostlinného materiálu ke sterilizační látce a zároveň stupněm odolnosti kontaminujících infekčních mikroorganismů (bakterie, plísně). Nedostatečná sterilizace výchozího rostlinného materiálu je nejčastější příčinou odumření výchozího explantátu. Další příčinou neúspěchu mohou být

odlišné nutriční a kultivační nároky různých druhů rostlin. Experimentálně bylo ověřeno, že pro indukci organogeneze u sinokvětu chrpovitého je nejvhodnější živné médium obsahující základní komponenty MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) média, ke kterému byly přidány cytokinin BAP 0,2 mg.l⁻¹, auxin IBA 0,1 mg.l⁻¹, glutamin 200 mg.l⁻¹, hydrolyzát kasein 200 mg.l⁻¹, glycin 2 mg.l⁻¹, sacharóza 30 g.l⁻¹, agar 6 g.l⁻¹; pH bylo upraveno na 5,8. Stabilizované explantátové kultury byly získány po 2 – 3 pasážích na čerstvá kultivační média. V multiplikační fázi se sledoval počet nových výhonů vytvořených během jedné pasáže, to je v rozmezí 6 – 7 týdnů a bylo ověřováno vhodné složení živného média pro získání vyššího počtu výhonů (tab. 2). U linií S1, S2 a kultur odvozených od semen označených S5 byl v průměru získán vyšší počet výhonů na médiu MS stejného složení jako při zakládání kultur, u linií S3 a S4 bylo získáno více výhonů na modifikovaném MS médiu při zvýšené koncentraci cytokininu BAP (6-benzylaminopurin) 0,5 mg.l⁻¹. Stabilizované multiplikuující se kultury jsou uloženy v klimatizované kultivační místnosti a pasážují se v průměru jednou za šest týdnů na čerstvá kultivační média, současně je sledován zdravotní stav explantátových kultur a výskyt kontaminací (obr. 2). Kvalita mikropropagovaného materiálu je kontrolována na základě morfologických znaků. U listů a výhonů se sledují barva, tvar, délka a počet. Namnožené výhony sinokvětu chrpovitého byly také využity k pokusům se zakořeňováním. Nejvyšší procento zakořeňovaných rostlin (40 %) se získalo na médiu MS s třetinovou koncentrací makroelementů i mikroelementů, se sníženým obsahem cukru 10 g.l⁻¹, obsahem glutaminu 2 mg.l⁻¹, glycinu 2 mg.l⁻¹, bez cytokininů a se zvýšeným obsahem auxi-



Obr. 2.
Multiplikace sinokvětu chrpovitého (foto J. Dostál)
Fig. 2.
Multiplication of *Jurinea cyanooides* (photo J. Dostál)

nu IBA (kyselina indolyl-3-máselná) v koncentraci 3 mg.l⁻¹. Pro reintrodukcii odvozených rostlin probíhají pokusy s aklimatizací a jejich převodem do venkovních podmínek.

Z dostupné literatury není známo, že by sinokvět chrpovitý byl reprodukován mikropropagací v ČR nebo i v zahraničí. Postupy mikropropagace byly zpracovány pro některé druhy rostlin totožného rodu nebo ze stejné čeledě a nejčastěji se u nich osvědčily základní komponenty média MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) obdobně jako u sinokvětu chrpovitého. Například pro řebříček tužebníkový (*Achillea filipendulina* cv. 'Parker') bylo nejlepšími výsledky dosaženo na modifikovaném médiu MS s rostlinnými hormony IAA 1 mg.l⁻¹, BA 2 mg.l⁻¹ a s 16hodinovou světelnou fotoperiodou (EVENOR, REUVENI 2004). Metoda organogeneze na modifikovaném MS médiu byla též uplatněna u pelyňku černobýlu (*Artemisia vulgaris* L.) pro namnožení vyselektovaných klonů pro léčebné účely (SUJATHA, KUMARI 2007). Autoři DHAKA, KOTHARI (2005) uvádí v protokolu pro hromadnou mikropropagaci léčivé rostliny eklipty bílé (*Eclipta alba* (L.) HASSK) jako optimální živné médium pro proliferaci výhonů rovněž MS médium, s cytokininem benzylaminopurinem (BAP) o koncentraci 1 mg.l⁻¹.

Problematiku mikropropagace sinokvětu – *Jurinea albicaulis* subsp. *kilaea*, druhu rostoucího v oblasti písčiny dun na bulharském pobřeží Černého moře, řešili autoři PANAYOTOVA et al. (2008) v rámci záchranného programu zachování ohrožených druhů rostlin. Kultury byly založeny ze semen a kultivace nejlépe probíhala opět na MS médiu s přidáním rostlinných hormonů BAP 1 mg.l⁻¹ a NAA 0,5 mg.l⁻¹, tj. za použití vyšších koncentrací hormonů a odlišného auxinu než bylo optimalizováno v našich podmínkách pro sinokvět chrpovitý.

ZÁVĚR

Pro sinokvět chrpovitý byly vypracovány biotechnologické postupy mikropropagace. Kultivace v podmínkách *in vitro* představuje jednu z možností dlouhodobého udržení biodiverzity genových zdrojů rostlin a dřevin. Sinokvět chrpovitý je zařazený do kategorie kriticky ohrožených druhů rostlin a jeho výskyt v několika jedincích je monitorován už pouze na lokalitě ve středním Polabí poblíž obce Tišice. Záchrana tohoto druhu probíhala ve spolupráci s Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR v rámci záchranného programu. Explantátové kultury se podařilo založit ze semen i vegetativních částí výhonků a jako nejvhodnější živné médium pro multiplikaci sinokvětu se osvědčilo MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) médium s přidáním rostlinných hormonů cytokininu BAP v koncentracích 0,2 mg.l⁻¹ nebo 0,5 mg.l⁻¹ a auxinu IBA v koncentraci 0,1 mg.l⁻¹. Kultury jsou kultivovány v bance explantátů a napěstované rostliny z *in vitro* kultur budou sloužit k dalším studijním účelům, např. testování genetické stability, vitality a podmínek aklimatizace při převodu do venkovních podmínek.

Poděkování:

Poznátky byly získány v souvislosti s řešením výzkumného záměru MZE0002070203.

LITERATURA

- DHAKA N., KOTHARI S. L. 2005. Micropropagation of *Eclipta alba* (L.) HASSK – an important medicinal plant. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 11: 658-661.
- EVENOR D., REUVENI M. 2004. Micropropagation of *Achillea filipendulina* cv. 'Parker'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 91-93.
- HRČKA D. 2008. Píščina u Tuhaně. *Ochrana přírody*, 63 (2): 9-11.
- KUBÁT K. 2004. *Jurinea*. CASS. – sinokvět. In: Slavík B., Štěpánková J. (eds.): Květena České republiky. 7. Praha, Academia: 373-376.
- LLOYD G., McCOWN H. B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings, International Plant. Propagators' Society*, 30: 421-427.
- MÁCHOVÁ P., MALÁ J., CVRČKOVÁ H., DOSTÁL J. 2009. Optimalizace mikropropagace jeřábu břeku. *Zprávy lesnického výzkumu*, 54: 218-222.
- MÁCHOVÁ P., MALÁ J., CVRČKOVÁ H. 2011. Biotechnologické postupy při záchraně kriticky ohroženého druhu hořce jarního (*Gentiana verna* L.). *Zprávy lesnického výzkumu*, 56: 38-42.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., ŠÍMA P. 1999. Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 44 (4):6-10.
- MALÁ J., CVIKROVÁ M., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., MARTINCOVÁ J. 2002. Reprodukce ohrožených populací třešně ptačí (*Prunus avium*) *in vitro*. *Zprávy lesnického výzkumu*, 47 (1): 5-8.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., KIRSCHNEROVÁ L. 2003a. Micropropagation of critically endangered *Gentiana verna* L. by explant cultures. *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae*, 20: 89-93.
- MALÁ J., ČÍŽEK V., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L. 2003b. Effective use of micropropagation processes for aspen reproduction. *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae*, 20: 83-87.
- MALÁ J., BYLINSKÝ V. 2004. Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. *Biologia plantarum*, 48: 633-639.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L. 2005. Využití mikropropagace pro reprodukci genových zdrojů vybraných ušlechtilých listnatých dřevin (*Malus sylvestris*, *Pyrus pyraeaster*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* a *Prunus avium*). *Zprávy lesnického výzkumu*, 50: 219-224.
- MALÁ J., CVIKROVÁ M., CHALUPA V. 2007. Micropropagation of mature trees of *Ulmus glabra*, *Ulmus minor* and *Ulmus laevis*. In: Jain S. M., Häggman H. (eds.): *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht, Springer: 237-246.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., KIRSCHNEROVÁ L. 2009. Mikropropagace hořce jarního (*Gentiana verna* L.). Recenzovaná metodika. Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti: 16 s. Lesnický průvodce 11/29.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- NOVOTNÝ P., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., MALÁ J. 2008. Množení tisů červeného (*Taxus baccata* L.) *in vitro* jako možný příspěvek k záchraně a reprodukci genetických zdrojů této dřeviny v ČR. *Zprávy lesnického výzkumu*, 53: 110-115.
- PANAYOTOVA L. G., IVANOVA T. A., BOGDANOVA Y. Y., GUSSEV CH. V., STANILOVA M. I., BOSSEVA Y. ZH., STOIEVA T. D. 2008. *In vitro* cultivation of plant species from sandy dunes along the Bulgarian Black Sea coast. *Phytologia Balcanica*, 14 (1): 119-123.
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J. 1998. Fyziologie rostlin. Praha, Academia: 484 s.
- SUJATHA G., KUMARI B. D. R. 2007. Effect of phytohormones on micropropagation of *Artemisia vulgaris* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29:189-195.

Použité zkratky:

BAP – 6-benzylaminopurin

BA – benzyl adenin

IBA – kyselina indolyl-3-máselná

IAA – kyselina indolyl-3-octová

NAA – α -naftyloctová kyselina

NaClO – chlornan sodný

In vitro* REPRODUCTION OF *Jurinea cyanoides* (L.) Rchb.*SUMMARY**

Micropropagation protocol was developed for *Jurinea cyanoides*, the critically endangered species in the Czech Republic. *J. cyanoides* is the perennial plant of the family *Asteraceae* growing to a height of 25 – 60 cm. The straight stem is largely formed with lateral shoots and taproot runs over 2 m length. The leaves are lanceolate or liny. This plant produces flowers of 2 – 3 cm in diameter from July to September. *J. cyanoides* is Eurasian continental plant and in the Middle Europe occurs only in several isolated localities. Several individuals can be found in the open vegetation on the sandy dune in the locality near Tišice in the Central Bohemia (Fig.1). In this study, induction of organogenesis, multiplication, rooting was developed for establishing explant cultures of this species of plant. The vegetative shoots and seeds from the endangered donor were sampled in the spring or in the autumn. The sterilized shoots and seeds for induction of organogenesis were tested on the modified MS medium (MURASHIGE, SKOOG 1962) and on the modified WPM medium (LLOYD, MCCOWN 1981). The cultures were cultivated in the acclimatized conditions at 24 °C and for 16h photoperiod by the white fluorescent light (30 nmol.m⁻².s⁻¹). The induction of organogenesis was successful on the modified MS medium (MURASHIGE, SKOOG 1962) with the concentration of substances 0.2 mg.l⁻¹ of BAP and 0.1 mg.l⁻¹ of IBA, 200 mg.l⁻¹ of glutamine, 200 mg.l⁻¹ of casein hydrolysate, 2 mg.l⁻¹ of glycine, 30 g.l⁻¹ of sucrose, 6 g.l⁻¹ of agar, pH adjusted to 5.8. Efficiency of *Jurinea cyanoides* micropropagation after 4 months and 16 months of cultivation is described in Tab. 1. Multiplication of adventive shoots was reached on the medium of the same composition as for organogenesis induction with lines S1, S2, S5. Line S3, S4 reached more shoots with increased concentration of BAP 0.5 mg.l⁻¹ (Tab. 2, Fig. 2). Multiplied shoots were used for subsequent multiplications or for rooting experiments. For rooting the shoots were transferred on the 1/3 concentration of basal MS medium without cytokinins and with the enhanced concentration of auxins. We tested different concentrations of auxins IBA and NAA. Rooting was done under same cultivation conditions like organogenesis induction and multiplication. The shoots rooted in the lower concentration (1/3) of basal agar MS medium with the increased concentration of auxin IBA (3 mg.l⁻¹) with 40% success. The rooted cultures were transplanted into perlite and watered by the basal MS medium without phytohormones and sucrose diluted by distilled water 1 : 10. The cultures were cultivated in the constant cultivation conditions at 20 °C under 24h white fluorescent light (30 nmol.m⁻².s⁻¹). After four weeks the plantlets were transplanted into the non-sterile substrate (mix of compost, peat, perlite) and gradually adapted and acclimatized for outplanting. Micropropagated cultures of *Jurinea cyanoides* are maintained in the Bank of Explants of the Forestry and Game Management Research Institute for reintroduction of these plant species.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i
Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Česká republika
tel.: 257 892 268; e-mail: cvrckova@vulhm.cz