centrum výskumu rastlinnej výroby piešťany

Množenie *Miscanthus giganteus* v *in vitro* kultúre

Metodická príručka

Názov: Množenie *Miscanthus giganteus* v *in vitro* kultúre

Autor: Mgr. Marcela Gubišová

Autori fotografií: Ing. Jozef Gubiš, Phd., Mgr. Marcela Gubišová

Vydal: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany,

Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Rok vydania: 2013

Kontakt na autora: gubisova@vurv.sk

Metodická príručka vznikla za finančnej podpory Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR a je výstupom riešenia projektu „Biotechnológie rastlín a interagujúcich mikro-organizmov“.

Vymedzenie pojmov

EXPLANTÁT - odobratý rastlinný orgán, skupina orgánov, časť pletiva, bunka kultivovaná mimo pôvodného organizmu

IN VITRO KULTÚRA – pletivová kultúra, kultúra rastlinných explantátov kultivovaná sterilne v umelých, presne definovaných podmienkach

KALUS - pletivo tvorené nediferencovanými bunkami, ktoré sa prirodzene tvorí po poranení; v pletivových kultúrach je jeho tvorba indukovaná na rezných plochách, jeho bunky majú schopnosť regenerovať orgány alebo celistvú rastlinu

ORGANOGENÉZA – vývoj orgánu alebo skupiny orgánov z bunky, zhluku buniek alebo pletiva

RIZÓM – podzemok, typ premenenej stonky so šupinovitými listami a púčikmi rastúci pod zemou, tvoriaci adventívne korene

SOMATICKÁ EMBRYOGENÉZA – vývoj embrya zo somatickej bunky

TRIPLOIDNÝ HYBRID – hybrid z medzidruhového kríženia majúci 3 sady chromozómov, je sterilný, rozmnožuje sa výlučne vegetatívne

Skratky

2,4-D – kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová
BAP – 6-benzylaminopurín
NAA – kyselina naftyloctová

OBSAH

1. Úvod	6
2. Botanická charakteristika *Miscanthus giganteus*	7
2.1. Zakladanie porastov	8
3. Metodika	9
3.1. Východiskový biologický materiál	9
3.2. Sterilizácia	9
3.3. Zloženie živných médií	10
3.4. Založenie *in vitro* kultúry a regenerácia rastlín	10
3.5. Multiplikácia a uchovávanie regenerovaných výhonkov	11
3.6. Zakoreňovanie	12
3.7. Presádzanie do pôdy a aklimatizácia na *ex vitro* podmienky	12
4. Záver	14
5. Uplatnenie metodiky	14
6. Použitá literatúra	15
7. Publikácie, ktoré predchádzali metodickej príručke	15

1. Úvod

Na výrobu energie využíva človek nielen zuhoľnatené telá rastlín, ale aj rastlinnú biomasu. Tá má potenciál využitia na priame spaľovanie, t.j. na výrobu tepla, alebo môže byť aj surovinou na výrobu biopalív. Popri oddávna využívanej drevnej hmote sa v ostatných rokoch stále viac do popredia dostávajú alternatívne zdroje rastlinnej biomasy, akými sú zvyšky z rastlinnej výroby nepoužiteľné ako potravina alebo krmovina ale aj tzv. energetické plodiny. Takáto plodina musí spĺňať určité požiadavky, a to: vysoká a lacná produkcia biomasy, nízke požiadavky na kvalitu pôdy, čo umožní pestovanie na menej bonitných pôdach v marginálnych oblastiach, pričom by nemala konkurovať pestovaniu plodín na potravinárske účely. Za jednu z takýchto rastlín je považovaná aj ozdobnica čínska (*Miscanthus sinensis*), najmä jej hybrid *Miscanthus x giganteus*. Svojou úrodou, v priemere 20 t/ha/rok dokáže konkurovať pôvodným druhom charakteristickým pre územie Slovenska. Na jednej lokalite môže byť pestovaná 20 rokov, pričom biomasa sa zberá každoročne, takže nevyžaduje po zapojení porastu ďalšie náklady na sadivo a pesticídy. Táto rastlina je ekologicky adaptabilná na rôzne podmienky pestovania, akceptuje aj nedostatok vlahy a je vysoko mrazuvzdorná. Je považovaná za rastlinu priateľskú k životnému prostrediu, znižujúcu CO_2 emisie, pretože CO_2 uvoľnené pri spaľovaní nepresahuje množstvo fixované fotosyntézou počas rastu. Ozdobnica patrí k tzv. C4 rastlinám, pre ktoré je charakteristická vysoká efektivita fotosyntézy a s ňou súvisiaca vysoká produkcia biomasy. Nemožno ju považovať za invázny druh, nakoľko sa rozmnožuje výhradne vegetatívne, čo však na druhej strane zvyšuje náklady pri zakladaní porastu.

2. Botanická charakteristika *Miscanthus giganteus*

Rod *Miscanthus* zahŕňa vytrvalé trávy z čeľ. *Poaceae.* Pre produkciu biomasy sa za najvhodnejší považuje práve *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu (Greef et Deuter, 1993), ktorý je prirodzeným triploidným hybridom (2n=57) *M. sinensis* Anderss (2n=38) a *M. sacchariflorus* Benth. (2n=76).

Pôvodný genotyp bol objavený v r. 1935 v Japonsku, prevezený bol do Dánska, odkiaľ sa rozšíril do ďalších štátov Európy. *Miscanthus x giganteus* sa rozmnožuje výlučne vegetatívne. Nové porasty sa zakladajú z rizómov (podzemkov) v máji. Počas prvého roku rastliny vytvárajú výhonky vysoké 1 m, rozrastajú sa rizómy tvoriace základy nových výhonkov pre budúcu sezónu. V 3. roku pestovania v klimatických podmienkach SR dosahujú výhonky dĺžku približne 2,5 m, s počtom stebiel 90 a priemernou úrodou suchej biomasy nad 20 t/ha. Rastliny kvitnú začiatkom septembra, súkvetím je metlina, semená sa však kvôli hybridnému triploidnému charakteru netvoria. Biomasa sa zberá skoro na jar, keď počas zimného obdobia dochádza k prirodzenému zníženiu vlhkosti z približne 50 na 10 %.

palivo	***výhrevnosť***
plyn	33,5 MJ/m^3
hnedé uhlie	15,0 MJ/kg
čierne uhlie	26,0 MJ/kg
drevo	14,2 MJ/kg
Miscanthus	**18,0 MJ/kg**

Porovnanie výhrevnosti rôznych druhov paliva

2.1. Zakladanie porastov

Na zakladanie nových porastov sa bežne využívajú segmenty rizómov. Získavajú sa z porastov, ktoré sú optimálne 5-ročné (Christian a kol., 2009), po vyoraní, očistení a rozrezaní na približne 10 cm kúsky. Rastliny sa vysádzajú do sponu 1 x 1 m, takže na hektár plochy treba vysadiť 10 000 rastlín. Produkcia rizómov

je však pomalá a príprava takéhoto sadbového materiálu je náročná na priestor, čas a prácu. Alternatívou ku klasickému množeniu sú *in vitro* techniky umožňujúce rýchle namnoženie geneticky identického materiálu na malom priestore. Po namnožení, zakorenení a presadení do pôdy sa získajú rastliny s koreňovým balom vhodné na presádzanie do poľných podmienok. Nevýhodou takejto sadby je však nutnosť zabezpečiť dostatok vlahy počas výsadby. Priekopnícke práce v tejto oblasti publikovali Nielsen a kol. (1995), Holme a Petersen (1996), Lewandowski (1997), neskôr aj Glowacka a kol. (2010). V ostatných rokoch sa začali vysádzať porasty ozdobnice aj na území Slovenska. Väčšina porastov bola založená z rizómov, v súčasnosti sa overujú možnosti využitia sadby pripravenej v *in vitro* kultúre.

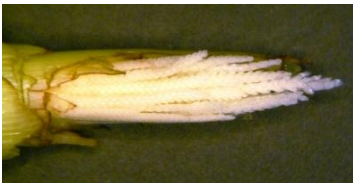
3. Metodika

3.1. Východiskový biologický materiál

Na založenie *in vitro* kultúry *Miscanthus giganteus* sú vhodné nasledovné typy explantátov:

a) segmenty stebla obsahujúce laterálne púčiky (nachádzajúce sa v oblasti kolienka, kryté listovou pošvou) odoberané v mesiacoch máj – júl, vhodnejšie sú rastliny v prvom roku pestovania, pestované v črepníkoch, chránené pred poveternostnými vplyvmi, napr. v skleníku

b) nezrelé súkvetia o dĺžke 5-30 mm izolované z vrcholov stoniek pred objavením sa súkvetia na prelome august/september



Pozn.: Teoreticky sú pre založenie kultúry vhodným explantátom aj segmenty rizómov, nakoľko obsahujú veľké množstvo založených púčikov, z praktického hľadiska je veľmi problematické, až nemožné získať z takéhoto typu explantátu sterilnú kultúru bez použitia antimikrobiálnych látok.

3.2. Sterilizácia rastlinného materiálu

Segmenty stebla s laterálnymi púčikmi očistené od listov o dĺžke 40-50 mm a vrcholové časti stebla s nezrelými súkvetiami zbavené vrchnej vrstvy listov o dĺžke 60-80 mm ponoríme do etanolu a pretrepávame 1 min. Po opláchnutí sterilnou vodou necháme segmenty ponorené 10-20 min. v 5 % roztoku NaOCl (napr. SAVO) za neustáleho trepania. Po sterilizácii opláchneme rastlinný materiál minimálne 3-krát sterilnou redestilovanou vodou.

3.3. Zloženie živných médií

MGI	MGK
MS soli +vitamíny 30 g/L sacharóza 50 mg/L cysteín HCl* 0,4 mg/L BAP	MS soli +vitamíny 30 g/L sacharóza 50 mg/L cysteín HCl 8 g/L agar 5 mg/L 2,4-D 0,1 mg/L BAP
MGM	**MGR**
MS soli +vitamíny 30 g/L sacharóza 50 mg/L cysteín HCl 2,5 g/L Gelrite (Phytagel)** 1-2 mg/L BAP 0,1 mg/L NAA	MS soli +vitamíny 30 g/L sacharóza 50 mg/L cysteín HCl 8 g/L agar 2 mg/L BAP
MGZ	**MGE**
MS soli +vitamíny 30 g/L sacharóza 50 mg/L cysteín HCl 1 mg/L NAA	MS soli +vitamíny 30 g/L sacharóza 50 mg/L cysteín HCl 8 g/L agar 0,2 mg/L BAP

* živné médium obsahuje L-cysteín HCl, ktorý zabraňuje hnednutiu explantátov

** môže byť použité aj tekuté živné médium bez prídavku spevňovacieho činidla

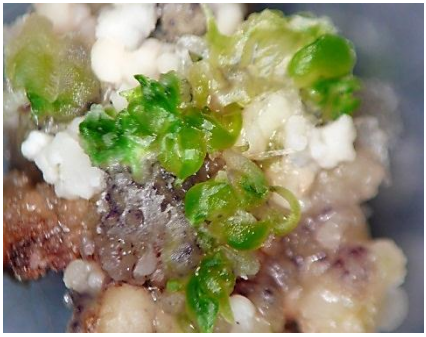
3.4. Založenie *in vitro* kultúry a regenerácia rastlín

Založenie kultúry z laterálnych púčikov

Segmenty stebla sa po sterilizácii orežú približne na 20 mm a kultivujú sa individuálne v skúmavkách v tekutom živnom médiu MGI pre indukciu regenerácie výhonkov. Regenerované výhonky sa približne o 10-14 dní zrežú a prenesú na multiplikačné médium MGM. Explantáty sa kultivujú pri fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma a teplote 24/20°C.

Založenie kultúry z nezrelých súkvetí

Nezrelé súkvetia o dĺžke 5-30 mm sa izolujú z vrcholovej časti stebla, rozrežú sa pozdĺžne na 3-4 časti. Segmenty sa kultivujú na kalus-indukčnom médiu MGK v Petriho miskách alebo sklených pohárikoch (200-300 ml) v tme pri 24 °C 12 týždňov, pričom sa každé 4 týždne prenesú na čerstvé médium rovnakého zloženia. Následne sa kalusy prenesú na regeneračné médium MGR, na ktorom sa kultivujú 4 mesiace vo fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma a teplote 24/20°C, pričom raz mesačne sa odoberajú regenerované výhonky a zvyšné kalusy sa preložia na čerstvé MGR. Regenerované výhonky sa nasádzajú na elongačné médium MGE v sklených pohárikoch typu „detská výživa“ (210 ml), dobre vyvinuté výhonky priamo na multiplikačné médium MGM. Z jedného nezrelého súkvetia môžeme očakávať v priemere 35-65 regenerantov.



3.5. Multiplikácia a uchovávanie regenerovaných výhonkov

K rozmnožovaniu regenerovaných výhonkov sa využíva *in vitro* odnožovanie, ktoré je podporené prídavkom BAP. Multiplikácia môže prebiehať na pevnom živnom médiu MGM v sklených pohárikoch (210-370 ml) alebo v tekutom živnom médiu MGM individuálne v skúmavkách (priemer 25 mm). Pre uchovávanie rastlinného materiálu je možné koncentráciu BAP znížiť na 0,4 mg/L. Rastliny sa

kultivujú vo fotoperióde 16/8 h pri 24/25°C, raz mesačne sa prekladajú na čerstvé živné médium, pričom výhonky sa ponechávajú v malých zhlukoch po 2-4 ks, väčšie výhonky (>25 mm) je možné oddeliť samostatne.

3.6. Zakoreňovanie

Do tekutého zakoreňovacieho média MGZ v skúmavkách (priemer 25 mm) sa nasádzajú individuálne výhonky o dĺžke minimálne 60 mm. Alternatívne je možné zakoreňovať výhonky v sklených pohárikoch v MGZ médiu spevnenom pomocou 2,5 g/L Gelrite. Zakoreňovanie prebieha 3 týždne vo fotoperióde 16/8 h a teplote 24/25 °C.

3.7. Presádzanie do pôdy a aklimatizácia na *ex vitro* podmienky

Rastliny s dobre vyvinutými koreňmi sa presádzajú do plastových zakoreňovačov naplnených záhradníckym substrátom. Odporúčaný objem substrátu je minimálne 150 ml, aby sa vytvoril dostatočný koreňový systém umožňujúci neskôr prežiť rastline v poľných podmienkach. Presadené rastliny sa prekryjú priehľadnou plastovou fóliou, ktorá zabezpečí dostatočnú vlhkosť počas aklimatizácie, pričom po 14 dňoch sa začne postupne fólia odkrývať. Rastliny sa aklimatizujú vo fotoperióde 16/8 h a teplote 15 °C počas prvých dvoch týždňov, v priebehu ďalšieho

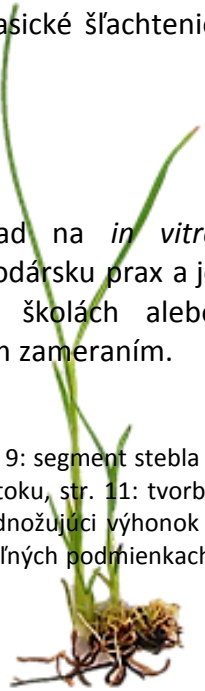
týždňa sa teplota zvýši na 20 °C. O 6-8 týždňov po presadení do pôdy sú rastliny schopné prenosu do poľných podmienok, 2 týždne predtým je vhodné rastliny aklimatizovať na prirodzené vonkajšie podmienky. Počas vysádzania a v období po vysadení je nutné zabezpečiť dostatočnú vlhkosť pôdy. Vysádzanie sadeníc sa odporúča najskôr v 2. polovici mája alebo v júni.

4. Záver

Metodická príručka predstavuje ucelený prehľad spôsobov množenia *Miscanthus giganteus* využitím *in vitro* techník. Využíva dva rôzne prístupy k množeniu a to: a) priamou organogenézou, t.j. indukciou tvorby výhonkov z laterálnych púčikov uložených v kolienkach stebla, b) somatickou embryogenézou, t.j. regeneráciou embryí z buniek kalusu indukovaného na segmentoch z nezrelých súkvetí. Pri oboch spôsoboch regenerácie nasleduje fáza *in vitro* odnožovania, ktorá umožňuje ďalšie namnoženie ako aj uchovávanie rastlinného materiálu. Pred presadením rastlín do pôdy je na nových výhonkoch indukovaná tvorba koreňov. Rastliny sú po 6 týždňoch aklimatizácie schopné prenosu do poľných podmienok. Prežívanie rastlín ako aj prezimovanie v prvom roku po výsadbe, ktoré môže byť pre rastliny kritické, je porovnateľné s konvenčne množenými rastlinami z rizómov. Metodika je využiteľná aj pri *in vitro* šľachtení ozdobnice (mutácie, somaklonálna variabilita, polyploidizácia), nakoľko klasické šľachtenie je pri takýchto hybridoch obmedzené.

5. Uplatnenie metodiky

Metodická príručka predstavuje komplexný pohľad na *in vitro* rozmnožovanie *Miscanthus giganteus* pre poľnohospodársku prax a je vhodným materiálom pre výučbu na stredných školách alebo univerzitách s poľnohospodárskym alebo záhradníckym zameraním.



Obrázky:
Str. 7: rastliny so súkvetiami, str. 8: rizómy / mladý výhonok, str. 9: segment stebla / nezrelé súkvetie / očistené segmenty stebla v sterilizačnom roztoku, str. 11: tvorba somatických embryí na kaluse / regenerácia rastlín, str. 12: odnožujúci výhonok / rastlina presadená do pôdy, str. 13: aklimatizovaná rastlina v poľných podmienkach, obálka vzadu: porast *M. giganteus* v 2. úžitkovom roku

6. Použitá literatúra

Greef, J.M.; Deuter, M. (1993): Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus* GREEF et DEU. Angewandandte Botanik 67, 87-90.

Holme, I.H., Petersen, K.K., (1996): Callus induction and plant regeneration from different explant types of Miscanthus x ogiformis Honda 'Giganteus'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 49, 137–140.

Christian, D.G.; Yates, N.E.; Riche, A.B. (2009): Estimation of ramet production from Miscanthus × giganteus rhizome of different ages. Industrial Crops and Products 30, 176-178.

Lewandowski, I. (1997): Micropropagation of Miscanthus × giganteus. In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 39. High-Tech and Micropropagation V. Springer, Berlin, 239–255.

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

Nielsen, J.M.; Hansen, J.; Brandt, K. (1995). Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in Miscanthus X ogiformis 'Giganteus'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 41, 165–170.

Głowacka, K., Jeżovski, S. and Kaczmarek, Z. (2010). The effects of genotype, inflorescence developmental stage and induction medium on callus induction and plant regeneration in two Miscanthus species. Plant Cell Tiss Organ Cult. 102, 79–86.

7. Publikácie, ktoré predchádzali metodickej príručke

Marcela Gubišová, Jozef Gubiš, Alžbeta Žofajová, Pavol Porvaz (2010): Ozdobnica čínska (Miscanthus sinensis) - perspektívna energetická rastlina. Naše pole. Roč. 14, č. 4, 32-33.

Marcela Gubišová, Pavol Porvaz, Jozef Gubiš, Alžbeta Žofajová, Daniel Mihálik, Ján Kraic (2011): Growing technology and biotechnology of Miscanthus in Slovakia. Pannonian plant biotechnology workshops „The bioenergy question: reality or wishful thinking?“, May 16th-18th 2011, Tulln, 26-28.

Marcela Gubišová, Jozef Gubiš, Alžbeta Žofajová, Daniel Mihálik, Ján Kraic (2013): Enhanced *in vitro* propagation of *Miscanthus×giganteus*. Industrial Crops and Products 41, pp. 279– 282.

Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany *2013*