NÁRODNÉ POĽNOHOSPODÁRSKE
A POTRAVINÁRSKE CENTRUM
VÝSKUMNÝ ÚSTAV RASTLINNEJ
VÝROBY

Množenie *Arundo donax* v *in vitro* kultúre

Metodická príručka

Názov: **Množenie *Arundo donax* v *in vitro* kultúre**

Autor: Mgr. Marcela Gubišová, PhD.

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

Oponenti: Ing. Angela Filová, PhD.
Ing. Alžbeta Žofajová, PhD.

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou

Vydal: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum
Výskumný ústav rastlinnej výroby
Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Rok vydania: 2016

Kontakt na autora: gubisova@vurv.sk

Metodická príručka vznikla za finančnej podpory Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR a je výstupom riešenia projektu „Vývoj a inovácie primárnej rastlinnej produkcie pre zabezpečenie bezpečnosti potravín, udržateľného poľnohospodárstva a zníženia zaťaženia životného prostredia“. Výskum bol tiež financovaný Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-15-0098.

Vymedzenie pojmov

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

GELRITE/PHYTAGEL – spevňovacie činidlo živného média, náhrada agaru, pri mnohých rastlinných druhoch pozitívne ovplyvňuje multiplikáciu

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

MULTIPLIKÁCIA – množenie rastlinného materiálu, napr. množenie výhonkov v *in vitro* kultúre

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 a tvoriaci adventívne korene

VITRIFIKÁCIA – hyperhydratácia, tvorba výhonkov so zmenenou morfológiou a zníženou vitalitou sklovitého vzhľadu

VÝHONKOVÁ KULTÚRA – in vitro kultúra rastlín využívaná najčastejšie na množenie a/alebo uchovávanie rastlinného materiálu

Skratky

BAP – 6-benzylaminopurín, rastový regulátor cytokinínového typu

NAA – kyselina naftyloctová, rastový regulátor auxínového typu

TDZ – thidiazuron, rastový regulátor s cytokinínovou aktivitou

Obsah

1. Úvod 6

2. Botanická charakteristika *Arundo donax* 7

2.1. Zakladanie porastov 8

2.2. Produkcia biomasy 9

3. Metodika 10

3.1. Východiskový biologický materiál 10

3.2. Sterilizácia rastlinného materiálu 10

3.3. Zloženie živných médií 11

3.4. Založenie *in vitro* kultúry a regenerácia rastlín 11

3.5. Multiplikácia regenerovaných výhonkov 12

3.6. Zakoreňovanie výhonkov a uchovávanie výhonkovej kultúry 13

3.7. Presádzanie do pôdy a aklimatizácia na *ex vitro* podmienky 13

4. Záver 14

5. Uplatnenie metodiky 15

6. Použitá literatúra 15

7. Publikácie, ktoré predchádzali metodickej príručke 15

Zoznam obrázkov:

Obálka: 3-ročný porast trsteníka v novembri, str. 7: kvitnúce steblo/biomasa po dosušení/koreňová sústava s rizómami, str. 8: zakladanie porastu zo stonkových odrezkov so sekundárnym steblom a z celých stebiel, str. 9: rastlina z rizómu v apríli v druhom roku pestovania (vľavo) a z *in vitro* sadby v prvom roku, str. 10: stonkový segment s dobre vyvinutým axilárnym púčikom/príprava a sterilizácia explantátov pre založenie *in vitro* kultúry, str. 11: regenerované výhonky, str. 12: individuálny výhonok / trs výhonkov multiplikovaných na živnom médiu s TDZ/ zakorenený výhonok, str. 14: aklimatizovaná sadenica, zadná strana: okrasná forma trsteníka *A. donax* cv. *Variegata*

1. Úvod

Dopyt po obnoviteľných zdrojoch energie rapídne narastá nielen kvôli snahe zabezpečiť energetickú sebestačnosť jednotlivých krajín pri vyčerpávajúcich sa zdrojoch fosílnych surovín, ale najmä z dôvodu environmentálneho znečistenia a s ním súvisiaceho globálneho otepľovania. Popri využívaní odpadov najmä z poľnohospodárskej výroby ako zdrojov energie, obrovské množstvo biomasy môže byť získané cieleným pestovaním energetických rastlín. Efektívnymi zdrojmi biomasy pre tento účel sú introdukované rastlinné druhy. Jedným z nich je aj trsteník obyčajný (*Arundo donax* L.), ktorý je vo svete dobre známou rastlinou s mnohorakým využitím. Pevné nadzemné steblá slúžia v niektorých oblastiach ako stavebný materiál, využívajú sa na výrobu rohoží, rybárskych prútov, chodeckých palíc a hudobných nástrojov. Trsteník pozná tiež Ajurvéda ako liečivú rastlinu. V produkcii biomasy mu naše domáce druhy zďaleka nedokážu konkurovať, navyše sú známe aj jeho fytoremediačné schopnosti, ktoré rastlinám umožňujú rásť na pôdach kontaminovaných, či inak degradovaných. Problém pri zakladaní porastu spôsobuje výhradne vegetatívny spôsob rozmnožovania. Klasické množenie pomocou rizómov, príp. segmentov stoniek je niekedy neefektívne a náročné na priestor a čas. Alternatívou môžu byť explantátové kultúry, ktoré umožňujú kontrolované množenie a uchovávanie rastlín na malom priestore, v krátkom čase a nezávisle od pestovateľskej sezóny. Explantátová kultúra tiež umožňuje šľachtenie materiálu s novými vlastnosťami, ako aj selekciu rastlín adaptovaných na rôzne podmienky prostredia, čo môže mať význam pri fytoremediácii rozsiahlych kontaminovaných plôch. Záujem o pestovanie energetických plodín v ostatných rokoch na Slovensku narastá, avšak problematické množenie *A. donax* je jedným z limitujúcich faktorov rozšírenia jeho pestovateľských plôch.

2. Botanická charakteristika *Arundo donax*

Arundo donax L. patrí medzi najmohutnejšie vytrvalé trávy z čeľ. *Poaceae.* V optimálnych podmienkach dorastá do výšky až 10 m, v našich klimatických podmienkach do 4 – 5 m. Druh pravdepodobne pochádza z Ázie, odkiaľ sa rozšíril do oblasti Stredozemného mora a neskôr do teplých oblastí celého sveta. Rastlina má mohutnú koreňovú sústavu s hľuzovito zhrubnutým podzemkom (rizómom). Nadzemnú časť rastliny tvoria hladké duté steblá s priemerom 1 – 3 cm. Steblá sú pevné, vzpriamené a po celej dĺžke rozdelené uzlami, z ktorých môžu neskôr vyrastať sekundárne steblá. Listy sú rovné, sivo-zelené, dlhé 50 – 70 cm, široké približne 3 cm s rovnobežnou žilnatinou, špicato zakončené. Rastliny kvitnú nepravidelne (nie všetky a nie v každom roku) v priebehu októbra až novembra. Súkvetím je metlina, fertilné semená sa však tvoria len ojedinele a majú veľmi krátku dobu klíčivosti. Z toho dôvodu sa rastliny rozmnožujú výhradne vegetatívne.

2.1. Zakladanie porastov

Na zakladanie nových porastov trsteníka je možné použiť segmenty rizómov, čo sa v praxi využíva najmä pri okrasných formách. Ich príprava je však pomalá a technicky náročná, navyše pri tejto metóde dochádza k likvidácii materského porastu. Z toho dôvodu boli overované možnosti vegetatívneho množenia pomocou nadzemných častí rastliny. S rôznou efektivitou je možné rastliny množiť pomocou segmentov stebiel s axilárnymi púčikmi, ktoré sa nechajú zakoreniť vo vode alebo v pôde, resp. sa do pôdy zhŕňajú celé steblá. Pre takéto množenie sa odporúča využívať sekundárne steblá, ktoré vyrastajú na primárnych steblách až na konci prvej sezóny a vo vyššej miere v nasledujúcom roku (Ceotto a Candilo, 2010). Takéto množenie je však vysoko sezónne závislé, odporúča sa v neskorom lete a je vhodné pre teplé oblasti, kde mladé rastliny nie sú počas zimy ohrozované mrazmi.

V našich klimatických podmienkach je takéto množenie ťažko realizovateľné, pretože nadzemná biomasa počas zimy vymŕza a dostupnosť sekundárnych stebiel je obmedzená. Z vlastných skúseností máme potvrdené, že využitie jednoročných stebiel, hoci aj v skleníkových podmienkach je neefektívne, nakoľko rastliny regenerujú s veľmi nízkou frekvenciou a regenerujúce výhonky nezakorenia a usychajú.

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. Rastliny sa vysádzajú do sponu 1 x 1 m, takže na hektár plochy treba vysadiť 10 000 rastlín. Na základe informácií od pestovateľov bola väčšina porastov na území Slovenska založená z *in vitro* sadby pochádzajúcej z Maďarska.

2.2. Produkcia biomasy

Nadzemná biomasa trsteníka sa zberá väčšinou raz ročne na jar po vymrznutí v mesiacoch február až apríl, ešte pre objavením sa nových výhonkov. Rastliny majú v priemere 30 výhonkov s hrúbkou do 30 mm a výškou 4,5 – 5 m. Vlhkosť biomasy v tomto období je ešte stále vysoká, zvyčajne dosahuje 40 – 45 %. Po prepočítaní na suchú hmotu však úroda biomasy môže v našich podmienkach dosahovať 40 až 70 ton, čo výrazne prevyšuje ostané rastlinné druhy pestované za účelom produkcie energie.

3. Metodika

3.1. Východiskový biologický materiál

Na založenie *in vitro* kultúry *Arundo donax* sú vhodné segmenty stebla s laterálnymi púčikmi (nachádzajúce sa v oblasti kolienka, kryté listovou pošvou alebo tesne nad ňou). Vhodnejšie sú rastliny dopestované v črepníkoch, ktoré majú tenšie steblá a sú chránené pred poveternostnými vplyvmi napr. v skleníku. Pre odber explantátov z rastlín pestovaných v poľných podmienkach odporúčame použiť sekundárne výhonky, ktoré majú hrúbku do 0,5 – 1 cm kvôli jednoduchšej sterilizácii materiálu. Ich odber je v obmedzenom množstve možný koncom pestovateľskej sezóny (september – október). Primárne steblá takýchto rastlín, ktoré sú duté a hrubé až do 30 mm neodporúčame, pretože príprava aseptickej kultúry z nich je problematická. Vhodným materiálom môžu byť tiež sekundárne steblá z materskej rastliny pestovanej celoročne v skleníku vo voľnej pôde.

3.2. Sterilizácia rastlinného materiálu

Segmenty stebla s laterálnymi púčikmi očistené od listov o dĺžke 40 – 50 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 destilovanou vodou. Samotnú sterilizáciu a všetky činnosti až po presadenie rastlín do pôdy vykonávame v aseptickom prostredí.

3.3. Zloženie živných médií

ADI – živné médium pre založenie *in vitro* kultúry, regeneráciu výhonkov z axilárnych púčikov

ADM – živné médiá pre multiplikáciu výhonkov

ADZ – živné médium pre spevnenie a zakoreňovanie výhonkov, ako aj pre *in vitro* uchovávanie klonov trsteníka vo forme výhonkovej kultúry

ADI	ADZ
MS soli +vitamíny* 30 g/L sacharóza 1 mg/L BAP	MS soli +vitamíny* 30 g/L sacharóza 0,5 mg/L BAP 0,1 mg/L NAA 2,5 g/L Gelrite (Phytagel)**
ADM-B	**ADM-T**
MS soli +vitamíny* 30 g/L sacharóza 0,5 mg/L BAP 2,5 g/L Gelrite (Phytagel)**	MS soli +vitamíny* 30 g/L sacharóza 0,2 mg/L TDZ*** 2,5 g/L Gelrite (Phytagel)

* zloženie podľa Murashige a Skoog, 1962; (*pH = 5,8*)

** môže byť použité aj tekuté živné médium bez prídavku spevňovacieho činidla, zvyšuje sa však riziko vitrifikácie výhonkov

*** TDZ ako alternatívu BAP neodporúčame používať pred fázou zakoreňovania

3.4. Založenie *in vitro* kultúry a regenerácia rastlín

Segmenty stebla po sterilizácii orežeme približne na 20 mm a kultivujeme individuálne v skúmavkách v tekutom živnom médiu ADI pre indukciu regenerácie výhonkov. Regenerované výhonky (po vylúčení kontaminovaných) približne o 10 – 14 dní zrežeme a prenesieme na multiplikačné médium ADM-B. Explantáty kultivujeme pri fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma a teplote 24/20 °C.

3.5. Multiplikácia regenerovaných výhonkov

K rýchlemu množeniu regenerovaných výhonkov sa využíva *in vitro* odnožovanie, ktoré je podporené prídavkom rastových regulátorov cytokinínového typu: BAP (živné médium ADM-B) alebo thidiazuron (živné médium ADM-T), na ktorom sa dá očakávať mierne vyšší multilikačný koeficient. Neodporúčame používať thidiazuron v poslednej pasáži pred zakoreňovacou fázou, pretože negatívne ovplyvňuje tvorbu i morfológiu koreňov, čo má za následok slabšie prežívanie rastlín po presadení do pôdy. Multiplikácia môže prebiehať na pevných živných médiách v sklených pohárikoch (210 – 370 ml), v prípade použitia BAP aj v tekutom živnom médiu individuálne v skúmavkách (vhodné sú skúmavky s priemerom min. 25 mm). Pre spevnenie živných médií zásadne uprednostňujeme alternatívne spevňovacie činidlá ako Gelrite alebo Phytagel, nakoľko je na nich možné dosiahnuť signifikantne lepší multiplikačný koeficient v porovnaní s agarom. Pri použití thidiazuronu neodporúčame tekuté

živné médium, pretože táto kombinácia faktorov zvyšuje riziko vitrifikácie výhonkov.

Rastliny kultivujeme vo fotoperióde 16/8 h pri 24/20 °C. Každých 6 týždňov ich prekladáme na čerstvé živné médium, pričom drobné výhonky ponechávame v malých zhlukoch po 2 – 3 ks, väčšie a pevné výhonky (dĺžka > 30 mm) je už možné oddeliť samostatne.

3.6. Zakoreňovanie výhonkov a uchovávanie výhonkovej kultúry

Na zakoreňovanie a uchovávanie výhonkov používame identické živné médium – ADZ, ktoré obsahuje kombináciu rastových regulátorov cytokinínového a auxínového typu (BAP + NAA). Takáto kombinácia rastových regulátorov mierne znižuje multiplikačný koeficient, výhonky sú však pevnejšie a zároveň sa tvorí bohatá koreňová sústava (obrázok na predchádzajúcej strane). Pre zakorenenie výhonkov môže byť použité aj tekuté živné médium v skúmavkách, stúpa však riziko vitrifikácie, čo môže ovplyvniť prežívanie rastlín po presadení do pôdy. Výhonky, ktoré budú použité na zakoreňovanie, by mali byť vitálne a dlhé min. 40 mm. Zakoreňovanie prebieha 4 – 6 týždňov vo fotoperióde 16/8 h a teplote 24/20 °C.

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

Rastliny s dobre vyvinutými koreňmi presádzame do plastových zakoreňovačov naplnených záhradníckym substrátom. Odporúčaný objem substrátu je minimálne 150 ml, aby sa vytvoril dostatočný koreňový systém umožňujúci neskôr rastline prežiť v poľných podmienkach. Presadené rastliny prekryjeme priehľadnou plastovou fóliou, ktorá zabezpečí dostatočnú vlhkosť počas aklimatizácie, pričom po 14 dňoch začneme postupne fóliu odkrývať, čím sa rastliny aklimatizujú na zníženú vlhkosť prostredia. Rastliny aklimatizujeme 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 – 10 týždňov po presadení do pôdy sú rastliny schopné prenosu do poľných podmienok, dva 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 odporúčame v máji, keď už nehrozia jarné mrazy.

4. Záver

Metodická príručka predstavuje jednoduchý postup pre množenie rastlín *Arundo donax* využitím *in vitro* techník. Z časového a priestorového hľadiska predstavuje efektívnu alternatívnu metódu množenia, vyžaduje však základné zručnosti a infraštruktúru pre prácu s *in vitro* kultúrami rastlín. Regenerácia výhonkov prebieha priamou organogenézou z už založených axilárnych púčikov a následnou indukciou multiplikácie výhonkov tzv. *in vitro* odnožovaním. Najväčší problém môže predstavovať samotné založenie aseptickej kultúry kvôli prítomnosti endogénnych kontaminácií vo východiskovom materiáli. Počas jedného roka môžeme teoreticky z jedného axilárneho púčika, ktorý zregeneruje na výhonok, získať až 700 rastlín. Rastliny v *in vitro* kultúre bez problémov zakoreňujú, prežívanie po presadení do pôdy je v optimálnych podmienkach vyššie ako 95 %. Rastliny sú po minimálne 6 týždňoch aklimatizácie schopné prenosu do poľných podmienok. Pôda by však mala byť precízne pripravená a v prípade potreby sadba pri presádzaní a krátko po ňom aj umelo zavlažená.

5. Uplatnenie metodiky

Metodická príručka predstavuje pracovný postup pre *in vitro* rozmnožovanie *Arundo donax* pre poľnohospodársku prax a je vhodným materiálom pre výučbu na stredných školách alebo univerzitách s poľnohospodárskym alebo záhradníckym zameraním. Použitie tejto metodiky predpokladá základné zručnosti užívateľa v oblasti explantátových kultúr.

6. Použitá literatúra

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

Ceotto, E., Candilo, M.D.: Shoot cuttings propagation of giant reed (*Arundo donax* L.) in water and moist soil: The path forward? Biomass and Bioenergy 34, 2010, 1614–1623.

7. Publikácie, ktoré predchádzali metodickej príručke

Marcela Gubišová, Jozef Gubiš, Alžbeta Žofajová, Mária Čičková, Lenka Klčová, Ján Kraic: *In vitro* propagation of gigantic grasses: The case of *Miscanthus giganteus* and *Arundo donax*. Applied natural sciences 2015: Perspectives in V4 countries; the 5th international scientific conference: book of abstracts, September 30-October 2, 2015, Jasná, Low Tatras, Slovak Republic, 102.

Marcela Gubišová, Mária Čičková, Lenka Klčová, Jozef Gubiš: *In vitro* tillering – An effective way to multiply high biomass plant Arundo donax. Industrial Crops and Products 81, 2016, 123–128.

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum

Výskumný ústav rastlinnej výroby

PIEŠŤANY 2016