Příloha 11.

MGSII-17 Záchranný program pro zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

Metodické postupy mikropropagace a rhizogeneze zvonovce liliolistého

Závěrečná zpráva

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

2016

Příloha 11.

1. Úvod

Ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., byla ověřována možnost reprodukce vybraných populací zvonovce liliolistého metodami *in vitro*. Mikropropagační postupy *in vitro* (klonové množení v explantátových kulturách) jsou stále častěji používány jako možný způsob konzervace ohrožených genotypů a jejich efektivní reprodukce. Tyto technologie 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). 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 nodálních segmentů) je minimální, a původního dárce nepoškozuje. Další výhodou mikropropagačního postupu je možnost množení z meristematických pletiv, která jsou prostá patogenních zárodků, takže získaný sadební materiál může napomoci i při ozdravování napadených populací.

Metoda indukce organogeneze z meristematických pletiv byla již úspěšně použita pro namnožení kriticky ohrožených druhů rostlin, např. lýkovce vonného a hořce tečkovaného (COHEN 1975, FAY 1992, MALÁ a BYLINSKÝ 2004). U čeledi *Campanulaceae* byly mikropropagace využity pro množení druhu *Campanula isophylla* Moretti, kde byly pozorovány klonové rozdíly v multiplikační fázi (v počtu nově tvořených výhonů) i ve fázi rhizogeneze (doba tvorby kořenů) (BRANDT 1992).

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 media, 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.

Příloha 11.

2. Sběr rostlinného materiálu

Prvotní pokusy zaměřené na možnost využití mikropropagačních technologií pro reprodukci zvonovce liliolistého byly provedeny na rostlinném materiálu z lokality Bilíchovské údolí již v roce 1996.

V rámci přípravy záchranného programu byl rostlinný materiál odebrán v červnu 2015 (lodyhy, listy) z lokality Vražba a v září 2015 proběhl odběr na lokalitách Bilíchovské údolí (Džbán) a Babinské louky. Při odběrech byl rostlinný materiál označen identifikačním číslem donorového jedince. Pro převoz do laboratoří Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i. se materiál vložil do mikrotenových sáčků mezi navlhčenou sterilní buničitou vatu a převoz se uskutečnil v chladové tašce, z důvodu udržení rostlinného materiálu v chladu. Po převozu do laboratoří byl materiál okamžitě zpracováván, popřípadě uložen na nezbytně krátkou dobu do lednice (5℃).

3. Sterilizace rostlinného materiálu

Přivezený rostlinný materiál byl nastříhán na segmenty o velikosti 3 – 5 cm. Segmenty byly proplachovány 10 min. v Jaru, poté sterilizovány 5 min v 5% Korsolex® plus (BODE CHEMIE Hamburg, Germany), následně byly segmenty proplachovány pod tekoucí vodou 15 min. a probíhala sterilizace v 1% SAVO (Bochemie, a. s., ČR), zde byly testovány rozdílné doby sterilizace 5, 7, a 10 minut a závěrem byl rostlinný materiál třikrát promyt ve sterilní destilované vodě. Proces promývání ve sterilní destilované vodě již probíhal v laminárním boxu za sterilních podmínek. Jako nejvhodnější výchozí materiál pro založení explantátových kultur se jevily segmenty lodyh s meristémy z úžlabí listů odebírané v jarním období, optimální doba sterilizace v 1% SAVO byla 5 minut.

4. Indukce organogeneze

Jednotlivé vysterilizované segmenty se po jednom umístily do 100 ml Erlenmeyerových baněk naplněných 50 ml indukčního agarového média. Pro indukci organogeneze se použily 2 typy modifikovaných médií: 6% agarové (Dr. Kulich Pharma, s. r. o, ČR) 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 6% agarové médium MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) doplněné o 200 $mg.l^{-1}$ glutaminu, 200 $mg.l^{-1}$

Příloha 11.

kaseinového hydrolyzátu, 30 $g.l^{-1}$ sacharózy, 0,2 $mg.l^{-1}$ BAP a 0,1 $mg.l^{-1}$ IBA, pH bylo upravováno na 5.8 (Obr. 1, 2, 3). Jako vhodnější se pro indukci organogeneze osvědčilo modifikované MS médium. Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách při 24°C a 16hodinové osvitové periodě bílým fluorescenčním světlem (30 $\mu mol.m^{-2}\ s^{-1}$).

Složení kultivačních médií:

MS médium - MURASHIGE et SKOOG médium

Mikroelementy	$mg\ .\ l^{-1}$
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
FeNaEDTA	36.70
H_3BO_3	6.20
KI	0.83
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
Makroelementy	$mg\ .\ l^{-1}$
$CaCl_2$	332.02
KH_2PO_4	170.00
KNO_3	1900.00
$MgSO_4$	180.54
NH_4NO_3	1650.00
Vitamíny	$mg\ .\ l^{-1}$
Glycine	2.00
Myo-Inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10

WPM MÉDIUM - LLOYD et MCCOWN médium

Mikroelementy	$mg\ .\ l^{-1}$
$CuSO_4.5H_2O$	0.25
FeNaEDTA	36.70
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	22.30
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
Makroelementy	$mg\ .\ l^{-1}$
$CaCl_2$	72.50
$Ca(NO_3).2H_2O$	471.26

Příloha 11.

KH_2PO_4 K_2SO_4 $MgSO_4$ NH_4NO_3	170.00 990.00 180.54 400.00
Vitamíny	mg . l^{-1}
Glycine Myo-Inositol Nicotinic acid Pyridoxine HCl Thiamine HCl	2.00 100.00 0.50 0.50 1.00

5. Multiplikace explantátových kultur

Multiplikace stabilizovaných explantátových kultur probíhala na modifikovaném médiu WPM 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, 6 g l^{-1} agaru. Pro kultivaci zvonovce liliolistého se osvědčil agar od firmy Dr. Kulich Pharma, s. r. o (Obr. 4). Vliv rozdílných typů agaru na růst explantátových kultur různých druhů rostlin popsalo více autorů, a přestože byly provedeny analýzy složení jednotlivých testovaných agarů (různí výrobci, různé šarže komerčních výrobků apod.) a stanoveny jejich fyzikálně-chemické charakteristiky, rozdíly v reakci *in vitro* kultur různých druhů rostlin na agarové agens nemají exaktní vysvětlení. Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách při 24°C a 16hodinové osvitové periodě bílým fluorescenčním světlem (30 µmol.m^{-2} s^{-1}) (Obr. 5).

6. Proces rhizogeneze a aklimatizace

Pro navození rhizogeneze se použilo WPM médium třetinové koncentrace s obsahem 1 mg.l^{-1} IBA, sacharóza 5 g.l^{-1}, agar (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., ČR) 6 g.l^{-1}, pH 5,8, výhony byly kultivovány při 24 °C na světle (36W/33 Philips Tubes, The Netherlands) s 24hodinovou světelnou periodou a intenzitou osvětlení 30 µmol.m^{-2}.s^{-1} (Obr. 6). U explantátových kultur zvonovce liliolistého bylo také pozorováno spontánní zakořeňování na multiplikačním médiu a to u nově založených explantátových kultur v průběhu řešení projektu.

Rostliny s vyvinutým kořenovým systémem byly přesazeny do agroperlitu (Obr. 7), byla testována i možnost přesezení přímo z agarového média do nesterilního substrátu - směsi zeminy a agroperlitu (1 : 1), tento postup se osvědčil (Obr. 8). V průběhu celé aklimatizační

fáze byly zakořeňující rostliny jedenkrát denně zalévány základním roztokem WPM (LLOYD, MCCOWN 1981), ředěným 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhala v klimatizované místnosti při teplotě 20 °C a 24hodinové světelné fotoperiodě, s osvětlením o intenzitě 30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, zakořeněné rostliny byly udržovány při 90% relativní vzdušné vlhkosti. V případě rostlin kultivovaných na agroperlitu byly po 14 dnech rostliny přesazeny do nesterilního substrátu tvořeného směsí zeminy a agroperlitu (1 : 1). Rostliny rostoucí na nesterilním substrátu byly postupně adaptovány na 70% relativní vzdušnou vlhkost (Obr. 9). Pro další dopěstování byly použity obaly BBC Growing trays, které podporují správný rozvoj a tvorbu kvalitního kořenového systému.

Výpěstky *in vitro* byly dopěstovány do výsadby schopných sazenic na venkovních záhonech Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (Obr. 10, 11).

7. Závěr

Ve Výzkumném ústavu lesního hopodářství a myslivosti, v. v. i. byla vypracována metodika množení kriticky ohroženého druhu zvonovce liliostého pomocí mikropropagační technologie. Protokol byl použit pro rozdílné genotypy rostlin z odlišných lokalit zbytkového výskytu, byly optimalizovány postupy indukce, multiplikace a rhizogeneze explantátů. Podařilo se dopěstovat výpěstky *in vitro* z nově založených explantátových kultur, sazenice jsou vysazeny ve venkovních podmínkách. Současně jsou stabilizované explantátové kultury ve fázi multiplikace udržovány v bance explantátů Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.. Kultury *in vitro* je možné dlouhodobě udržovat a jsou využitelné i pro případné napěstování rostlin tohoto kriticky ohroženého druhu.

Literatura:

BRANDT, K. 1992: Micropropagation of *Campanula isophylla* Moretti. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29. 31-36.

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

Příloha 11.

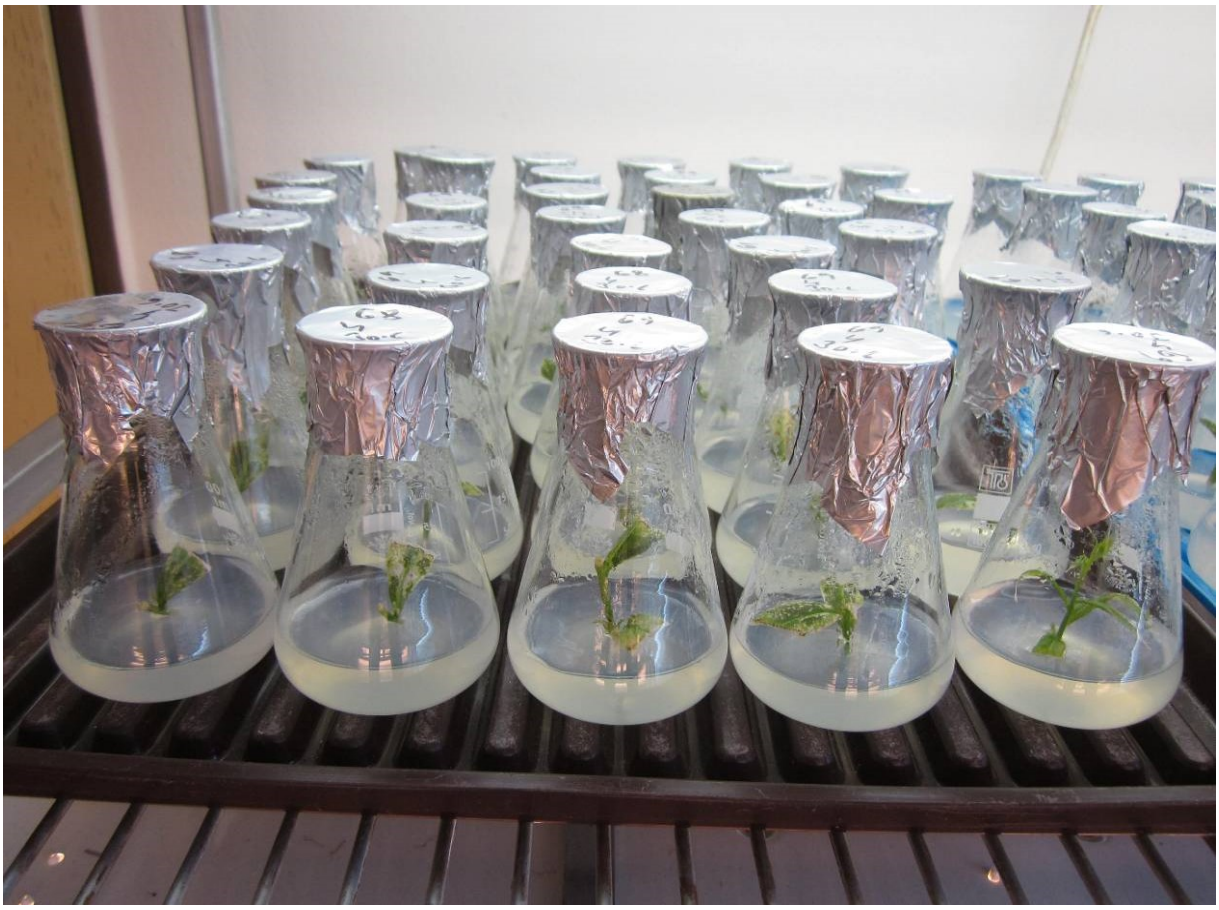
FAY, M. F. 1992: Conservation of rare and endangered plant using *in vitro* methods. In vitro Cell Dev. Biol., 28P: 1-4.

LLOYD G., MCCOWN H. B. 1980.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.

MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioasssy with tabacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Příloha 11.

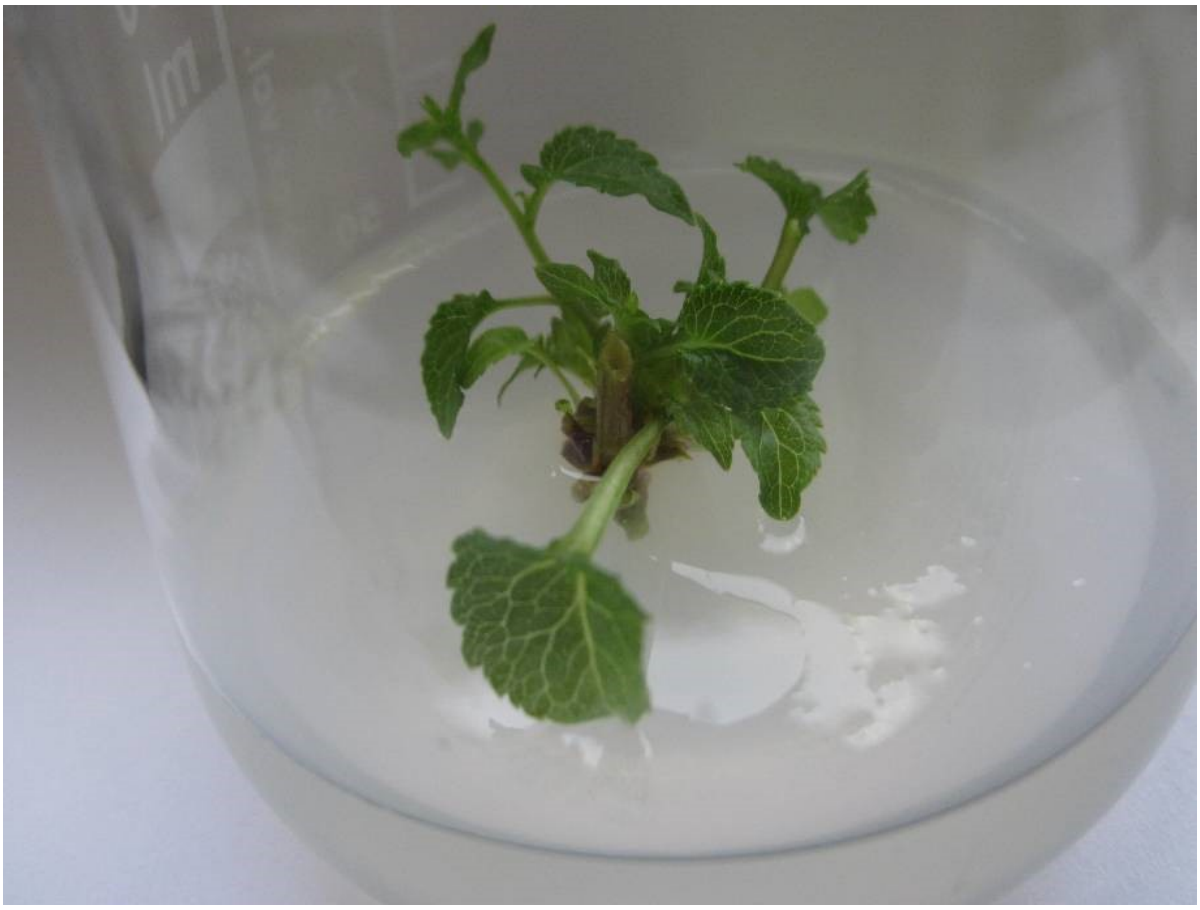


Obr 1: Zakládání explantátových kultur – lokalita Vražba

Příloha 11.

Obr. 2: Indukce organogeneze

Příloha 11.

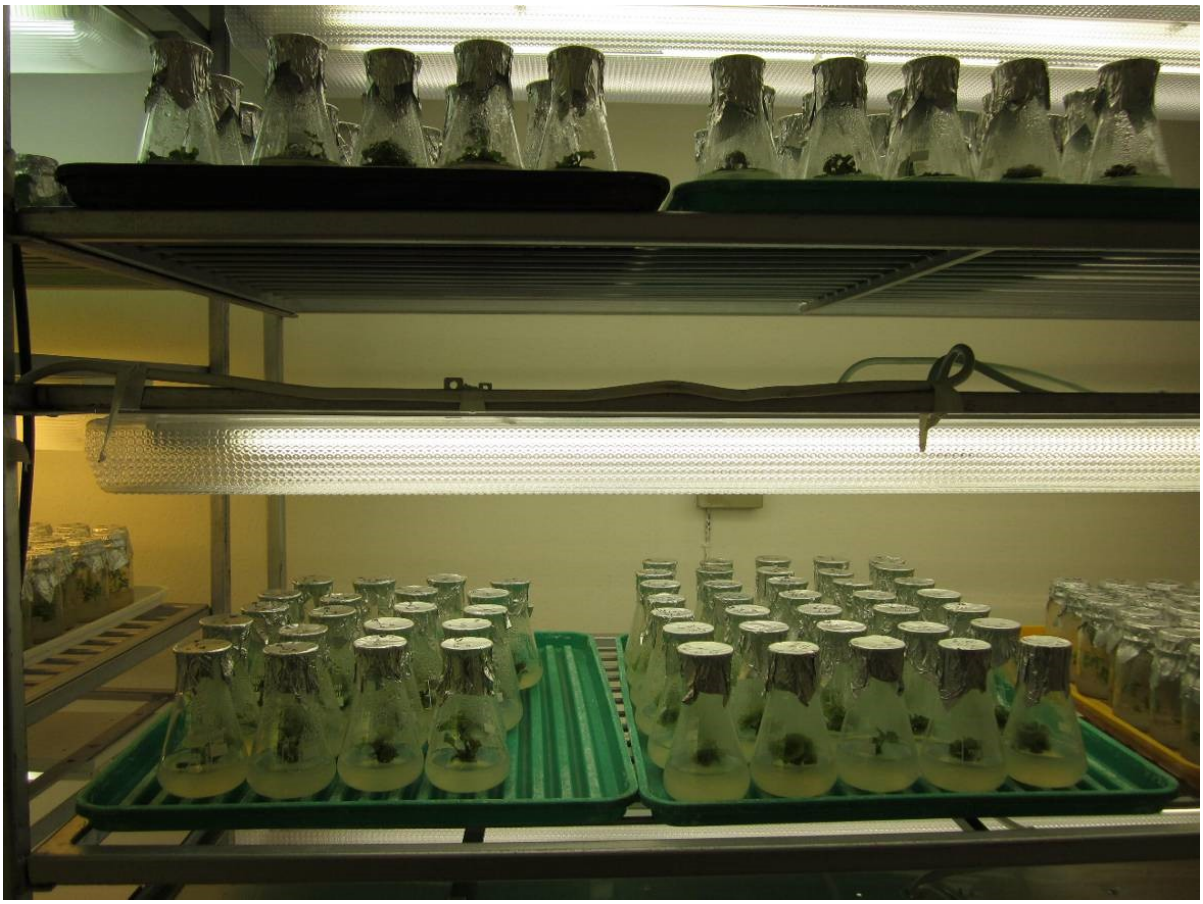


Obr. 3: Detail indukce organogeneze

Příloha 11.

Obr. 4: Multiplikující se kultura zvonovce liliolistého

Příloha 11.



Obr. 5: Explantátové kultury zvonovce liliolistého

Příloha 11.

Obr. 6: Fáze rhizogeneze

Příloha 11.

Obr. 7: Fáze aklimatizace – rostliny po přesazení z agarového média do agroperlitu

Příloha 11.

Obr. 8: Fáze aklimatizace – rostliny po přesazení z agarového média na směs zeminy a agroperlitu

Příloha 11.

Obr. 9: Fáze aklimatizace – adaptace na 70% relativní vzdušnou vlhkost

Příloha 11.

Obr. 10: Výpěstky *in vitro* na venkovním záhonu

Příloha 11.

Obr. 11: Detail výpěstku *in vitro* zvonovce liliolistého