

MIKROPROPAGACE HOŘCE JARNÍHO (*GENTIANA VERNA* L.)

LESNICKÝ PRŮVODCE



RNDr. JANA MALÁ, CSc.
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.
Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.
RNDr. LUDMILA KIRSCHNEROVÁ

Recenzovaná metodika

11/2009

**MIKROPROPAGACE HOŘCE JARNÍHO
(*GENTIANA VERNA* L.)**

Recenzovaná metodika

Jana Malá

Helena Cvrčková

Pavλίna Máchová

Ludmila Kirschnerová

Strnady 2009

Lesnický průvodce 11/2009

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

Odpovědný redaktor: Mgr. E. Krupičková
e-mail: krupickova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-023-2
ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION OF *GENTIANA VERNA* L.

Abstract

This work presents the methods of organogenesis induction, propagation, rooting and acclimatization of critically endangered *Gentiana verna*. The induction of organogenesis on vegetative shoots was successful on the WPM medium with low concentration of cytokinin BAP (0.2 mg.l⁻¹). The multiplication of primary explants was achieved on medium MS with concentrations BAP (0.2 mg.l⁻¹) and IBA (0.1 mg.l⁻¹). Propagated shoots rooted in the agar WPM medium with concentration IBA (0.5 mg.l⁻¹). The mortality during acclimatization was not over 5%. The preservation program is running in the cooperation with the Agency of Nature Protection.

Key words: micropropagation, *Gentiana verna*, endangered species, organogenesis

Recenzenti: Ing. Lada Krnáčová
Mgr. Anna Šlechtová

Adresa autorů:

RNDr. Jana Malá, CSc., Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.
Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady 136, Jíloviště 252 02
e-mail: mala@vulhm.cz; cvrckova@vulhm.cz; machova@vulhm.cz

RNDr. Ludmila Kirschnerová, Botanický ústav AV ČR, Zámek 1, 252 43 Průhonice
e-mail: kirschnerova@ibot.cas.cz

Obsah:

CÍL METODIKY	7
VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
Úvod	7
Standardní metodické postupy mikropropagace	8
a. Zakládání primárních kultur, indukce organogeneze	8
b. Kultivační podmínky multiplikace	9
c. Zakořeňování a aklimatizace	9
d. Výsadba na venkovní plochy	11
SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	12
POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	13
DEDIKACE	14
LITERATURA	14
Seznam použité související literatury	14
Seznam publikací, které předcházely metodice	15
SUMMARY	16

CÍL METODIKY

Cílem metodiky mikropropagace hořce jarního je efektivně reprodukovat početně velmi limitovanou populaci nížinné formy (dealpin) hořce jarního, která se již neobnovuje přirozenou cestou.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Úvod

V České republice roste hořec jarní (*Gentiana verna*, L.) na několika desítkách stanovišť (Květena České republiky 6, 2000). V současné době se jejich počet drasticky snížil na pouhé tři lokality. Početně velmi limitovaná populace nížinné formy (dealpin) hořce jarního, která se již 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. Pro splnění dlouhodobého cíle Záchraného programu pro hořec jarní (KIRSCHNEROVÁ et al. 2008), zachování populace nížinné formy hořce jarního v NPP Rovná, byla standardizována metoda reprodukce stávající populace mikropropagační *in vitro*. 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 meristemická pletiva nodálních segmentů) 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. 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 standardizované postupy, ověřené na základě dlouhodobého experimentálního výzkumu, pro indukci organogeneze, multiplikace, rhizogeneze a konečně i aklimatizace a dopěstování rostlin hořce jarního, které mohou být využity pro reintrodukcii do původních stanovišť.

Standardní metodické postupy mikropropagace

a. Zakládání primárních kultur, indukce organogeneze

Od května do konce června lze odebrat z rostlin výhony cca 1 cm dlouhé. Označí se 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% roztoku 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 upraví na velikost cca 1 cm, přičemž delší výhony lze rozdělit. Výhony se po jednom umístí do 100ml Erlenmeyerových baněk naplněných 50 ml indukčního agarového média. K indukci organogeneze se pro hořec jarní osvědčilo 6% agarové (Kulich HK, ČR) modifikované médium WPM (LLOYD, MCCOWN 1981), doplněné 200 mg.l⁻¹ glutaminu, 200 mg.l⁻¹ kaseinového hydrolyzátu, 30 g.l⁻¹ sacharózy, 0,2 mg.l⁻¹ BAP, 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.



Obr. 1. Multiplikace výhonů hořce jarního/Multiplication of *Gentiana verna* shoots

b. Kultivační podmínky multiplikace

Po 4 týdnech se výhony přesazují na multiplikační médium MS (MURASHIGE a SKOOG 1962) doplněném 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. Multiplikace probíhá za stejných kultivačních podmínek jako indukce organogeneze (obr. 1). V průběhu multiplikační fáze se explantátové kultury pravidelně po 4 týdnech přesazují na čerstvá multiplikační média. Multiplikující se kultury jsou dlouhodobě uchovávány v explantátové bance za účelem odběru mikrořízků apod.

c. Zakořeňování a aklimatizace

Pro zakořeňování se využívají namnožené výhony z vícevrcholových kultur (mikrořízkování). K indukci růstu kořenů se osvědčilo stejné médium jako pro indukci organogeneze, avšak bez přítomnosti cytokininů a se zvýšenou koncentrací auxinu IBA (0,5 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 (obr. 2).



Obr. 2. Indukce kořenů u explantů hořce jarního/*Root induction at *Gentiana verna* explants*

Rostliny s vyvinutými kořeny se přesazují ze zakořeňovacího média do sadbovačů Quick Pot T 35 (280 mm × 360 mm × 110 mm, 21 jamek) naplněných agroperlitem (Perlit, s. r. o., Praha) a dvakrát týdně se zalévají základním médiem MS (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 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 24hodinová světelná perioda) a při 90% relativní vzdušné vlhkosti.

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* hořce jarního vysadit na stanoviště. Po roce pěstování na venkovním záhonu mohou trsy hořce dosáhnout velikosti v průměru až 20 cm², vykvést a mít klíčivá semena (obr. 3).



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

Vysvětlivky:

BAP – 6-benzylaminopurin; IBA - β -indolylmásečná kyselina; NAA - α -naf-tyloctová kyselina; MS – Murashige-Skoog medium; WPM – Woody Plant Medium

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost mikropropagačních postupů spočívá v originálním využití metody indukce organogeneze *in vitro* pro reprodukci explantátů odebíraných z vegetativních částí (nodálních segmentů) hořce jarního a v originálním řešení zakořeňování a aklimatizace. U tohoto druhu se jedná o první standardizovanou metodiku mikropropagace.

Reprodukce *in vitro* byla využita u medicínálně významných a ohrožených druhů rodu *Gentiana*, např. u druhu *G. kuroo* (SHARMA et al. 1993), *G. cerina*, *G. corymbifera* (MORGAN 1997) a *G. punctata* (BUTIUC-KEUL 2005). U těchto obtížně množitelných druhů (HOSOKAWA et al. 1996) se podařilo dosáhnout indukce organogeneze vysokými koncentracemi růstových regulátorů, zejména cytokininů (1 - 2 mg.l⁻¹). Ukázalo se však, že vyšší koncentrace cytokininů mohou komplikovat navození rhizogeneze i aklimatizaci u regenerantů (WERBROUCK et al. 1995). Avšak u *G. verna* se podařilo indukovat organogenezi velmi nízkými koncentracemi cytokininů (0,2 mg.l⁻¹) a nedošlo ke komplikacím při rhizogenezi a aklimatizaci výpěstků *in vitro* (MALÁ et al. 2003).

Organogeneze, tj. indukce diferenciacce nejčastěji adventivních nebo axilárních výhonů na primárním explantátu, se ukázala prozatím jako nejúspěšnější mikropropagační metoda pro reprodukci bylin i listnatých dřevin. Podstatou organogeneze je vyvolání buněčně diferenciacních a morfo-genetických procesů při utváření rostlinných pletiv a orgánů specifickými růstovými faktory, které se podle druhu rostliny dodávají v různých koncentracích a poměrech do indukčního živného média. Vhodným zdrojovým materiálem jsou zvláště meristema-tická pletiva pupenů nebo nodální segmenty vegetativních výhonů. Indukované adventivní nebo axilární výhony vyrůstající z primárního explantátu se pak přesazují do multiplikačního média za účelem dalšího namnožení. 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, osvit 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, absorbcí funkce kořenů není plně efektivní).

Po aklimatizaci se rostliny přesazují na venkovní záhony a po dopěstování (zpravidla po roce) je lze vysadit na konečné stanoviště.

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Jediným řešením, jak získat dostatečné množství sadebních rostlinek hořce jarního, je použití mikropropagace explantátovými kulturami v definovaných *in vitro* podmínkách, v nichž jsou vyloučeny nepříznivé faktory limitující přirozenou obnovu. Metoda indukce organogeneze z meristematických pletiv byla již úspěšně použita pro namnožení kriticky ohrožených druhů, např. lýkovce vonného a hořce tečkovaného (COHEN 1975, FAY 1992, MALÁ, BYLINSKÝ 2004). Mikropropagační technologie *in vitro* zajišťují nejen vyloučení všech škodlivých faktorů, které v přírodě limitují přirozenou cestu obnovy ohrožených druhů, ale zaručují i genetickou identitu množného 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 archivu 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 množného druhu.

Popsaná metodika byla využita v rámci záchranného programu pro hořec jarní (*G. verna* L. subsp. *verna*) v České republice a podle uvedené metodiky se podařilo napěstovat řádově stovky sazenic pro Agenturu ochrany přírody ČR.

DEDIKACE:

Vypracování této metodiky bylo podporováno: výzkumným projektem MŽP SP/2d4/112/08.

LITERATURA

Seznam použité související literatury

- BUTIUC-KEUL A., SUTEU A., DELIU C. 2005. In vitro organogenesis of *Gentiana punctata*. Not. Hot.Bot. Agribot., 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. Alberta, University of Calgary: 287-295.
- FAY M. F. 1992. Conservation of rare and endangered plant using *in vitro* methods. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 28P: 1-4.
- 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.
- 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.
- KIRSCHNEROVÁ L., KAVALCOVÁ V., KLAUDISOVÁ A. 2008. Záchranný 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.

- MALÁ J., BYLINSKÝ V. 2004. Micropropagation of endangered species *Daphne cneorum*. *Biologia plantarum*, 48: 633-639.
- MORGAN E. R. 1997. In vitro propagation of *Gentiana cerina* and *Gentiana corymbifera*. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.*, 25: 1-8.
- 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.
- WERBROUCK S. P. O., VAN DER JEUGT B., DEWITTE W., PRINSEN E., VAN ONCKELEN H. A. 1995. The metabolism of benzyladenine in *S. floribundum* SCHOTT 'Petite' in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Rep.*, 14: 662-665.

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., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., KIRSCHNEROVÁ L. 2003. Micropropagation of critically endangered *Gentiana verna* L. by explant cultures. *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae*, 20: 83-89.

MICROPROPAGATION OF *GENTIANA VERNA* L.

Summary

Gentiana verna belongs to the most endangered species in the Czech Republic. At the present time, it occurs only in three localities. Very limited population of the gentian lowland form (dealpin), which is no more renewing naturally, is growing in National Monument Rovná near Strakonice. Two slightly more numerous populations are situated in Malá Kotlina and Velká Kotlina in Protected Landscape Area in the Jeseníky Mountains. In this study, a micropropagation *in vitro* technology, the standardized induction of organogenesis, multiplication, rooting and acclimatization procedures, suitable for reintroduction of newly propagated gentian plants into original habitats, are described. Shoots around 1 cm were sampled in Rovná since the beginning of May to the end of June. Shoots were sterilized in 10% Seku-septu® forte solution (Farmak, a. s., CR) for 5 min, in 1% SAVO solution (Bochemie, a. s., CR) for 10 min, and washed in distilled water. The induction of organogenesis on vegetative shoots was successful on the 6% agar-WPM medium with low concentrations of cytokinine BAP (0.2 mg.l⁻¹), glutamine (200 mg.l⁻¹), casein hydrolyzate (200 mg.l⁻¹), saccharose (30 g.l⁻¹), and IBA (0.1 mg.l⁻¹) with pH adjusted to 5.8. The multiplication of primary explants was achieved on medium MS with concentration BAP (0.2 mg.l⁻¹) and IBA (0.1 mg.l⁻¹), glutamine (200 mg.l⁻¹), casein hydrolyzate (200 mg.l⁻¹), saccharose (30 g.l⁻¹). The same medium as for induction of organogenesis the agar-WPM medium without cytokinines but with concentration of auxin IBA (0.5 mg.l⁻¹) was used for induction of rhizogenesis. Cultivation proceeded in air-conditioned room under 16hrs photoperiod of white fluorescent light (30 μmol.m⁻² s⁻¹) at 24 °C. Effectiveness of rooting is higher, if the plantlets are cultured firstly in the dark (1 week). The roots appeared during 4 - 6 weeks. Axillar (adventive) buds on the primary explants were induced during 4 - 6 weeks. The plantlets with full-developed roots were transferred into pots Quick Pot T 35 (280 mm × 360 mm × 110 mm, 21 pits) with non-sterile substrates (soil, peat, and agroperlite in relations 2 : 1 : 1). Acclimatization proceeded in the same conditions as mentioned above. After 3 weeks, the plants were transferred into pots Quick Pot T 60 (350 mm × 215 mm × 200 mm, 15 pits) with the same non-sterile substrate and located in glasshouse for 3 - 4 weeks. The mortality during acclimatization did not exceed 5%. After a year of outdoor culturing, the gentian plants could reach 20 cm²,

came into flower, and developed germinant seeds. By means of described micropropagation procedures several hundreds of viable plants were reproduced, which were utilized within the framework of *Gentiana verna* Preservation Program.

LESNICKÝ PRŮVODCE



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