

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika rozmnožování rostlin podčeledi *Pyroloideae* (hruštičkové) asymbiotickým výsevem *in vitro*



Tomáš Figura, Jan Ponert

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin

červenec 2017

Metodika rozmnožování rostlin podčeledi *Pyroloideae* (hruštičkové) asymbiotickým výsevem *in vitro*

Certifikovaná metodika vypracovaná na Katedře experimentální biologie rostlin PřF UK v rámci projektu MŠMT Centrum experimentální biologie rostlin UK (NPU: LO 1417).

Autoři:

Mgr. Ing. Tomáš Figura (podíl 80 %)

tomas.figura@gmail.com

RNDr. Jan Ponert (podíl 20 %)

ponert@natur.cuni.cz

Oponent:

Mgr. Ing. Pavel Trávníček PhD.

(Botanický ústav AV ČR, v.v.i.)

Obsah

1. Úvod.....	3
2. Cíl metodiky	4
3. Dedikace.....	4
4. Stručný popis metodiky	4
5. Detailní popis metodiky	4
5.1. Potřebné přístrojové vybavení	4
5.2. Potřebné materiálové vybavení	5
5.3. Sběr a skladování semen	5
5.4. Příprava kultivačních médií	6
5.5. Příprava secího aparátu	6
5.6. Příprava roztoku chlorového vápna	6
5.7. Ošetření semen a jejich výsev	6
5.8. Kultivace mladých rostlin.....	8
6. Vliv různých desinfekcí semen na klíčivost hrušičkových <i>in vitro</i>	9
7. Srovnání novosti postupů	10
8. Popis uplatnění certifikované metodiky	10
9. Ekonomické aspekty	11
10. Seznam použité literatury	12

1. Úvod.

Naprostá většina rostlin je po celý život autotrofní. Jen malá část druhů je alespoň část svého života heterotrofní (Leake 1994). Takové rostliny získávají energii a uhlík buď parazitismem na jiných rostlinách (tzv. parazitické rostliny), nebo skrze mykorhizní symbiózu z hub (tzv. mykoheterotrofní rostliny; Eriksson et Kainulainen 2011, Mercx 2013). Mykoheterotrofní druhy rostlin se většinou nedají kultivovat. Šance na navázání funkčního vztahu mezi symbiotickou houbou a mykoheterotrofní rostlinou jsou v umělých podmínkách velice malé a úspěchy se v případech klasické kultivace dostávají zcela ojediněle. Jedinou skupinou mykoheterotrofních rostlin, které lze efektivně kultivovat, jsou orchideje. Ty jsou většinou plně mykoheterotrofní pouze v počátečních stádiích vývoje a tato fáze je tak kritická pro to, aby mohly vyrůst ze semen v dospělé rostliny, které většinou fotosyntetizují. V praxi lze mladé orchideje pěstovat v podmínkách *in vitro*, kde můžeme symbiotickou houbu nahradit živným roztokem (neboli živným médiem). Heterotrofní orchidej potom získává uhlík i energii z živného roztoku a nikoliv ze symbiotické houby, jak je tomu v přírodě. Proto se takový způsob kultivace označuje jako asymbiotická kultivace neboli asymbiotický výsev *in vitro*. Díky tomu, že není nutné pěstovat mykorhizní houby, lze dosáhnout výrazně vyšší úspěšnosti. Celý postup je však nutné optimalizovat pro jednotlivé druhy, protože jejich nároky se mnohdy diametrálně liší. Kultivace na živných médiích se musí provádět za aseptických laboratorních podmínek, protože živné médium by umožnilo velice rychlý růst také mnoha jiným organismům běžně přítomným v okolním prostředí (např. vláknitým houbám, kvasinkám apod.).

Rostliny podčeledi *Pyroloideae* jsou sice orchidejím zcela nepříbuzné, ale mají podobný životní cyklus. Po vyklíčení semen jsou plně mykoheterotrofní a až výrazně později vytvářejí první fotosyntetizující pletiva. To je také jeden z důvodů, proč se tyto výjimečné rostliny nepěstují – nelze je rozmnožovat výsevem ze semen. Přitom se jedná o rostliny poměrně atraktivní a navíc vzácné. Metodika efektivního rozmnožování této skupiny rostlin je proto potřebná jednak pro komerční účely zahradnického průmyslu a jednak pro ochranářské účely a možnosti reintrodukce či posílení přirozených populací. Navíc jedná se o rostliny, kterým je v poslední době věnovaná pozornost jako zdroj léčiv pro farmaceutický průmysl.

2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je vytvořit efektivní způsob výsevu a následné kultivace rostlin podčeledi *Pyroloideae* (hruštičkových) tak, aby bylo možné je pěstovat ze semen.

3. Dedikace

Tato certifikovaná metodika vznikla za podpory MŠMT, konkrétně projektu NPU: LO 1417 (Centrum experimentální biologie rostlin UK).

4. Stručný popis metodiky

Rostliny jsou kultivovány asymbiotickým výsevem *in vitro*. Zralá vysušená semena jsou desinfikována v injekčních stříkačkách s filtrem vyrobeným z nylonové síťoviny. Po desinfekci je suspenze semen ve sterilní vodě vytlačována do kultivačních nádob na povrch kultivačního média BM-1 (van Waes a Debergh 1986). Misky jsou kultivovány ve tmě a stálé teplotě. Starší rostliny jsou přesázeny na čerstvé médium a po založení prvních prýtů jsou kultury umístěny na světlo.

5. Detailní popis metodiky

5.1. Potřebné přístrojové vybavení

pH metr

Autokláv (parní tlakový sterilizátor)

Pipety

Zařízení na výrobu demineralizované vody

Mikrovlnná trouba (pro zahřívání média)

Flow-box (box pro sterilní práci)

Kultivační místnost se stálou teplotou + 21 až 23°C umožňující kultivaci ve tmě a na světle (ozáření cca 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Chladnička

5.2. Potřebné materiálové vybavení

Papírové sáčky

Petriho misky (průměr 9 nebo 6 cm)

Parafilm

Plastové jednorázové injekční stříkačky objemu 3 nebo 5 ml.

Nylonová síť Uhelon

Chlorové vápno

Demineralizovaná či destilovaná voda (vodivost pod 0,2 $\mu\text{s/cm}$)

Autoklávovatelné uzavíratelné nádoby (např. láhev se šroubovacím uzávěrem DURAN, 500 ml, 86 x 176 mm)

Filtrační papír

Filtrační nálevka

Smáčedlo Tween 20

Kyselina sírová

Čistý líh

Pinzety

Nůžky

Kahan

Běžné laboratorní nádobí (kádinky, odměrné válce, baňky)

5.3. Sběr a skladování semen

Plodenství se zralými pukajícími semeníky v celku odstříhneme a ihned umístíme do papírového sáčku. To umístíme do suchého prostoru s pokojovou teplotou, aby vyschnulo. Po vysušení rozebereme plody pinzetami a taktéž pinzetami odstraníme od semen veškeré zbytky plodů i dalších částí plodenství. Takto připravená semena skladujeme v suchu při teplotě 4- 15 °C po dobu max. 1 roku.

5.4. Příprava kultivačních médií

Nejlepší výsledky jsme získali při použití média BM-1 (van Waes a Debergh 1986). Toto médium je snadno dostupné v instantní podobě dehydrovaného prášku obsahujícího gelující agens Gelrite od firmy HiMedia Laboratories (A-516, Swastik Disha Business Park, via Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400 086, India). Tento prášek vsypeme do demineralizované vody, dobře rozmícháme (nejlépe na laboratorní míchačce), doplníme roztok na požadovaný objem, upravíme pH na 5,8 pomocí pH metru a 1M roztoků NaOH a HCl. Roztok krátce povaříme, aby se rovnoměrně rozpustil Gelrite. Horký roztok rozlijeme do autoklávovatelných uzavíratelných nádob (např. láhev se šroubovacím uzávěrem DURAN, 500 ml, 86 x 176 mm) a vysterilizujeme autoklávováním při teplotě 121°C, tlaku 144 kPa po dobu 20 minut. Po vyklávkování necháme média zchladnout na teplotu cca 40°C a při této teplotě je ve flow boxu sterilně rozlijeme do plastových Petriho misek. Po zatuhnutí média misky zavřeme, narovnáme do mikroténového sáčku, sáček zavážeme a misky s médiem skladujeme ve tmě ve stálé teplotě v chladničce (bez mrazu!) maximálně 1 měsíc.

5.5. Příprava secího aparátu

Vybalíme novou nepoužitou stříkačku a jehlu průměru 1,2 mm (1.2×40 (18G \times 1½'')); Luer-Lock). Z nylonové síťoviny ustříháme nůžkami čtvereček o délce strany přibližně 1,5 cm. Tento čtvereček přiložíme středem na hrdlo injekční stříkačky a přes něj nasadíme jehlu. Výsledkem je jedna vrstva nylonové síťoviny uzavřená v hrdle injekční jehly a těsně přiléhající k injekční stříkačce. Tato vrstva bude dále fungovat jako filtr oddělující semena od roztoků. Tento aparát je detailně popsán v práci Ponert et al. (2011).

5.6. Příprava roztoku chlorového vápna

20 g chlorového vápna dobře rozmícháme ve 100 ml demineralizované vody. Necháme 1 hodinu odstát mimo přímé sluneční světlo. Následně roztok přefiltrujeme přes filtrační papír vložený ve filtrační nálevce. Do filtrátu přidáme jednu kapku smáčedla Tween 20, zamícháme a výsledný roztok ihned používáme. Roztok připravujeme vždy čerstvý a neskladujeme ho déle, než 1 hodinu.

5.7. Ošetření semen a jejich výsev

Z injekční stříkačky vytáhneme píst, vložíme suchá přečištěná semena a zpět zasuneme píst. Následně dovnitř nasáváme příslušné roztoky dle tohoto rozpisu:

1. 70% ethanol, protřepat, inkubovat 5 minut, odstříknout;
2. 3 × nasát demineralizovanou vodu, protřepat, odstříknout;
3. nasát demineralizovanou vodu a protřepat;

nyní lze v postupu ihned pokračovat, nebo jej na kratší dobu přerušit (max. 3 hodiny). Dále pokračujeme práci ve Flow-boxu a pracujeme asepticky.

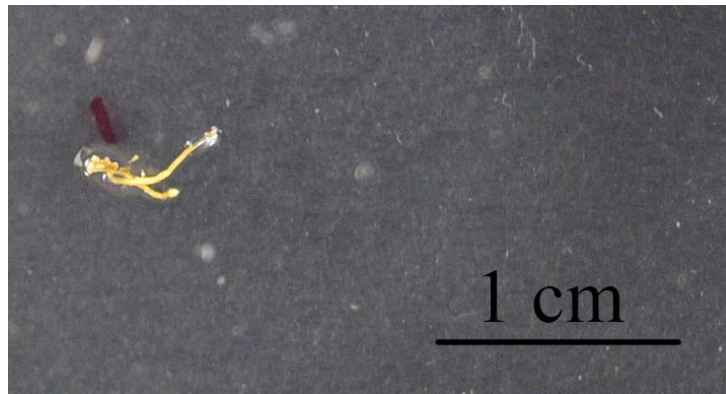
4. Odstříknout vodu, nasát 2% roztok kyseliny sírové, protřepat, inkubovat 10 minut, odstříknout;
5. nasát roztok chlorového vápna, protřepat, inkubovat 10 minut a během této doby roztok vyměnit 3x za čerstvý;
6. 3 × nasát demineralizovanou vodu, protřepat, odstříknout;
7. nasát demineralizovanou vodu a semena ponechat ve vzniklé suspenzi.

Výsledkem je suspenze desinfikovaných semen ve vodě, přičemž by semena neměla zůstat v suspenzi déle než 1 hodinu. Následně vyměníme jehlu s nylonovým filtrem za novou sterilní jehlu průměru 1,8 mm (1,8 × 40 (15G × 1''), Luer-Lock, Dispomedicor Rt, Hungary) bez filtru. Stříkačku protřepeme a suspenzi semen vytlačujeme na povrch média v Petriho miskách. Petriho misky uzavřeme víčkem, horizontálním krouživým pohybem rozprostřeme suspenzi semen po povrchu média a misky na boku obalíme minimálně dvěma vrstvami parafilmu. Voda se do média během několika dnů vsákne.

Dobu inkubace semen v roztocích kyseliny sírové a chlorového vápna lze modifikovat dle konkrétních druhů v rozmezí 5 až 15 minut. Efekt různé doby působení těchto roztoků je specifikován v kapitole 6. „Vliv různých desinfekcí semen na klíčivost hruštičkových *in vitro*“ na straně 9.

5.8. Kultivace mladých rostlin

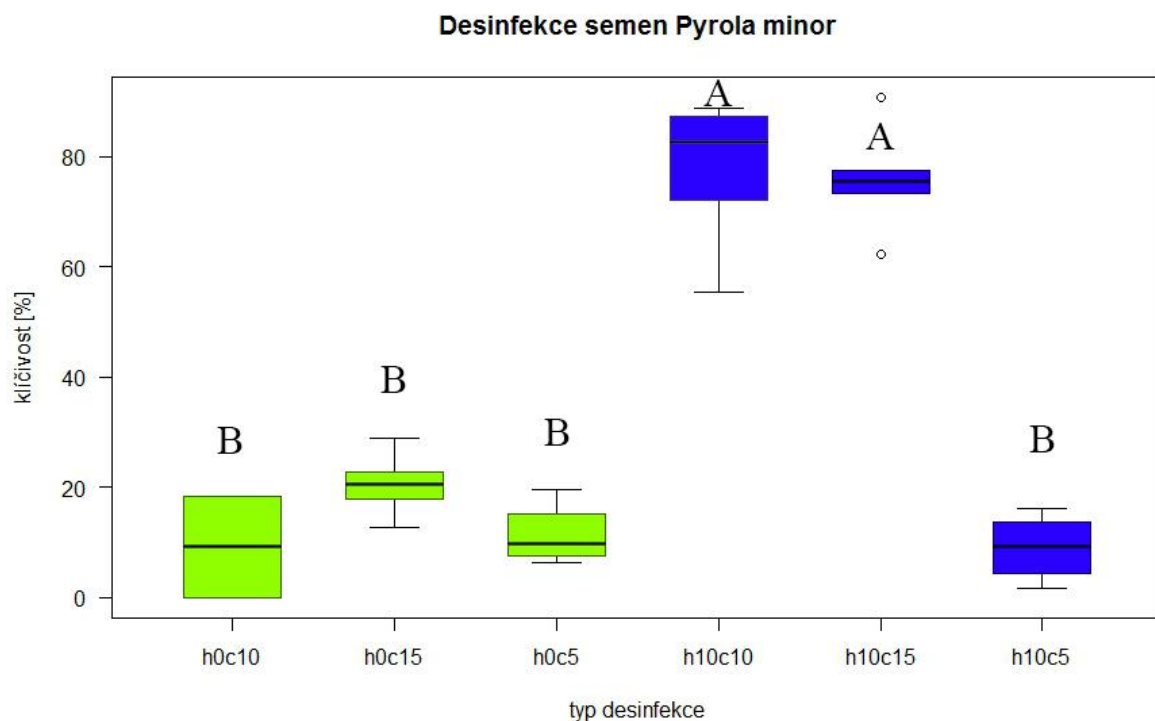
Po výsevu kultury umístíme do tmy a stálé teploty v rozmezí + 21 až 23°C. Kultury kontrolujeme po dvou týdnech od výsevu a následně jednou měsíčně a případné kontaminované Petriho misky vyhazujeme. Pokud rostliny dorostou velikosti 0,5 až 1 cm (Obrázek 1), přesazujeme je na nové médium v kultivačních baňkách 100 ml či jiných nádobách, které svou velikostí umožňují následný vývoj prýtlů. Přesazování provádíme sterilními pinzetami asepticky ve flow boxu. Rostliny dále kultivujeme ve tmě, dokud nezačne vyrůstat první prýt. V té chvíli je ihned umístíme na světlo do stejné teploty, což umožní vývoj zelených prýtlů. V našich podmínkách jsme použili ozáření cca 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a dlouhodobí fotoperiodu (16 hodin světla, 8 hodin tmy).



Obrázek 1: Klíčící *Pyrola media* ve velikosti vhodné na přesazení

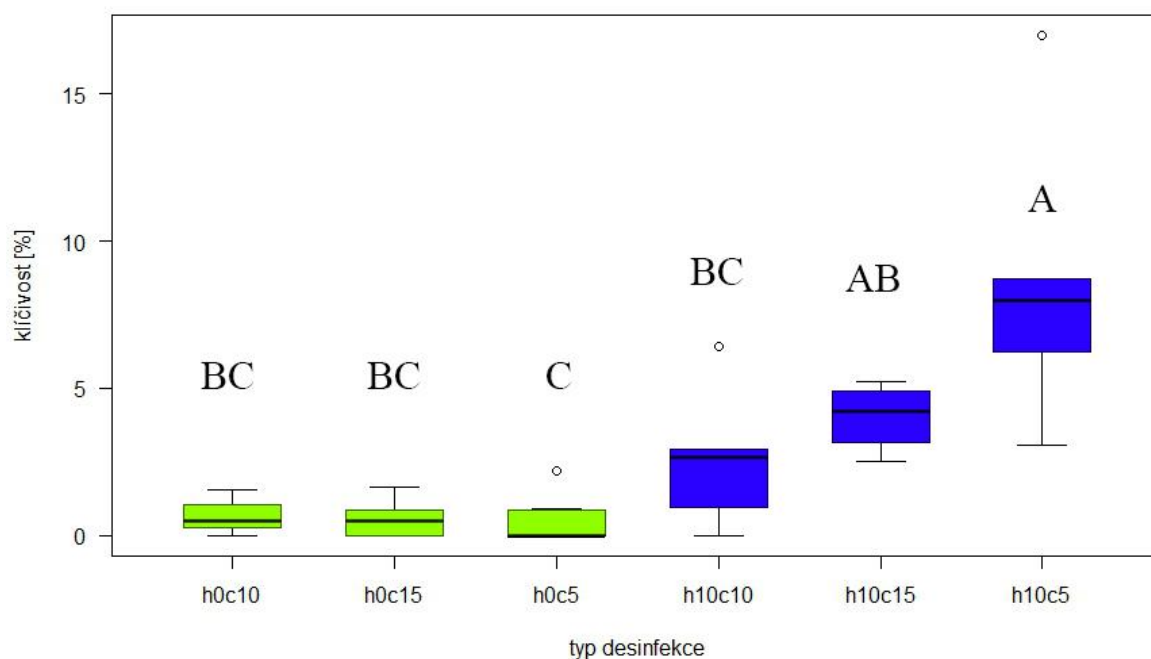
6. Vliv různých desinfekcí semen na klíčivost hruštičkových *in vitro*

Bez použití kyseliny sírové byly klíčivosti výrazně nižší, a proto je její použití nevyhnutné. Optimální doba působení roztoku chlorového vápna se liší mezi druhy. U *Pyrola minor* lze nejlepších klíčivostí dosáhnout při delších dobách působení roztoku chlorového vápna (Graf 1), u druhu *Orthilia secunda* byly ale nejvyšší klíčivosti při nejkratším, 5 minutovém působení (Graf 2).



Graf 2: Efekt různých kombinací sterilizace kyselinou sírovou a chlornanem vápenatým na klíčení semen *Pyrola minor*. Číslo za písmenem H značí dobu působení kyseliny sírové v minutách. Číslo za písmenem C značí dobu působení roztoku chlorového vápna v minutách.

Desinfekce semen *Orthilia secunda*



Graf 3: : Efekt různých kombinací sterilizace kyselinou sírovou a chlornanem vápenatým na klíčení semen *Orthilia secunda*. Číslo za písmenem H značí dobu působení kyseliny sírové v minutách. Číslo za písmenem C značí dobu působení roztoku chlorového vápna v minutách.

7. Srovnání novosti postupů

Tato metodika je první prací, která popisuje úspěšnou kultivaci rostlin podčeledi *Pyroloideae* (hruštičkové) ze semen až do zelených prýtlů. Předchozí práce zabývající se kultivací těchto rostlin dospěly pouze k malým vyklíčeným rostlinkám, které dále nerostly (Christoph 1921, Lihnell 1940, Lück 1941,1942). Popsaný postup je velice podobný asymbiotickému výsevu orchidejí *in vitro*. Tento postup však nikdy nebyl použit u podčeledi *Pyroloideae*. Jelikož se nároky těchto dvou skupin rostlin liší, bylo nutné postup modifikovat. Především se jedná o intenzivnější desinfekci semen.

8. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena několika skupinám uživatelů: (i) Výzkumné instituce mohou pomocí zde popsaného postupu kultivovat jedinečnou skupinu rostlin k výzkumným účelům. O biologii hruštičkových se dosud ví velice málo, z části právě proto, že nebylo možné je kultivovat. (ii) Ochránáři mohou namnožit ohrožené rostliny a pokusit se o posílení populací či reintrodukcii

na zaniklá stanoviště. (iii) Zahradnické firmy mohou připravit semenáče ke komerčním účelům. (iv) Farmaceutický průmysl může namnožit rostliny pro izolaci aktivních léčiv. (v) Jako minoritní uplatnění lze předpokládat také zájem amatérských pěstitelů rostlin o rozmnožování těchto neobvyklých sbírkových rostlin.

Tato metodika je zaměřena na popis postupu umožňujícího vypěstování fotosyntetizujících rostlin podčeledi hruštičkové ze semen.

9. Ekonomické aspekty

Pro pracoviště, kde je zavedená kultivace jakýchkoliv rostlin *in vitro*, jsou náklady na zavedení metodiky prakticky nulové. Jediné, co bude nutné doplnit, je spotřební materiál. Na výsev je potřeba následujících položek, které nejsou běžnou součástí *in vitro* kultivačních postupů:

Položka	Cena za kus [Kč]	Množství výsevů, na které lze položku použít	Cena za jeden výsev [Kč]
Injekční stříkačka	2	1	2
Nylonová síť (1 m ²)	500	4 400	0,12
Injekční jehla 1,8 mm	0,65	1	0,65
Injekční jehla 1,2 mm	0,51	1	0,51
Chlorové vápno	70	30	2,33
Petriho misky (balení 20 ks)	50	4	12,5
Celkem			18,11

Nárůst nákladů oproti klasickým *in vitro* kulturám lze tedy předpokládat o 18,11 Kč na jeden výsev, přičemž v jednom výsevu lze vysít zhruba 300 až 2000 semen. Při klíčivosti 10 % to odpovídá 0,18 Kč na rostlinu, což je vůči běžným nákladům na *in vitro* kultivace zanedbatelné. Popsaný postup tedy svými ekonomickými náklady zhruba odpovídá nákladům na rozmnožování jiných rostlin *in vitro*.

10. Seznam použité literatury

- Christoph H. (1921). Untersuchungen über mykotrophen Verhältnisse der „Ericales“ und die Keimung von Pirolaceen. *Beihefte Botanisches Centralblatt* 38: 115–157.
- Leake, J. R. (1994). The biology of myco- heterotrophic (‘saprophytic’) plants. *New Phytologist* 127: 171–216.
- Lück, R. (1940). Zur Biologie der heimischen Pirola-arten. *Schriften der Koniglichen Physikalisch-Okonomischen Gesellschaft zu Königsberg* 71: 300–334.
- Lück, R. (1941). Zur keimung der heimischen Pirola-Arten. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung* 135: 1–5.
- Lihnell, D. (1942). Keimungsversuche mit Pyrolasamen. *Acta Universitatis Upsaliensis* 6: 1–37.
- Merckx, V. S. F. T. (2013). Mycoheterotrophy: an introduction. In: Merckx V. (eds) *Mycoheterotrophy*. Springer, New York, NY, pp. 1-17.
- Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K., Lipavská, H. (2011). European orchid cultivation - from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* 1: 95–107.
- Waes, J. V., Debergh, P. C. (1986). *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* 67: 253–261.