MIKROPROPAGACE JEŘÁBU OSKERUŠE (*SORBUS DOMESTICA* L.)

LESNICKÝ PRŮVODCE

RNDr. JANA MALÁ, CSc.
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.
Ing. JAROSLAV DOSTÁL

Certifikovaná metodika

4/2011

MIKROPROPAGACE JEŘÁBU OSKERUŠE (*SORBUS DOMESTICA* L.)

Certifikovaná metodika

RNDr. Jana Malá, CSc.
Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.
Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.
Ing. Jaroslav Dostál

Strnady 2011

Lesnický průvodce 4/2011

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště
http://www.vulhm.cz

Vedoucí redaktorka: Šárka Holzbachová, DiS.; e-mail: holzbachova@vulhm.cz
Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz
Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-047-8
ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION OF SERVICE TREE (*SORBUS DOMESTICA* L.)

Abstract

Service tree (*Sorbus domestica* L.) is one of a scarce species among forest trees and occurs in scattered populations at low density in Central Europe. Methods of clonal propagation on the base of micropropagation technology were proved to be useful for its preservation. Described procedures for regeneration of explants up to plantlets were standardized, and reproductive plant material was acquired for consequent plant breeding and reintroduction. Difficulties occurring during rooting stage of organogenesis were solved using exploitation of new different aromatic cytokinin MeoBAP (6-(3-methoxybenzylamino)purine-9-β-D-ribofuranoside). Technological criteria for explant culturing and for complete plant regeneration were determined.

Key words: service tree, micropropagation, organogenesis, plant regeneration

Oponenti: Ing. Lada Krnáčová, Ministerstvo zemědělství, Praha 1
Ing. Josef Cafourek, Ph.D., Wotan Forest, a. s.

Adresa autorů:

RNDr. Jana Malá, CSc., mala@vulhm.cz
Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., cvrckova@vulhm.cz.
Ing. Pavlína Máchová, Ph.D., machova@vulhm.cz
Ing. Jaroslav Dostál, dostal@vulhm.cz

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136
Jíloviště 252 02

Obsah:

1 Cíl metodiky 7

2 Vlastní popis metodiky 7

2.1 Úvod 7

2.2 Standardizovaný metodický postup mikropropagace 8

2.2.1 Zakládání primárních kultur 8

2.2.2 Kultivační podmínky multiplikace 9

2.2.3 Zakořeňování a aklimatizace 10

2.2.4 Výsadba na venkovní plochy 11

2.2.5 Hodnocení růstu výpěstků *in vitro* 12

3 Srovnání novosti postupů 13

4 Popis uplatnění metodiky 13

5 Dedikace 14

6 Literatura 14

6.1 Seznam použité související literatury 14

6.2 Seznam publikací, které předcházely metodice 15

Summary 16

1 CÍL METODIKY

Cílem metodiky mikropropagace jeřábu oskeruše je efektivně reprodukovat cenné klony nebo význačné stromy z hlediska kvality plodů, ale i produkce a kvality dřeva.

2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Úvod

Jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica* L.) se řadí mezi vzácné druhy lesních dřevin. Do střední Evropy se rozšířil pravděpodobně z jižní Evropy a Malé Asie. Dřevina je od pradávna pěstována a její původní areál je nejistý. Roste roztroušeně v nejteplejších oblastech České republiky, je výrazně teplomilným a světlomilným druhem, snáší vysýchavé, živinami dobře zásobené půdy obvykle na bazickém podloží. Roztroušeně se vyskytuje místy v Českém Středohoří a na jižní Moravě často soliterně v zemědělské krajině, ale i v lesních porostech. Vysazuje se často na vinicích a zahradách jako ovocná dřevina. Jedná se o pomalu rostoucí strom, který může dosáhnout výšky 10 – 25 m. Oskeruše je ceněna pro tvrdé, houževnaté dřevo, vhodné zejména na dýhy. Plody jsou využívány jako ovoce, mimo jiné i k výrobě ceněné pálenky (Fér 1994).

Zejména v oblasti jižní Moravy se vyskytují velmi staré stromy s výjimečnými vlastnostmi, ať už z pohledu morfologie, produkce dřeva nebo kvality plodů (Benedíková, Prudič 2000). Pro zachování genomu těchto nadprůměrných jedinců, kteří byli často vybráni i jako rodičovské stromy a klony, byly vypracovány postupy reprodukce jak generativní, tak heterovegetativní, tj. roubování (Benedíková 2009). Velmi efektivní metodou reprodukce dospělých stromů jeřábu oskeruše se ukázala vegetativní metoda reprodukce *in vitro* (mikropropagace), kterou lze rychle a ekonomicky výhodně namnožit kvalitní sadební materiál z vybraných klonů a zároveň dlouhodobě uchovávat genové zdroje v bance explantátů pro další využití, např. při zakládání klonových archivů (směsí klonů), semenných sadů, pro studium genetické variability, k reintrodukci apod. Velkou výhodou mikropropagačních postupů je možnost namnožení neomezeného počtu identických jedinců z vybraného donorového jedince v relativně krátkém časovém období, přičemž množství odebíraného rostlinného materiálu pro založení primárních kultur (většinou meristematická pletiva zimních pupenů) je minimální a rodičovský strom nepoškozuje.

Pro rychlou *in vitro* reprodukci jeřábu oskeruše se podobně jako pro jiné listnaté dřeviny (Dujíčková et al. 1991) osvědčila organogeneze. Metoda indukce organogeneze je podmíněna vypracováním technologických postupů, které umožňují navození indukce orgánů (výhonů) na primárním explantátu, následně jejich zakořenění (mikrořízkování) a posléze aklimatizaci kompletní rostliny (výpěstku *in vitro*). Základními mechanismy uplatňujícími se při růstových pochodech jsou dereprese meristémů axilárních pupenů nebo reorganizace meristémů a růst adventivních pupenů. Pro mikropropagaci je nezbytné zajištění vhodných kultivačních podmínek (chemické složení živného média, teplota, vlhkost a osvitový režim). Významně ovlivňují úspěšnost organogeneze i takové faktory jako je stáří a fyziologický stav dárcovského jedince, doba sběru, způsob a délka skladování zdrojového materiálu, povrchová sterilizace a technika preparace explantátů. Dodržením ověřených metodických postupů lze však dosáhnout efektivní reprodukce požadovaných genotypů. V České republice byla metoda *in vitro* využita při reprodukci ohrožených a cenných populací jeřábu oskeruše pro založení archivu explantátů a zavedení poloprovozní metody mikropropagace tohoto druhu. Byly vypracovány standardní postupy pro dopěstování kompletních rostlin a získán reprodukční materiál, který je využitelný pro další šlechtitelské záměry a reintrodukci .

2.2 Standardizovaný metodický postup mikropropagace

2.2.1 Zakládání primárních kultur

V únoru až březnu ještě před vyrašením pupenů se odebírají rouby z donorových jedinců (cca 50 pupenů od 1 klonu). Označí se, vloží se do mikrotenového sáčku a na převoz uskladní do chladové tašky. Rouby se uchovávají při 4 °C a je vhodné zpracovat rostlinný materiál (pupeny) do 14 dnů po odběru. Sníží se tím riziko šíření infekcí a poškození apikálního meristému.

Jednotlivé pupeny se sterilizují v 1% roztoku chlornanu sodného (Savo, Bochemie ČR) a třikrát promyjí sterilní destilovanou vodou. Ve sterilním prostředí laminárních boxů se odstraní vnější šupiny pupenů a extirpované vzrostné vrcholy jsou umístěny na indukční agarové živné médium (50 ml média v Erlenmeyerově 100ml baňce). K indukci organogeneze u jeřábu oskeruše se používá modifikované médium MS (Murashige, Skoog 1962) s koncentrací fytohormonů BAP 0,2 mg.l^{-1}

a IBA 0,1 mg.l^{-1} a s koncentrací glutaminu a kaseinového hydrolyzátu 200 mg.l^{-1}, sacharóza v koncentraci 30 g.l^{-1}, agar 6 g.l^{-1}, pH se upravuje na hodnotu 5,8. Kultivace probíhá v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24 °C, 16hodinové světelné fotoperiodě, s osvětlením o intenzitě 30 µmol.m^{-2}.s^{-1}. Indukce axilárních případně adventivních pupenů na primárním explantátů trvá přibližně 4 – 6 týdnů.

2.2.2 Kultivační podmínky multiplikace

Po vyrašení axilárních, případně adventivních pupenů na primárním explantátu jsou kultury *in vitro* jeřábu oskeruše pěstovány na multiplikačním médiu MS s koncentrací BAP 0,5 mg.l^{-1}, IBA 0,1 mg.l^{-1}, glutamin 100 mg.l^{-1}, glycin 2 mg.l^{-1}, sacharóza 30 g.l^{-1}, agar 6 g.l^{-1}, pH je upravováno na hodnotu 5,8. Intervaly mezi jednotlivými pasážemi jsou 4 až 5 týdnů. Pro kultivaci jsou nezbytné konstantní kultivační podmínky (teplota 24 °C, osvětlení o intenzitě 30 µmol.m^{-2}.s^{-1}, 16hodinová světelná

Obr. 1. Vícevrcholová kultura jeřábu oskeruše

fotoperioda) a 100% relativní vzdušná vlhkost. Průběžně je nutné sledovat zdravotní stav kultur, resp. výskyt kontaminací. Kvalita mikropropagovaného materiálu je kontrolována na základě morfologických znaků. U listů a výhonů se sledují barva, tvar, délka a jejich počet.

2.2.3 Zakořeňování a aklimatizace

Vícevrcholové kultury (obr. 1), určené pro odběr mikrořízků za účelem dopěstování kompletních rostlin, se standardně přesazují na MS médium s koncentrací MeoBAP 0,2 mg.l^{-1}, IBA 0,1 mg.l^{-1}, glutamin 100 mg.l^{-1}, sacharóza 30 g.l^{-1}, agar 6 g.l^{-1}, pH je upravováno na hodnotu 5,8. Po dvou pasážích jsou z kultur odebrány mikrořízky, které zakořeňují dvoufázově v agarovém médiu MS o třetinové koncentraci makro a mikroelementů. V první fázi je do agarového média přidán auxin NAA (14 mg.l^{-1}) a pro zvýšení účinnosti probíhá zakořeňování (7 dní) ve tmě. Následně jsou mikrořízky přeneseny do agarového média stejného složení (MS, třetinová koncentrace makro a mikroelementů) bez suplementace fytohormony. Zakořeňování již v této fázi probíhá na světle za stejných kultivačních podmínek jako multiplikace. První kořeny se objevují v závislosti na klonu v průběhu 4 – 6 týdnů u 70 – 80 % mikrořízků v závislosti na klonu.

Rostliny s vyvinutými kořeny se přesazují ze zakořeňovacího média do sadbovačů Quick Pot T 35 s agroperlitem (Perlit Praha, s. r. o.) a dvakrát týdně se zalévají tekutým základním médiem MS (bez fytohormonů a sacharózy) ředěným v poměru 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhá v obdobných kultivačních podmínkách (teplota 24 °C, osvětlení o intenzitě 30 μmol.m^{-2}.s^{-1} 24hodinová světelná fotoperioda) a při 90% relativní vzdušné vlhkosti.

Po třech týdnech v agroperlitu se rostliny přesazují do sadbovačů Quick Pot T 60 (rozměr 350 mm × 215 mm × 200 mm, s 15 buňkami) s nesterilním pěstebním substrátem ze směsi zeminy (Zahradnický substrát, a. s., Soběslav), rašeliny (Rašelina, a. s., Soběslav) a perlitu (Perlit Praha, s. r. o.) v poměru 2 : 1 : 1 a přenášejí se do skleníku, kde se postupně adaptují (3 – 4 týdny) na 70% relativní vzdušnou vlhkost. Pro růst v agroperlitu i pěstebním substrátu se osvědčily sadbovače Quick Pot firmy HERKUPLAST – KUBERN GmbH, které nebrání rozvoji kvalitního kořenového systému. Jejich předností je, že nemají pevné dno a kořenový systém rostlin se může dobře vyvíjet na vzduchovém polštáři. Dalšími výhodami jsou rozměry a kónický tvar sadbovačů, které jsou vhodné pro růst kosterních kořenů, a dále rozmístění vertikálních žeber na vnitřní straně sadbovačů, které napomáhají správnému vývoji kořenů. Tento postup a použití biologicky ověřených sadbovačů zabraňuje nežádoucím odchylkám růstu a nepřípustné deformaci kořenů ve smyslu platné ČSN 48 2115 (obr. 2).

2.2.4 Výsadba na venkovní plochy

Po aklimatizaci se výpěstky *in vitro* vysazují k dopěstování na venkovní záhony, případně se přesadí do vhodných obalů, které umožňují správný růst kořenového systému, viz Katalog biologicky ověřených obalů (www.vulhmop.cz). Po roce dopěstování na venkovním záhonu lze výpěstky *in vitro* jeřábu oskeruše vysadit na určené stanoviště.

Obr. 2. Zakořeněný mikrořízek jeřábu oskeruše s dobře vyvinutým kořenovým systémem

2.2.5 Hodnocení růstu výpěstků *in vitro*

Výpěstky *in vitro* musí splňovat kritéria kvality výsadbového materiálu. Z těchto důvodů byla provedena evaluace růstových a morfologických parametrů výpěstků *in vitro* před výsadbou i následně po výsadbě na venkovní plochy vzhledem ke standardům ČSN pro generativní sazenice dřevin s obdobným růstem.

Po roce pěstování na venkovním záhonu dosahují výpěstky *in vitro* jeřábu oskeruše průměrné výšky 62,4 ± 10,8 cm a tloušťky kořenového krčku 1,2 ± 0,4 cm, což odpovídá velikosti poloodrostků a lze je vysazovat na stanoviště (obr. 3). Další růst výpěstků *in vitro* na stanovišti byl sledován na demostračním objektu Kluky (Jihočeské pánve PLO 15, Lesy města Písku, s. r. o.). Výsledky desetiletého hodnocení sazenic prokazují, že mikropropagované rostliny nevykazují retardace růstu. V průměru dosahují stromy výšky 466,7 ± 79,2 cm a výčetní tloušťky 45,5 ± 15,8 mm.

Vysvětlivky:
BAP – 6-benzylaminopurine; MeoBAP – 6-(3-methoxybenzylamino)purine; MS – Murashige Skoog medium; IBA – β-indolylbutyric acid; NAA – α-naphtylacetic acid

Obr. 3. Výpěstky *in vitro* jeřábu oskeruše na venkovním záhonu

3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost mikropropagačních postupů spočívá ve využití metody indukce organogeneze *in vitro* pro reprodukci dospělých stromů jeřábu oskeruše, v originálním využití nového derivátu cytokininu a v originálním řešení zakořeňování a aklimatizace.

Navození indukce organogeneze na primárním explantátu (vzrostný vrchol dormantního pupene) lze u jeřábu oskeruše provést poměrně snadno a téměř se stoprocentní úspěšností i u dospělých a velmi starých jedinců, podobně jako u dalších listnatých dřevin (Malá et al. 1999). Efektivnímu využití této mikropropagační metody pro reprodukci jeřábu oskeruše bránilo nízké procento (cca 30 %) zakořenění mikrořízků a velmi dlouhá doba indukce kořenů (6 – 8 týdnů) (Malá et al. 2005; Nikolaou et al. 2008; Ďurkovič, Mišalová 2009). Předpokládali jsme, že podobně, jako např. u jeřábu břeku, by mohlo bránit indukci kořenů nahromadění metabolitů BAP, který je nejčastěji používaným a účinným cytokininem k indukci organogeneze. Metodický postup byl proto inovován využitím nového derivátu cytokininu MeoBAP, při jehož aplikaci v multiplikační fázi nevznikají glykozidy zabraňující indukci rhizogeneze (Malá et al. 2009).

Na základě experimentálního ověření vlivu cytokininů BAP a MeoBAP na multiplikaci explantátů a na následné zakořeňování mikrořízků jeřábu oskeruše byl vypracován protokol, který zvyšuje účinnost zakořeňování mikrořízků jeřábu oskeruše na 70 – 80 %.

Byly vypracovány standardní technologické postupy, které zaručují, že výpěstky *in vitro* splňují kritéria kvality výsadbového materiálu podle ČSN pro generativní sazenice dřevin s obdobným růstem.

4 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

V současné době se podařilo metodou organogeneze namnožit a reprodukovat 80 převážně rodičovských stromů jeřábu oskeruše. Namnožené klony jsou dlouhodobě uchovávány v bance explantátů. Jedná se o stromy výjimečných vlastností (stáří, morfologie, produkce dřeva, kvalita plodů) zejména z PLO 35 Jihomoravské úvaly, PLO 36 Středomoravské Karpaty a PLO 38 Bílé Karpaty a Vizovické vrchy. Metodika byla již v roce 2006 poloprovozně ověřena v Biotechnologické laboratoři školky Olešná (v té době zařízení Jihočeských lesů, a. s.). Podařilo se namnožit řádově

10 tisíc kusů sazenic, které byly vysázeny převážně na zemědělské půdě. Na pracovišti Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. byly dopěstovány výsadby schopné výpěstky *in vitro*, které byly využity jednak k výsadbě na demonstračních objektech, a jednak na základě požadavků vlastníků lesa (např. Městské lesy Zlín) k výsadbě biokoridorů. Pro využití na lesní půdě splňuje sadební materiál vypěstovaný metodami *in vitro* legislativní požadavky platné pro vegetativně množený materiál (viz. § 29 lesního zákona č. 289/1995 Sb.; § 7 – § 11 Vyhl. MZe č. 29/2004 Sb.).

Uvedená metodika se především uplatní při zachování a reprodukci cenných genotypů jeřábu oskeruše dlouhodobě přizpůsobených místním přírodním podmínkám.

5 DEDIKACE

Vypracování metodiky bylo podporováno výzkumným projektem:
č. MZE 0002070203.

6 LITERATURA

6.1 Seznam použité související literatury

Benedíková M., Prudič Z. 2000. Inventarizace jeřábu oskeruše v Moravských Karpatech. Lesnická práce, 7: 304-305.

Benedíková M. 2009. Metodické postupy množení a pěstování jeřábu oskeruše (*Sorbus domestica* L.). VÚLHM. Lesnický průvodce, 3/2009: 16 s.

Ďurkovič J., Mišalová A. 2009. Wood formation during *ex vitro* acclimatisation in micropropagated true service tree (*Sorbus domestica* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96: 343-348.

Fér F. 1994. Lesnická dendrologie. 2. část. Listnaté stromy hospodářsky významné. Praha, VŠZ: 162 s.

Nikolaou P., Zagas D., Scaltsoyiannes V., Balas E., Xilogianni V., Tsoulpha P., Tsaktsira M., Voulgaridou E., Iliev I., Triantafyllou K., Scaltsoyiannes A. 2008. Advances in the micropropagation of service tree (*Sorbus domestica* L.). Propagation of Ornamental Plants, 8: 154-157.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

6.2 Seznam publikací, které předcházely metodice

Dujíčková M., Malá J., Chalupa V. 1991. Vegetativní množení *Sorbus torminalis* L. Grantz a *Sorbus domestica* L. *in vitro*. Práce VÚLHM, 77: 27-48.

Malá J., Cvrčková H., Máchová P., Šíma P. 1999. Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých lesních dřevin. Zprávy lesnického výzkumu, 44 (4): 6-10.

Malá J., Máchová P., Cvrčková H., Čížkov, L. 2005. Využití mikropropagace pro reprodukci genových zdrojů vybraných ušlechtilých listnatých dřevin (*Malus sylvestris*, *Pyrus pyraster*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* a *Prunus avium*). Zprávy lesnického výzkumu, 4: 219 –224.

Malá J., Máchová P., Cvrčková H., Karády M., Novák O., Strnad M., Doležal K. 2009. Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. Journal of Plant Growth Regulation, 28: 341-348.

MICROPROPAGATION OF SERVICE TREE (*SORBUS DOMESTICA* L.)

Summary

Service tree (*Sorbus domestica* L.) is one of a scarce species among forest trees and occurs in scattered populations at low density in Central Europe. For long-term sustainability of service tree genetic resources, micropropagation technologies could prove to be useful. Micropropagation represents the effective and economically advantageous technology enabling the reproduction of services tree planting material derived from selected elite parents and also the preservation gene resources in the explant bank for further use. The organogenesis is regarded as the most advantageous technology that proved suitable for clonal propagation of particularly broad-leaved trees.

The modified agar medium MS (Murashige, Skoog 1962) with concentrations of phytohormones BAP 0.2 mg.l^{-1} and IBA 0.1 mg.l^{-1}, 200 mg.l^{-1} of glutamine and casein hydrolyzate, 30 g.l^{-1} of saccharose, and 6 g.l^{-1} of agar, pH adjusted to 5.8 was used for induction of service tree organogenesis. After 4 – 6 weeks, the cultures were transferred onto the multiplication MS medium with concentrations of phytohormones BAP 0.5 mg.l^{-1}, and IBA 0.1 mg.l^{-1}, 100 mg.l^{-1} of glutamine, 2 mg.l^{-1} of glycine, 30 g.l^{-1} of saccharose, and 6 g.l^{-1} of agar, pH adjusted to 5.8. The cultures were transferred every 4 – 5 weeks. Cultivation proceeded in air-conditioned room at 24 °C, and under white fluorescent light (30 μmol.m^{-2}.s^{-1}) and a 16 hrs photoperiod.

The cultures set up for rooting were transferred on MS medium with concentration of phytohormone MeoBAP 0.2 mg.l^{-1}, and IBA 0.1 mg.l^{-1}, 100 mg.l^{-1} of glutamine, 2 mg.l^{-1} of glycine, 30 g.l^{-1} of saccharose, and 6 g.l^{-1} of agar, pH adjusted to 5.8.

Microcuttings after 2 passage in agar medium with MeoBAP were rooted in agar medium MS diluted 1:3, with NAA 14 mg.l^{-1}, 10 g.l^{-1} of saccharose and 6 g.l^{-1} of agar. The cultures grown first 7 days in the darkness for accelerating of root growth and than were transferred into same cultivation conditions as during induction and multiplication, onto hormone – free medium. Plants with well-developed roots were transferred from rooting medium into pots (Quick Pot T 35) with agroperlit and watered by basal MS medium without phytohormones and saccharose diluted by distilled water 1:10. Acclimatization proceeded under same conditions like induction and multiplication at the 90% of relative air humidity. After 3 weeks, the plants were transferred into pots (Quick Pot T 60) with non-sterile substrate (in relations 2 soil : 1 peat : 1 agroperlit) and located in glasshouse, where they were adapted for 3 – 4 weeks to the 70% of relative air humidity. Acclimatized plants were planted

onto outdoor beds. Optimal time for outdoor culturing plants of services tree before outplanting on the forest stands was 1 year.

Disposal of planting material from *in vitro* cultivation in forest breeding practice is under legislature for vegetative propagated plant material.

Described micropropagation technology was attested in pilot plant conditions in Biotechnology laboratory Olešná of Jihočeské lesy PLC.

LESNICKÝ PRŮVODCE

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
www.vulhm.cz