

## BIOTECHNOLOGICKÉ POSTUPY PŘI ZÁCHRANĚ KRITICKY OHROŽENÉHO DRUHU - HOŘCE JARNÍHO (*GENTIANA VERNA* L.)

### BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN THE PROTECTION OF CRITICALLY ENDANGERED SPECIES *GENTIANA VERNA* L.

PAVLÍNA MÁCHOVÁ - JANA MALÁ - HELENA CVRČKOVÁ  
 Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady

#### ABSTRACT

The growth of axillary shoots was initiated on vegetative shoots, excised from aseptically grown plants of critically endangered *Gentiana verna*. Optimal cultivation media for organogenesis induction, multiplication and rooting were established. The induction of organogenesis on vegetative shoots was successful on the WPM medium with low concentration of cytokinin BAP (0.2 mg l<sup>-1</sup>). The multiplication of primary explants was achieved on medium MS with concentration BAP (0.2 mg l<sup>-1</sup>) and IBA (0.1 mg l<sup>-1</sup>). Propagated shoots rooted in the half concentration of basal MS medium without cytokinins and with higher concentration of IBA (0.5 mg l<sup>-1</sup>). In this condition 70 – 75 % of rooting rate of microcuttings was reached. The mortality during acclimatization was not over 40%.

**Klíčová slova:** hořec jarní, organogeneze, zakořeňování, aklimatizace

**Key words:** *Gentiana verna* L., organogenesis, rooting, acclimatization

**Použité zkratky:** BAP – benzylaminopurin, IBA – kyselina β-indolylmásečná, NAA – kyselina α-naftyloctová, 2iP – 6 – (γ, γ – Dimethylallylamino)purine, WPM – woody plant medium (LLOYD, McCOWN 1981), MS – Murashige Skoog medium (MURASHIGE, SKOOG 1962)

#### ÚVOD

Hořec jarní (*Gentiana verna*, L.) se na přelomu 19. a 20. století vyskytoval v České republice na cca 60 lokalitách, dnes je tento druh na okraji vyhynutí (SLAVÍK et al. 2000). V současné době roste pouze na 3 lokalitách. Populace nížinné formy (dealpin) hořce jarního, která se již téměř neobnovuje přirozenou cestou, se nachází v NPP Rovná na Strakonicku a dvě o něco větší populace horské formy hořce jarního rostou v Malé kotlině a Velké kotlině v CHKO Jeseníky (KIRSCHNEROVÁ et al. 2008). Ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. byla ověřována možnost reprodukce populace nížinné formy hořce jarního metodami *in vitro*. Mikropropagační postupy *in vitro* (klonové množení v explantátových kulturách) jsou stále častěji používány jako alternativně možný způsob reprodukce ohrožených druhů rostlin. Představují vhodnou technologii pro konzervaci ohrožených genotypů i rychlé získání dostatečného množství klonového sádebního materiálu pro případnou repatriaci ohrožených druhů rostlin na původní stanoviště. Pro získání rostlin k reintrodukcí na původní stanoviště byla vypracována metoda organogeneze, tj. indukce adventivních nebo axilárních výhonů na primárním explantátu, jejich množení, zakořeňování a dopěstování kompletních rostlin.

#### MATERIÁL A METODY

##### Rostlinný materiál

Vegetativní výhony dlouhé cca 1 cm byly odebírány v jarních a podzimních termínech (květen, září – listopad) v letech 1998 až 2007. Výhony byly sterilizovány 5 min v 10% Sekuseptu® forte (Farmak, a. s., ČR), 10 minut v 1% SAVO (Bochemie, a. s., ČR) a třikrát promyty ve sterilní destilované vodě. Jako výchozí materiál pro založení explantátových kultur byla použita i semena hořce jarního, u nichž proběhla sterilizace 10 min v 1% SAVO, a poté byla třikrát promyta ve sterilní destilované vodě.

##### Indukce organogeneze

Pro indukci organogeneze se použily 2 typy modifikovaných médií: 6% agarové (Dr. Kulich Pharma, s. r. o, ČR) modifikované médium WPM (LLOYD, McCOWN 1981) doplněné o 200 mg.l<sup>-1</sup> glutaminu, 200 mg.l<sup>-1</sup> kaseinového hydrolyzátu, 30 g.l<sup>-1</sup> sacharózy, 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IBA a 6% agarové modifikované médium MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) doplněné o 200 mg.l<sup>-1</sup> glutaminu, 200 mg.l<sup>-1</sup> kaseinového hydrolyzátu, 30 g.l<sup>-1</sup> sacharózy, 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IBA. Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách při 24 °C a 16hodinové osvitové periodě bílým fluorescenčním světlem (30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

### Multiplikace výhonů

Po 4 týdnech byly výhony přesazeny na multiplikační médium. Pro multiplikaci proběhlo testování 6 typů živných agarových médií. Byly použity různé kombinace růstových látek, jejich koncentrací a základních médií (tab. 1). Bylo provedeno testování dvou druhů agaru (AK – agar ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., AR – agar-agar, Carl Roth GmbH Co. KG). Multiplikace probíhala v klimatizovaných podmínkách při 24 °C a 16hodinové osvitové periodě bílým fluorescenčním světlem (30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Pasážování probíhalo ve 4 – 5týdenních intervalech (obr. 1).

### Zakořeňování

Pro zakořeňování byly výhony přesazeny na poloviční koncentrované základní agarové MS médium doplněné o 2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  glutaminu, 2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  glycinu a 10  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  sacharózy, bez přítomnosti cytokininů a s auxinem IBA v koncentraci 3  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . První fáze (7 dní) zakořeňování probíhala ve tmě při 24 °C. Druhá fáze probíhala na stejném médiu bez auxinu a za kultivačních podmínek aplikovaných ve fázi multiplikace (obr. 2).

### Aklimatizace

Zakořeněné kultury byly přesazeny do perlitu a jedenkrát denně zalévány bazálním médiem MS ředěným 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhala v konstantních kultivačních podmínkách při 20 °C a 24hodinovém osvětlení bílým fluorescenčním světlem (30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Po 21 dnech byly rostliny přesazeny do směsi perlitu a ne-sterilního zahradnického substrátu a poté přeneseny do skleníku, kde byly postupně adaptovány na 70% relativní vzdušnou vlhkost.

## VÝSLEDKY

### Indukce organogeneze

Indukovat organogenezi se podařilo u všech klonů odebraných v jarním (květen) i v podzimním (polovina září až polovina listopadu) termínu. Pro indukci organogeneze se osvědčilo modifikované médium WPM doplněné o 200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  glutaminu, 200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kaseinového hydrolyzátu, 30  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  sacharózy, 0,2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BAP a 0,1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  IBA. Vysterylizovaná semena vyklíčila s 5% úspěšností na modifikovaném médiu MS doplněném o 200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  glutaminu, 200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kaseinového hydrolyzátu, 30  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  sacharózy, 0,2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  BAP a 0,1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  IBA.



**Obr. 1.**  
Multiplikace hořce jarního  
Multiplication of *Gentiana verna*

**Tab. 1.**

Vliv rozdílných kultivačních médií na multiplikaci hořce jarního  
Effect of various media on multiplication of *Gentiana verna*

Základní médium/ Basal medium	Cytokinin ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )/ Cytokinin ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Prům. počet nově vytvořených výhonů na kulturu $\pm$ SD/ Average number of new shoots per culture $\pm$ SD
MS	BAP (0,2)	13,75 $\pm$ 6,76
MS	BAP (0,3)	0,5 $\pm$ 0,09
MS	BAP (0,5)	8,3 $\pm$ 3,21
MS	TDZ (3,3)	0,71 $\pm$ 0,15
MS	BAP (1,0) + TDZ (3,3)	1,75 $\pm$ 0,51
WPM	BAP (0,2)	6,2 $\pm$ 2,45

**Tab. 2.**

Efektivnost mikropropagace hořce jarního  
Efficiency of *Gentiana verna* micropropagation

Klon Clone	Počet primárních explantů/ Number of primary explants	Počet namnožených kultur po 8 měsících kultivace/ Number of propagated cultures after 8 months of cultivation
H1	4	57
H2	4	11
H3	3	18
H4	3	37
H5	4	21
H6	4	16
H7	2	14
H8	2	15
H9	2	22



**Obr. 2.**  
Indukce kořenů u explantátů hořce jarního  
Induction of roots in explants of *Gentiana verna*



**Obr. 3.**  
Výpěstek *in vitro* hořce jarního  
Plantlets of *Gentiana verna*

#### Multiplikace výhonů

Na základě experimentů bylo jako nejúčinnější vybráno médium MS doplněné o 200 mg.l<sup>-1</sup> glutaminu, 200 mg.l<sup>-1</sup> kaseinového hydrolyzátu, 30 g.l<sup>-1</sup> sacharózy, 0,2 mg.l<sup>-1</sup> BAP a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IBA. Jako vhodné ztužující agens byl vtipován agar AK (Dr. Kulich Pharma, s. r. o, ČR), při použití agaru AR nedocházelo k vytváření nových výhonů. U rychlosti multiplikace byla pozorována výrazná klonová závislost (tab. 2).

#### Zakořeňování a aklimatizace

Na polovičním koncentrovaném MS médiu bez přítomnosti cytokininů a se zvýšenou koncentrací auxinu IBA došlo v průběhu 2 až 4 týdnů k indukci kořenů u všech klonů. Úspěšnost zakořeňování dosahovala u jednotlivých klonů 70–75 %. Kompletní rostliny byly úspěšně aklimatizovány (obr. 3) a u všech klonů dosahovaly průměrné ztráty při aklimatizaci cca 40 %.

## DISKUSE A ZÁVĚR

Pro namnožení některých kriticky ohrožených druhů rostlin, např. lýkovec vonného lze úspěšně využít metodu mikropropagace (COHEN 1975, MALÁ et al. 2004). Mikropropagační technologie probíhající v kontrolovaných podmínkách umožňují vyloučení škodlivých faktorů, které v přírodě limitují přirozenou obnovu ohrožených druhů a současně zaručují i genetickou identitu množného materiálu (D'AMATO 1978). Neopomenutelnou výhodou mikropropagace je, že dárcovské rostliny nejsou vzhledem k malému množství odebraného materiálu ohroženy. Metoda mikropropagace byla u hořce jarního aplikována poprvé, a proto byly experimentálně ověřovány podmínky organogeneze, metody, která se osvědčuje pro reprodukci řady rostlin včetně listnatých dřevin (MALÁ et al. 2010). Mikropropagační metoda organogeneze byla u rodu *Gentiana* úspěšně využita k reprodukci i dalších ohrožených druhů, např. *Gentiana kurroo* (SHARMA et al. 1993), *G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea*, *G. acaulis* (MOMČILOVIČ et al. 1997). Pro indukci organogeneze se autorům osvědčilo použití vyšší koncentrace BAP ( $2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v kombinaci s IAA ( $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Podobně HOSOKAWA et al. (1996) použili vysoké koncentrace růstových regulátorů především cytokininů pro indukci organogeneze u různých typů explantátů u rodu *Gentiana*. Indukci organogeneze se však podařilo navodit i s použitím nižších koncentrací fytohormonů, např. u *Gentiana cruciata* se podařilo navodit organogenezi při použití  $0,1 - 2 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP nebo kinetinu v kombinaci s  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  NAA (BUTIUC-KEUL, DELIU 1999). Tato zjištění jsou v souladu i s našimi výsledky, kdy pro indukci organogeneze u druhu *Gentiana verna* postačovaly nízké koncentrace cytokininu BAP ( $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v kombinaci s auxinem IBA ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Při použití nízkých koncentrací fytohormonů se neprojevil již dříve popsáné (BOLLMARK et al. 1988) inhibiční účinky BAP na rhizogenezi. Tento inhibiční účinek u rodu *Gentiana* popsali BUTIUC-KEUL et al. (2005), kteří pozorovali negativní dopad vysoké koncentrace 2iP a zeatinu použitých k indukci organogeneze na schopnost kořeneň explantátů u *Gentiana punctata*.

Pro reprodukci kriticky ohroženého hořce jarního se k indukci organogeneze osvědčilo modifikované agarové WPM médium s koncentrací růstových látek  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP a  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA. V průběhu kultivace na indukčním médiu se na bázi primárních explantátů tvořily další adventivní výhony, které byly dále namnoženy pro založení explantátové banky a následně i pro zakořeňování. S ohledem na navazující zakořeňování explantátových kultur bylo pro multiplikaci použito modifikované médium MS s nižším obsahem cytokininu BAP. V průběhu let 1998 – 2009 bylo pro následnou aklimatizaci zakořeňováno cca 500 rostlin. Vývoj kořenového systému u rostlin byl vyrovnaný, výrazné rozdíly v délce a počtu kořenů se neprojevil. Po úspěšné aklimatizační fázi se podařilo dopěstovat cca 330 kompletních rostlin.

Při mikropropagaci hořce jarního se podařilo z vegetativních částí mateřských rostlin dopěstovat kompletní rostliny a založit explantátovou banku, ve které je v současné době od každého klonu uchováváno 5 vícevrcholových kultur. Dopěstované kompletní rostliny byly předávány k reintrodukcí na základě požadavků Agentury ochrany přírody a krajiny České republiky (AOPK ČR).

### Poděkování:

Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného záměru č. MZE0002070203.

## LITERATURA

- BOLLMARK M., KUBÁT B., ELIASSEN L. 1988. Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. *J. Plant Physiol.*, 132: 262-265.
- BUTIUC-KEUL A. L., DELIU C. 1999. Plant regeneration from nodal explant and callus of *Gentiana cruciata* L. In: Cachita-Cosma D., Ardelean A., Craciun C. (eds.): *In Vitro Cultures of Higher Plants*. Cluj-Napoca, Ed. Risoprint: 74-79.
- BUTIUC-KEUL A., SUTEU A., DELIU C. 2005. In vitro organogenesis of *Gentiana punctata*. *Not. Bot. Agrobot.*, 33: 38-40.
- COHEN D. 1975. Plant tissue culture – possible applications in the New Zealand Nursery Industry. *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.*, 25: 310-315.
- D'AMATO F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: Thorpe T. A. (ed.): *Frontiers of Plant Tissue Culture*, Int. Assoc. Plant Tissue Cult., University of Calgary, Alberta: 287-295.
- HOSOKAWA K., NAKANO M., OIKAWA Y., YAMAMURA S. 1996. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. *Plant Cell Rep.*, 15: 578-581.
- KIRSCHNEROVÁ L., KAVALCOVÁ V., KLAUDISOVÁ A. 2008. Záchraný program pro hořec jarní (*Gentiana verna* L. subsp. *verna*) v České republice. [http://www.nature.cz/publik\\_syst2/files146/zp\\_horec\\_jarni\\_bez\\_planu\\_pece.pdf](http://www.nature.cz/publik_syst2/files146/zp_horec_jarni_bez_planu_pece.pdf).
- LLOYD G., MCCOWN B. H. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc. Intern. Plant Propag. Soc.*, 30: 421-427.
- MALÁ J., BYLINSKÝ V. 2004. Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. *Biologia plantarum*, 48: 633-639.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., ŠÍMA P. 2010. Biotechnologie v lesním hospodářství a šlechtění. *Lesnická práce*, 8: 17-19.
- MOMČILOVIČ L., GRUBIŠIĆ D., NEŠKOVIC M. 1997. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 141-144.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- SHARMA N., CHANDEL K. P. S., PAUL A. 1993. In vitro propagation of *Gentiana kurroo* – an indigenous threatened plant of medicinal importance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 307-309.
- SLAVÍK B. et al. 2000. *Květena České republiky 6*. Praha, Academia: 108-109.

---

**BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN THE PROTECTION OF CRITICALLY ENDANGERED SPECIES  
(*GENTIANA VERNA* L.)****SUMMARY**

The *Gentiana verna* is one of the most endangered species in the Czech Republic. In this study, the induction of organogenesis, multiplication, rooting and acclimatization procedures are described. Vegetative shoots were sterilized in 10% Sekusept forte solution (Farmak, joint-stock company, CR) for 5 min, in 1% SAVO solution (Bochemie, joint-stock company, CR) for 10 min, and washed three times in sterile distilled water. The induction of organogenesis on vegetative shoots was successful on the 6% agar WPM medium with low concentration of cytokinin BAP (0.2 mg l<sup>-1</sup>), glutamine (200 mg l<sup>-1</sup>), casein hydrolyzate (200 mg l<sup>-1</sup>), sucrose (30 g l<sup>-1</sup>), and IBA (0.1 mg l<sup>-1</sup>) with pH adjusted to 5.8. We tested 6 types of multiplication media, the fast multiplication rate of explants was obtained on medium MS with concentration BAP (0.2 mg l<sup>-1</sup>), and IBA (0.1 mg l<sup>-1</sup>), glutamine (200 mg l<sup>-1</sup>), casein hydrolyzate (200 mg l<sup>-1</sup>), sucrose (30 g l<sup>-1</sup>). The half concentration of basal MS medium without cytokinins but with higher concentration of auxin IBA (3 mg l<sup>-1</sup>) was used for induction of rhizogenesis. The explants are cultured firstly in the dark (one week) at 24 °C and then cultivation continued on the same medium without auxin in air-conditioned room under 16hrs photoperiod of white fluorescent light (30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) at 24 °C. The roots appeared during 2 – 4 weeks. Propagated shoots of each clones rooted with 70 – 75% success. The mortality during acclimatization did not exceed 40%. At present, five multiapex cultures of each clone are stored in the explant bank of FGMRI.

Recenzováno

---

**ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:**

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