MIKROPROPAGACE LÝKOVCE VONNÉHO (*DAPHNE CNEORUM* L.)

LESNICKÝ PRŮVODCE

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

Certifikované METODIKY PRO PRAXI

Certifikovaná metodika

9/2013

Mikropropagace lýkovce vonného (*Daphne cneorum* L.)

Certifikovaná metodika

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

Strnady 2013

Lesnický průvodce 9/2013

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 978-80-7417-074-4
ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION OF ROSE DAPHNE (*DAPHNE CNEORUM* L.)

Abstract

The aim of this study was to verify the possibility of *in vitro* organogenesis for propagation of endangered rose daphne (*Daphne cneorum* L.), which occurs at two localities in the Czech Republic, the Holý Hill near Mělník and the Loděnice near Beroun. Induction of organogenesis from the winter buds and seeds of rose daphne was achieved on WPM medium with a low concentration of cytokinin BAP (0.2 $mg.l^{-1}$) and auxin IBA (0.1 $mg.l^{-1}$). During multiplication stage on the same medium, multiapex cultures have formed from one shoot that had 20.2±5.3 (Holý Hill) and 38.3±12.2 (Loděnice) shoots. The shoots were used for further micropropagation. Rooting cultures were transferred into agar medium WPM with one-third concentration of macro- and microelements, and 2.83 $mg.l^{-1}$ of IBA. Rooting percentage varied depending on the clone, and reached about 50%. Losses during acclimatization amounted to 13% of rooted plantlets. Acclimated plantlets were successfully planted in outdoor conditions where without loss had survived the winter and bloomed in the spring.

Key words: micropropagation, organogenesis, *Daphne cneorum* L., plantlets

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

Adresa autorů:

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

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

www.vulhm.cz
e-mail: mala@vulhm.cz
cvrckova@vulhm.cz
dostal@vulhm.cz
machova@vulhm.cz

Obsah:

I. Cíl metodiky 7

II. Vlastní popis metodiky 7

1 Úvod 7

2 Standardní metodické postupy mikropropagace 8

a. Zakládání primárních kultur 8

b. Kultivační podmínky multiplikace 9

c. Zakořeňování a aklimatizace 9

d. Výsadba na venkovní plochy 11

III. Srovnání novosti postupů 12

IV. Popis uplatnění metodiky 13

V. Ekonomické aspekty 14

VI. Dedikace 14

VII. Seznam použité související literatury 14

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice 15

Summary 16

I. CÍL METODIKY

Cílem vypracování standardizované metody mikropropagace lýkovce vonného je zachování genetických zdrojů a efektivní reprodukce kriticky ohrožené populace, která se již neobnovuje přirozenou cestou.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1 ÚVOD

Lýkovec vonný (*Daphne cneorum* L.) je v posledních několika desetiletích silně na ústupu. Tento stálezelený nízký keř se v současné době vyskytuje v České republice pouze vzácně na lokalitách v termofytiku a teplých částech mezofytika. V současné době existují dvě významnější stanoviště tohoto druhu, a to Holý vrch u Mělníka (lokalita A) a Loděnice u Berouna (lokalita B). Řízkování lýkovce je sice možné, ale sběr řízků ohrožuje životaschopnost zbylých keřů. V literatuře je popsána mikropropagace různých druhů lýkovce (Christie, Brasscamp 1989; Cohen 1975; Cohen, Le Gal 1976; Marks, Myers 1992, 1994; Wei et al. 1992) zejména jako součást ozdravovacích postupů při získávání viruprostých matečnic (Cohen 1977). Naším cílem bylo dosáhnout zakonzervování stávající populace v explantátové bance a dopěstování kompletních rostlin pro případnou reintrodukci tohoto druhu. Pro namnožení rostlin byla použita mikropropagační metoda organogeneze.

Mikropropagační postupy *in vitro* (klonové množení v explantátových kulturách) jsou stále častěji používány jako jedině možný způsob konzervace ohrožených genotypů a jejich efektivní reprodukce. Jednou z nepřehlédnutelných výhod mikropropagačních postupů je možnost namnožení neomezeného počtu identických jedinců z ohrožené populace v relativně krátkém časovém období, přičemž množství odebíraného rostlinného materiálu pro založení primárních kultur (většinou meristematická pletiva dormantních pupenů) je minimální, a původního dárce nepoškozuje. Nejúspěšnější mikropropagační metodou, která se osvědčila pro klonové množení, je organogeneze. Regenerace rostlin z primárních explantátů je podmíněna vypracováním vhodných technologických postupů umožňujících indukci organogeneze, která musí být následována úspěšnou regenerací kompletní

rostliny. Základními mechanismy uplatňujícími se při růstových pochodech jsou dereprese meristémů axilárních pupenů nebo reorganizace meristémů a růst adventivních pupenů. Pro indukci organogeneze lze jako explantát využít i semena, zejména v takových případech, kdy semena špatně klíčí nebo jsou poškozena. Založením kultury a následné indukce organogeneze a multiplikace je dosaženo jednak konzervace genotypů a současně i možnost dopěstování vyššího počtu výpěstků *in vitro* ve srovnání s jedním semenáčkem. Hlavním předpokladem úspěšné organogeneze je zajištění vhodných kultivačních podmínek (chemické složení živného média, teplota, vlhkost a osvitový režim). Neméně 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.

V této práci jsou popsány postupy pro indukci organogeneze, multiplikace, rhizogeneze a konečně i aklimatizace a dopěstování rostlin lýkovce vonného, které mohou být využity pro reintrodukci na původní stanoviště.

2 STANDARDNÍ METODICKÉ POSTUPY MIKROPROPAGACE

a. Zakládání primárních kultur, indukce organogeneze

Pro založení explantátových kultur lze od května do konce června odebrat z rostlin výhony cca 3 cm dlouhé s apikálním, či axilárním pupenem. Odebraný rostlinný materiál se označí číslem donorového jedince, datem odběru a vloží do mikrotenového sáčku mezi navlhčenou sterilní buničitou vatu a pro převoz se uskladní do chladové tašky. Po transportu se výhony sterilizují a bezprostředně umístí na živné médium. Po krátkou dobu (24 hodin) lze výhony uchovávat při 4 °C. Při této teplotě se sníží riziko zavadnutí pletiv, šíření infekcí a poškození meristému. Pro šetrnou sterilizaci se osvědčilo protřepat výhony při frekvenci 60 RPM v roztoku 10% Sekuseptu forte (Farmak, a. s., ČR) po dobu 5 min a následně 10 min v 1% SAVO (Bochemie, a. s., ČR). Potom se výhony třikrát promývají ve sterilní vodě vždy po dobu 10 min protřepáváním při stejných otáčkách. Celý postup probíhá v laminárním boxu.

V laminární boxu za sterilních podmínek se výhony rozdělí na velikost cca 1 cm, každý segment by měl mít axilární nebo apikální pupen. Výhony se po jednom umístí do 100ml Erlenmeyerových baněk naplněných 50 ml indukčního agaro-

vého média. K indukci organogeneze se pro lýkovec vonný osvědčilo 6% agarové (Kulich HK, ČR) modifikované médium WPM (Lloyd, McCown 1981), doplněné o 200 mg.l^{-1} glutaminu, 200 mg.l^{-1} kaseinového hydrolyzátu, 30 g.l^{-1} sacharózy, 0,2 mg.l^{-1} BAP a 0,1 mg.l^{-1} IBA a pH se nastaví na 5,8. Kultivace probíhá v klimatizovaných podmínkách při 24 °C, při 16hodinové světelné periodě a intenzitě bílého světla 30 μmol.m^{-2} s^{-1}. Indukce axilárních (adventivních) pupenů na primárním explantátu trvá přibližně 4–6 týdnů.

K založení primární kultury za účelem získání většího počtu klonů množeného druhu lze použít také semena, sbíraná koncem května. Semena o velikosti přibližně 4 mm jsou po výše uvedené sterilizaci umístěná na živné médium stejného složení a za stejných podmínek jako segmenty výhonů. Doba klíčení je přibližně 6–8 týdnů.

b. Kultivační podmínky multiplikace

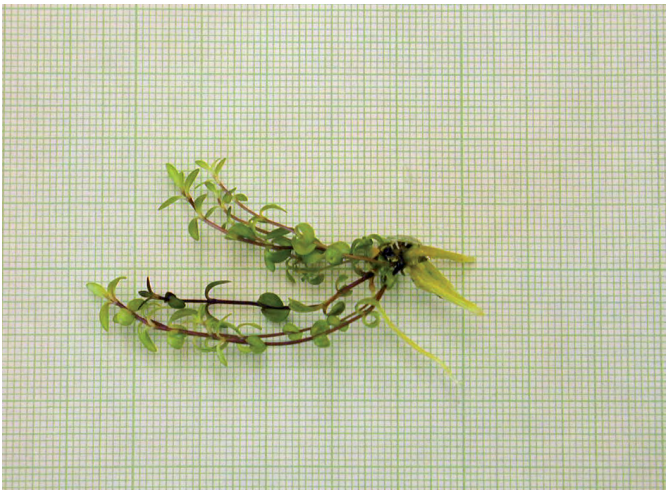
Po 4–6 týdnech se výhony přesazují na multiplikační médium WPM doplněné o 200 mg.l^{-1} glutaminu, 200 mg.l^{-1} kaseinového hydrolyzátu, 30 g.l^{-1} sacharózy a 0,2 mg.l^{-1} BAP a 0,1 mg l^{-1} IBA. Multiplikace probíhá za stejných kultivačních podmínek jako indukce organogeneze (obr. 1). Vyklíčená semena se přesadí na stejné multiplikační médium.

c. Zakořeňování a aklimatizace

Pro zakořeňování se využívají namnožené vícevrcholové explantátové kultury (obr. 2). K indukci růstu kořenů se osvědčilo agarovém médium WPM s třetinovou koncentrací makro i mikroelementů, bez přítomnosti cytokininů a se zvýšenou koncentrací auxinu IBA (2,83 mg.l^{-1}). Zakořeňování probíhá opět za stejných kultivačních podmínek jako organogeneze a multiplikace. Pro zvýšení účinnosti zakořeňování probíhá kultivace nejdříve 7 dní ve tmě. První kořeny se objevují v závislosti na klonu v průběhu 4–6 týdnů. Úspěšnost zakořenění se liší v závislosti na klonu a dosahuje cca 50 %.

Rostliny s vyvinutými kořeny se přesazují ze zakořeňovacího média do sadbovačů Quick Pot T 35 (280 mm × 360 mm × 110 mm, 21 buněk) naplněných agroperlitem (Perlit, s. r. o., Praha) a dvakrát týdně se zalévají základním médiem MS (Murashige, Skoog 1962) (bez fytohormonů a sacharózy) ředěným v poměru 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhá v obdobných kultivačních podmínkách (teplota 24 °C, bílé světlo o intenzitě 30 μmol.m^{-2} s^{-1}, 24hodinová světelná perioda) a při 90% relativní vzdušné vlhkosti. Při aklimatizaci dosahují ztráty zakořeněných rostlin 13 %.

Obr. 1: Explantátová kultura lýkovce vonného
Explant culture of *Daphne cneorum*



Obr. 2: Zakořeněný mikrořízek lýkovce vonného
Rooted microcutting of *Daphne cneorum*

Po 3 týdnech v agroperlitu se rostliny přesazují do sadbovačů Quick Pot T 60 (rozměr 350 mm × 215 mm × 200 mm, 15 buněk) s nesterilním pěstebním substrátem ze směsi zeminy (Zahradnický substrát, a. s., Soběslav), rašeliny (Rašelina, a. s., Soběslav) a agroperlitu 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.

d. Výsadba na venkovní plochy

Po aklimatizaci se výpěstky *in vitro* vysazují k dopěstování na venkovní záhony, případně se přesadí do vhodných obalů, které umožňují rozrůstání rostlinek, viz Katalog biologicky ověřených obalů (www.vulhmop.cz). Po roce dopěstování na venkovním záhonu lze výpěstky *in vitro* lýkovce vonného vysadit na stanoviště. Po dvouletém pěstování na venkovním záhonu může keřík lýkovce vonného vykvést (obr. 3).

Vysvětlivky:
BAP – 6-benzylaminopurin; IBA - β-indolylmáselná kyselina; MS – Murashige-Skoog medium; WPM – Woody Plant Medium

Obr. 3: Výpěstky *in vitro* lýkovce vonného na záhonech
Daphne cneorum plantlets in outdoor beds

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost mikropropagačních postupů spočívá v originálním a efektivním využití metody indukce organogeneze *in vitro* pro reprodukci explantátů odebíraných z vegetativních částí (nodálních segmentů) a semen lýkovce vonného a v originálním řešení zakořeňování a aklimatizace.

Efektivnost uvedené metody je dokumentována dosaženými výsledky:

Mikropropagace ze zimních pupenů

V průběhu první pasáže během 4týdenní kultivace na WPM médiu zůstalo z původních 20 výhonů (lokalita A) 16 kusů a z 10 původních výhonů (lokalita B) 6 kusů, u kterých prorostly apikální pupeny ve výhony dlouhé 2,5 ± 0,6 cm. Nové výhony byly použity k další mikropropagaci. Po přesazení na čerstvé médium stejného složení počet adventivních výhonů dosáhl 2,8 ± 1,2 u lokality A a 4,5 ± 2,6 výhonů u lokality B. Výhony byly použity k další multiplikaci a v průběhu dalších 2 až 3 pasáží se podařilo dosáhnout výrazně vyššího počtu výhonů ve vícevrcholové kultuře (20,2 ± 5,3 výhonů v jedné vícevrcholové kultuře u lokality A a 38,3 ± 12,2 výhonů u lokality B). Kultury z těchto lokalit se nelišily pouze v rychlosti množení, ale také fenotypicky. Výpěstky z lokality A se vyznačovaly světle zelenou barvou a slabšími a kratšími výhony, výpěstky z lokality B byly převážně tmavě zelené se silnými výhony. Celkem jsme po pětiměsíční kultivaci z 16 výhonů z lokality A získali 344 vícevrcholových kultur a z 6 výhonů z lokality B 236 vícevrcholových kultur.

Mikropropagace ze semen

Za účelem rozšíření počtu klonů množeného druhu jsme k založení primární kultury použili rovněž zralá semena. Deset semen o velikosti přibližně 4 mm bylo po sterilizaci vloženo na živné médium WPM, stejného složení jako v předchozích experimentech. Po třech týdnech vzklíčilo jediné semeno, z něhož po přesazení na čerstvé médium stejného složení během 3 týdnů vyrostlo 12 výhonů, které byly vedeny jako samostatný klon. Po dalších pasážích do čerstvého média WPM, ve kterém se tyto výhony dále množily šest měsíců (výtěžek 26,7 ± 8,2 výhonů na jednu kulturu), bylo získáno celkem 35 vícevrcholových kultur.

Výsledky prokázaly, že vhodným zdrojovým materiálem jsou nejen nodální segmenty vegetativních výhonů, ale i semena, která jsou obvykle při běžném vysetí neklíčivá. Indukované adventivní nebo axilární výhony vyrůstající z primárního explantátu se pak přesazují do multiplikačního média za účelem dalšího namno-

žení. Část propagovaného materiálu se inventarizuje v genové bance explantátů pro budoucí použití a zbývající explantáty se přenesou do zakořeňovacího média, v němž se indukuje rozvoj funkčního kořenového systému podmiňujícího úspěšné dopěstování rostlin pro výsadby ve venkovních podmínkách. Rostliny s kompletně vyvinutými kořeny je třeba ještě přesadit do nesterilních substrátů (perlit, rašelina) a postupně je aklimatizovat (tj. přivykat na venkovní podmínky, zejména na kolísání teplot, osvitu a sníženou vzdušnou vlhkost). Tuto fázi růstu lze považovat za nejkritičtější období mikropropagace, protože rostliny pěstované na arteficiálních agarových médiích nejsou definitivně morfofunkčně vyvinuté (u listů není zcela vyvinuta kutikula a průduchy, absorbční funkce kořenů nejsou plně efektivní). Po aklimatizaci se rostliny přesazují na venkovní záhony a po dopěstování (zpravidla po roce) je lze vysadit na konečné stanoviště.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Daphne cneorum patří v ČR k velmi vzácným a kriticky ohroženým druhům. Generativní množení je silně omezeno nedostatkem semen i sníženou klíčivostí. Jednou z možností jeho záchrany je mikropropagace explantátovými kulturami v definovaných *in vitro* podmínkách, v nichž jsou vyloučeny nepříznivé faktory limitující přirozenou obnovu. Mikropropagační technologie *in vitro* zajišťují nejen vyloučení všech škodlivých faktorů, které v přírodě limitují přirozenou cestu obnovy ohrožených druhů, ale zaručují i genetickou identitu množeného materiálu (D'Amato 1978).

Další výhodou mikropropagačního postupu je možnost množení z meristematických pletiv, která jsou prostá patogenních zárodků, takže získaný sadební materiál může napomoci při ozdravování napadených populací.

Z ekonomického hlediska je nepřehlédnutelné, že mikropropagovaný rostlinný materiál, který se uchovává v genové bance explantátů, lze kdykoliv použít pro další namnožení neomezeného počtu jedinců v relativně krátkém časovém období. Shromažďování co největšího počtu klonů od jednotlivých druhů je předpokladem zajištění genetické variability množeného druhu.

Uplatnění metodiky je především při zajištění zachování biodiverzity lesních ekosystémů, kde namnožený materiál lze uplatnit za účelem podpory biodiverzity v borových biocenózách.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Při posuzování ekonomických aspektů nelze opomenout, že ochrana biologické rozmanitosti na úrovni stanovišť je jedním ze základních cílů Státní politiky životního prostředí ČR, schválené usnesením vlády č. 235 ze dne 17. března 2004. Vedle celospolečenských přínosů se dá předpokládat i zvýšení tržeb u uživatele výsledků výrobou sazenic požadovaného sortimentu. Např. při produkci kontejnerovaných výpěstků v ročním objemu cca 25 000 kusů lze při ceně jedné sazenice cca 100,- Kč/ks předpokládat tržby cca 2 500 000,- Kč, zisk 337 500,- Kč (očekává se 13,5% ziskovost výroby). Toto další využití metodiky v případné komerční reprodukci z již založených explantátových kultur by s největší pravděpodobností minimalizovalo i devastaci přírodních lokalit, v důsledku zvýšení dostupnosti tohoto druhu pro pěstitele. Hlavními celospolečenskými přínosy však zůstává zachování genetických zdrojů a podpora biodiverzity.

VI. DEDIKACE

Vypracování metodiky bylo podporováno výzkumným záměrem MZE0002070203.

VII. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Christie C.B., Brasscamp W. (1989): Exflasking high health *Daphne* plantlets. Proc. Intern. Plant Prop. Soc., 38: 394-398.

Cohen D. (1975): Plant tissue culture – possible applications in the New Zealand Nursery Industry. Proc. Intern. Plant Prop. Soc., 25: 310-315.

Cohen D. (1977): Thermotherapy and meristem - tip culture of some ornamental plants. Acta Hort., 78: 381-388.

Cohen D., Le Gal P.M. (1976): Micropropagation of *Daphne* x *Burkwoodii* Turill. Proc. Intern. Plant Prop. Soc., 26: 330-333.

D'Amato F. (1978): Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: Frontiers of Plant Tissue Culture, Thorpe T.A., (ed.): Int. Assoc. Plant Tissue Cult.: 287-295, University of Calgary, Alberta.

Lloyd G., McCown B.H. (1981): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc., 30: 421-427.

Marks T.R., Myers P.E. (1992): Effect of explant location upon early culture development *in vitro.* J. Hort. Sci., 67: 583-591.

Marks T.R., Myers P.E. (1994): Physiological variability arising from *in vitro* culture is induced by shoot selection and manipulation strategies. J. Hort. Sci., 69: 1-9.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

Wei C., Green M.J., Gotkin S.E., Monette P.L. (1992): Use of *in vitro* cultures of *Daphne cneorum* L. for western detection o *Daphne* virus. X. J. Environ. Hort., 10:153-156.

VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Malá J., Šíma P., Bylinský V. Kirschnerová L. (2001). Mikropropagace pro záchranu hořce jarního a lýkovce vonného. Příroda, Sborník prací z ochrany přírody, 19: 55-58.

Malá, J., Bylinský, V. (2004): Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. Biologia plantarum, 48: 633-639.

MICROPROPAGATION OF ROSE DAPHNE (*DAPHNE CNEORUM* L.)

Summary

Daphne cneorum L. is an evergreen woody shrub rarely spread in the Bohemian Thermophyticum or sometimes transgressing into warmer regions of the Mesophyticum. This species is currently listed as an endangered species because of deletrious anthropogenic influences. Very restricted populations have only survived in their native habitats. Conventional vegetative propagation of *D. cneorum* by means of cuttings is practically excluded, because the collection of sufficient number of shoots for vegetative cuttings has harmful effects for survival of shrubs. Natural propagation by seeds is extremely low, which is caused by poor seed viability or germination capability, and the seeds serve as a nutrition for birds. For these reasons, there is justifiable to apply urgently non-conventional propagation methods both for conservation and reintroduction of *D. cneorum* into areas of its original distribution. In this methodology we describe the successful organogenesis of *D. cneorum* induced from a very limited number of apical winter buds and seeds. Woody-Plant medium with phytohormones and other nutrients were used for cultivation of explants. The basal WPM medium with 0.2 mg l^{-1} of BAP and 0.1 mg l^{-1} of IBA and with 200 mg l^{-1} glutamine and 200 mg l^{-1} casein-hydrolysate was used for induction of organogenesis in winter apical buds and seeds of daphnae. The average numbers of shoots on per one explant were 27.4 ± 10.6 after 4 weeks of culturing. Multiple branching explants produced 4–5 cm shoots. Excised shoots were placed on fresh WPM medium with lower strength of macro- and microelements and with 2.83 mg l^{-1} of IBA for rooting. Acclimatized plants were successfully transplanted into external conditions where they had survived the winter period without any losses and had come out into blossom.

LESNICKÝ PRŮVODCE

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