

MIKROROZMNOŽOVÁNÍ JEŘÁBU A ARONIE

MICROPROPAGATION OF ROWAN AND CHOKEBERRY

Pavla Brandová, Jiří Sedlák, František Paprštejn

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
508 01 Holovousy

e-mail: pavla.brandova@vsuo.cz

ABSTRACT

In our work, we managed to confirm that the growth regulators (especially BAP) can induce proliferation in *in vitro* explant culture of a broader collection of rowan and Aronia genotypes. Depending on the concentration of the respective phytohormone, the multiplication coefficient ranged from 1.4 to 4.1. The formation of roots was induced by substituting cytokinins for auxins in the nutrient agar medium. Among the different auxins tested, *in vitro* shoots of *A. arbutifolia* treated with $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA in MS medium with macro and microelements reduced to one half had the highest percentage (100 %) of rooting. Relatively high percentage 80 % of rooting was also noted on the medium with $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of auxin IBA in *A. melanocarpa* and on medium with $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA in *A. prunifolia*. Obtained results show that, it is possible to efficiently multiply and root studied species in *in vitro* culture.

Keywords: *in vitro* cultures, germplasm, *Sorbus*, *Aronia*, rooting

V naší práci se podařilo u širšího souboru genotypů jeřábu a aronie potvrdit, že lze působením růstových regulátorů (zejména BAP) v podmínkách *in vitro* vyvolat proliferaci postranních prýtů v explantátové kultuře. V závislosti na koncentraci příslušného fytohormonu se koeficient multiplikace pohyboval mezi 1,4 až 4,1. Náhradou cytokininů za auxiny v živném agarovém médiu se podařilo indukovat tvorbu kořenů. Nejlepší výsledek a 100% kořenění byl v našich pokusech pozorován při snížení koncentrace makro a mikroprvků v MS médiu na polovinu a při použití $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ auxinu NAA u *A. arbutifolia*. Velmi vysoké 80% kořenění bylo zaznamenáno na stejném médiu u druhu *A. prunifolia* a u druhu *A. melanocarpa* na médiu s $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ auxinu IBA. Dosažené výsledky ukazují, že studované druhy lze efektivně množit a kořenit v *in vitro* kultuře.

Klíčová slova: *in vitro* kultury, genofond, *Sorbus*, *Aronia*, kořenění

Rody *Sorbus* (jeřáb) a *Aronia* (český botanický název temnoplodec) patří do čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a řadí se mezi méně známé jádrové ovoce. Mezi pěstitelskou veřejností se pro nejčastěji pěstovaný druh temnoplodce *Aronia melanocarpa* (Michx.) Ell. používá název aronie černá. Z důvodu velké podobnosti plodů aronie s jeřábem je také lidově tento druh nazýván černá jeřabina nebo jeřáb černý. Stejně jako i jiné druhy jádrovin (např. muchovník nebo oskeruše) mohou být řazeny zároveň i mezi drobné ovoce. Většina zástupců z těchto rodů nemá velké nároky na životní podmínky a prospívají i na půdách s nižším obsahem živin. Jedná se z hlediska velkovýrobního pěstování o okrajové ovocné druhy, které si však v poslední době získávají stále větší pozornost spotřebitelů, z důvodů pozitivních zdravotních účinků na organismus. V roce 2017 byla celková plocha produkčních výsadeb jeřábu v České republice 17,8 ha (Buchtová 2017).

Jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia* L.) patří k odolným listnatým stromům s rozsáhlým rozšířením v Evropě. Vzhledem k velké odolnosti k drsným klimatickým podmínkám roste od nížin až do vysokých horských poloh. Kromě dřeva poskytuje i velké množství plodů, které jsou v přírodě významnou součástí potravy ptáků a zvěře. Ve Střední Evropě se plody jeřábu používají tradičně k přípravě sirupů, kompotů nebo dochucování jídel. Plody jeřábu se nekonzumují v syrovém stavu, je u nich nutná kuchyňská úprava. Jsou jim připisovány rovněž léčivé protizánětlivé účinky (Vogl *et al.* 2013). Vyskytuje se v různých formách, z nichž hospodářsky významné jsou zejména genotypy odolné k chorobám, rychle rostoucí a poskytující velké úrody výživných plodů. V případě jeřábu odrůdy 'Granátový' použitého v našich pokusech se jedná o mezirodový kříželec jeřábu ptačího a hlohu sibiřského původem z Ruska.

Rod *Aronia* je původem ze Severní Ameriky a zahrnuje tři druhy: *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott (temnoplodec černoplodý), *Aronia arbutifolia* (L.) Pers. (temnoplodec planikolistý) a *Aronia prunifolia* (Marshall) Rehder (temnoplodec třešňolistý). Pro kulturní pěstování se obvykle roubuje *A. melanocarpa* ve školkách ve stromovém tvaru na semenné

podnoži jeřáb ptačí. Plodem jsou purpurově černé malvice o velikosti 6–13 mm, seskupené do chocholíku, dozrávají koncem srpna až začátkem září. Aronie je nenáročná na půdu, avšak kvalitní velké plody se vypěstují na půdách s dostatečnou zásobou živin a na osluněných stanovištích. Vyzrálé plody aronie je možno konzumovat v syrovém stavu, obsahují poměrně velké množství vitamínu C, rutin, karotenoidy a celou řadu minerálních látek. Aronie jsou považovány i za bohatý zdroj fenolových sloučenin, zejména fenolických kyselin a flavonoidů, které přispívají k jejich vysoké antioxidační aktivitě (Ara 2002). Mnoho studií ukazuje ochranný účinek aronie proti karcinomu tlustého střeva (Kulling 2008).

Oba studované druhy je možno množit i semeny. Nevýhodou generativního množení je ale geneticky různorodé potomstvo s nestejnou velikostí a kvalitou plodů. Při rozmnožování odrůd a vybraných ekotypů jeřábu se nabízí i použití tradičních školkařských metod roubování a očkování. Oba způsoby štěpování však vyžadují dopěstování generativního podnožového materiálu, což je časově náročné. Pro zefektivnění školkařské produkce pravokřenných rostlin se jeví jako velmi perspektivní celoroční množení pomocí moderních biotechnologických metod v laboratorních podmínkách ve formě *in vitro* kultur na agarových médiích. Techniky reprodukce jeřábu metodami *in vitro* mají velký potenciál i pro záchranu cenných genotypů a populací u nás původních druhů jeřábů na ohrožených stanovištích (např. jeřáb sudetský).

MATERIÁL A METODY

K výzkumu mikrorozmnožování byl použit materiál z *in vitro* kultur ustavených z pupenových meristémů z genofondové sbírky jeřábu a aronie ve VŠÚ Holovousy s.r.o. z rostlin ověřených z hlediska druhové a odrůdové pravosti.

Veškeré práce související s dělením a přenosem explantátů na nová média probíhaly ve sterilním prostřední flow boxu. Pro zamezení exogenních kontaminací z vnějšího prostředí byly pracovní plochy v laboratoři pravidelně dezinfikovány etanolem. Vrcholky byly pěstovány ve 100ml

Erlenmeyerových baňkách zakrytých hliníkovou fólií s 25 ml MS média (Murashige a Skoog 1962). U použitého média bylo pH upraveno na hodnotu 5,8. Připravená média byla sterilizována za tlaku 100 kPa v parním tlakovém sterilizátoru při 120 °C po dobu 20 minut. Všechna připravená média byla skladována v temnu, aby nedošlo k fotodegradaci účinných látek (zejména fytohormonu BAP) působením světla. V intervalu 25 až 30 dnů probíhalo sterilně kontinuální pasážování. Během kultivace byly explantátové kultury umístěny v kultivační místnosti s kontrolovaným světelným a tepelným režimem – 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 22 ± 1 °C.

Pro výzkum indukce multiplikace a napěstování dostatečného množství rostlin pro další metodické postupy byly využity cytokininy 6-benzylaminopurin (BAP) v koncentracích 1, 2 a 4 mg · l⁻¹, thidiazuron (TDZ) v koncentraci 0,5 a 1 mg · l⁻¹ a 2iP (6-(g,g-dimethylallylamino)purin) v koncentraci 10 mg · l⁻¹. Po autoklávování a částečném zchlazení na 40 °C byly do připravených médií přidány sterilně přes mikrofiltry (supor acrodisc) termolabilní fytohormony TDZ a 2iP.)

Multiplikační koeficient byl vypočítán v každé variantě média jako průměrný počet nových výhonů na výchozí explantát po 1 měsíci růstu na agarovém médiu v kultivační místnosti. V pokusech s multiplikací bylo pro každou odrůdu použito celkem 60 výchozích explantátů. V průběhu kultivace byl sledován vývoj, vegetativní znaky a zaznamenán výskyt případných morfoloických abnormalit.

Pro vyvolání indukce kořenění byly testovány v 50% MS médiu tři druhy auxinů IBA (kyselina beta indolylmásečná), IAA (kyselina beta indolylactová) a NAA (kyselina alfa naftyloctová) v koncentraci 1 mg · l⁻¹. V případě auxinu NAA byla testována rovněž vyšší koncentrace 5 mg · l⁻¹. V pokusech s kořeněním bylo pro každou odrůdu použito celkem 40 výchozích explantátů. Po autoklávování připravených médií byly sterilně přes mikrofiltry (supor acrodisc) přidány všechny testované auxiny. Podmínky kultivace *in vitro* rostlin byly u kořenění stejné jako u fáze množení. Po jednom měsíci na kořenících

médiu byl zaznamenán počet kořenících rostlin a průměrný počet kořenů na jednu rostlinu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V tabulce č. 1 jsou uvedeny multiplikační koeficienty jeřábu a aronie na testovaných médiích. U jednotlivých druhů a genotypů bylo dosaženo rozdílných koeficientů multiplikace. Nejvyšší multiplikační koeficienty v celém hodnoceném souboru 4,1 a 4,0 byly přitom získány na MS médiu s vyššími koncentracemi BAP 2 a 4 mg · l⁻¹ u druhů *A. melanocarpa* a *A. arbutifolia*. U druhu *A. melanocarpa* byl dosažen dostatečně vysoký koeficient multiplikace (3,0) i na médiu s nejnižší testovanou koncentrací BAP 1 mg · l⁻¹. V průběhu jednoho roku lze z jednoho výchozího vrcholu získat při takto vysokých multiplikačních koeficientech až tisíce identických nových rostlin. Dosažené výsledky lze proto využít u výše uvedených dvou druhů temnoploce *A. melanocarpa* a *A. arbutifolia* i pro komerční mikropropagaci. Pro indukci multiplikace v podmínkách *in vitro* kultur u jeřábu se v naší práci potvrdila důležitost fytohormonu BAP. Nejvyšší multiplikační koeficienty byly pozorovány pro všechny testované genotypy na médiích s tímto cytokininem. Vhodnost BAP pro vyvolání proliferace postranních výhonů v explantátové kultuře pozorovaná v našich pokusech je v souladu s výsledky zahraničních autorů dosaženými při *in vitro* množení různých druhů růžovitých rostlin patřících do subtribu *Pyrinae* (Mehri-Kamoun *et al.* 2004, Boudabous *et al.* 2010, Borsai *et al.*, 2017).

Médium s 10 mg · l⁻¹ 2iP nepodporovalo významně tvorbu nových *in vitro* výhonů u jeřábu 'Granátový'. *A. arbutifolia* se na tomto médiu nemnožila vůbec. Multiplikační koeficient po měsíci kultivace byl nízký i u zbývajících dvou druhů *A. prunifolia* (2,1) a *A. melanocarpa* (2,0), což postačuje pouze k založení a udržení *in vitro* kultury, nikoliv však pro mikrorozmnožování v komerčním měřítku. Podobně nízké multiplikační koeficienty byly zaznamenány u studovaných druhů i při použití fytohormonu TDZ.

U testovaných genotypů nebyly v průběhu *in vitro* kultivace pozorovány žádné růstové abnormality, jako je například tvorba kalusu nebo zúžené listy. Rostliny na použitých médiích zdravě prorůstaly a vyvinuly kvalitní olistění. Listy zformované v *in vitro* podmínkách odpovídaly morfologicky rostlinám studovaných druhů na trvalém stanovišti. Pozorované rozdíly ve schopnosti multiplikace mohou pocházet z rozdílného metabolismu auxinů a cytokininů v rostlinném pletivu u jednotlivých genotypů.

Výsledky *in vitro* kořenění pro čtyři použité genotypy a auxiny IAA, IBA a NAA jsou uvedeny v tabulce 2. Náhradou cytokininů za auxiny v živném agarovém médiu se podařilo indukovat tvorbu kořenů. Procento zakořeněných jedinců se pohybovalo v závislosti na použitém fytohormonu a genotypu od 0 do 100 %. Nejvyšší 100% kořenění bylo zaznamenáno u druhu *A. arbutifolia* na médiu s nižší testovanou koncentrací NAA 1 mg·l⁻¹. Velmi vysoké 80% kořenění bylo zaznamenáno na stejném médiu u druhu *A. prunifolia* a u druhu *A. melanocarpa* na médiu s 1 mg·l⁻¹ auxinu IBA. Naopak nejnižší kořenění v celém spektru zkoumaných genotypů bylo dosahováno na médiu s auxinem IAA.

Rostliny jeřábu a aronie s kořeny byly přeneseny do rašelinového substrátu a přemístěny do kultivačního boxu s regulovatelným odvětráváním, kde se podařilo udržet v okolí rostlin téměř 100% vzdušnou vlhkost po dobu 1 týdne. Úspěšnost aklimatizace po následném postupném snižování vzdušné vlhkosti byla 100 %. Podařilo se tak dopěstovat ze všech

zakořeněných *in vitro* explantátů kompletní aktivně rostoucí rostliny, které byly následně přeneseny do standardních pěstebních podmínek. Po převodu zakořeněných rostlin z *in vitro* do *ex vitro* podmínek nebyly pozorovány žádné růstové abnormality nebo morfologické odlišnosti od rostlin jeřábu a aronie namnožených tradičními školkařskými technikami.

ZÁVĚR

V naší práci se podařilo u širšího souboru genotypů jeřábu a aronie potvrdit, že lze působením růstových regulátorů (zejména BAP) v podmínkách *in vitro* vyvolat proliferaci postranních prýtů v explantátové kultuře. V závislosti na koncentraci příslušného fytohormonu se koeficient multiplikace pohyboval mezi 1,4 až 4,1. Výsledky našich pokusů dokladují rozdílnou schopnost multiplikace v podmínkách *in vitro* u jeřábu a aronie. Dostatek výchozího výsadbového materiálu přitom může napomoci rychlejšímu začlenění těchto méně známých druhů do agrárního sektoru České republiky. Tržní potenciál těchto druhů dokladuje to, že v sousedním Polsku s podobnými klimatickými podmínkami byly po roce 2000 vysazeny stovky hektarů aronie s průměrnou velikostí jednotlivých výsadb mezi 5 až 15 ha. Zvýšení zájmu spotřebitelů o ovoce s intenzivně barvícími plody a antioxidačními vlastnostmi jako je aronie lze očekávat ve všech vyspělých zemích včetně Evropy i do budoucna.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledek byl vytvořen za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I, projekt LO1608 „Výzkumné ovocnářské centrum“.

LITERATURA

- ARA, V. Black chokeberry: healthy and soon „in all mouths“. *Flussiges Obst*, 2002, **69**(10): 653–658.
- BORSAI, O., D. CLAPA, A.L. FIRA, M. HARTA, K. SZABO, A.F. DUMITRAS and D. PAMFIL. *In Vitro Propagation of Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. In: *Second International Symposium on Fruit Culture along Silk Road Countries “Fruits for the Future”* [online]. Trebinje, Bosnia and Hercegovina, 2017 [cit. 2019-08-26]. Dostupné z: www.researchgate.net/publication/320566545_In_Vitro_Propagation_of_Aronia_melanocarpa_Michx_Elliott.

- BOUDABOUS, M., M. MARS, N. MARZOUGUI and A. FERCHICHI. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through *in vitro* culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica*. 2010, **157**(3): 513–524.
- BUCHTOVÁ, I. *Situační a výhledová zpráva ovoce*. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2017.
- KULLING, S.E. and H.M. RAWEL. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta medica* [online]. 2008 [cit. 2019-04-07]. **74**(13): 1625–1634. DOI: 10.1055/s-0028-1088306.
- VOGL, S., P. PICKER, J. MIHALY-BISON, N. FAKHRUDIN, A.G. ATANASOV, E.H. HEISS, C. WAWROSCH, G. REZNICEK, V.M. DIRSCH, J. SAUKEL and B. KOPP. Ethnopharmacological *in vitro* studies on Austria's folk medicine – An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013, **149**(3): 750–71.

TABULKY

Tabulka 1. Koeficienty množení jeřábu a aronie

Table 1. Multiplication of rowan and *Aronia*

Cytokinin ¹⁾ (mg · l ⁻¹)	Genotyp ³⁾			
	Jeřáb ²⁾ Granátový	<i>Aronia melanocarpa</i>	<i>Aronia arbutifolia</i>	<i>Aronia prunifolia</i>
BAP				
1,0	2,2	3,0	2,2	1,4
2,0	1,9	4,1	3,4	2,1
4,0	1,2	3,1	4,0	2,5
TDZ				
0,5	1,0	1,0	1,1	1,3
1	1,1	1,3	2,3	2,2
2iP				
10	1,3	2,0	1,0	2,1

1) Cytokinin, 2) Rowan, 3) Genotype

Tabulka 2. Kořenění jeřábu a aronie na 50% MS médiu

Table 2. Rooting of of rowan and Aronia in 50% MS medium

Auxin ¹⁾ Genotyp ²⁾	Kořenící výhony (%) ³⁾	Počet kořenů na jeden výhon ⁴⁾
IAA (1 mg · l ⁻¹)		
Jeřáb Granátový	0	0,0
<i>Aronia melanocarpa</i>	10	1,0
<i>Aronia arbutifolia</i>	20	1,0
<i>Aronia prunifolia</i>	0	0,0
IBA (1 mg · l ⁻¹)		
Jeřáb Granátový	10	1,0
<i>Aronia melanocarpa</i>	80	2,3
<i>Aronia arbutifolia</i>	40	1,8
<i>Aronia prunifolia</i>	40	1,8
NAA (1 mg · l ⁻¹)		
Jeřáb Granátový	0	0,0
<i>Aronia melanocarpa</i>	60	1,8
<i>Aronia arbutifolia</i>	100	3,8
<i>Aronia prunifolia</i>	80	2,3
NAA (5 mg · l ⁻¹)		
Jeřáb Granátový	30	2,7
<i>Aronia melanocarpa</i>	30	2,0
<i>Aronia arbutifolia</i>	70	3,4
<i>Aronia prunifolia</i>	50	1,4

1) Auxin, 2) Genotype, 3) Rooting shoots, 4) Number of roots per one shoot

Obrázek 1. *In vitro* kultura - *Aronia prunifolia*

Picture 1. *In vitro* explant - *Aronia prunifolia*



(autor: P. Brandová)

Obrázek 2. *In vitro* kultura - *Aronia arbutifolia*

Picture 2. *In vitro* explant - *Aronia arbutifolia*



(autor: P. Brandová)

Obrázek 3. *In vitro* kultura - jeřáb 'Granátový'

Picture 3. *In vitro* explant – jeřáb 'Granátový'



(autor: P. Brandová)