

# Optimalizace proliferace korkovníku amurského (*Phellodendron amurense* Rupr.) v podmínkách *in-vitro*

Martin Danzer<sup>1</sup>, Helena Fišerová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně, Fakulta lesnická a dřevařská, Ústav lesnické botaniky, dendrologie a geobiocenologie, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, email: martin.danzer@mendelu.cz

<sup>2</sup>Mendelova univerzita v Brně, Fakulta agronomická, Ústav biologie rostlin, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, email: hfiser@mendelu.cz

## ABSTRACT

*In vitro* propagation of *Phellodendron amurense* Rupr. has been achieved by axillary shoot proliferation. The effect of phytohormones on micropropagation of mature trees of Amur Corktree has been investigated. Nodal segments were used as initial explants for axillary shoot proliferation. Used concentration of cytokinin (BA), plus auxin (NNA) stimulated fast shoot multiplication. The best shoot multiplication response was obtained from nodal explants grown on modified MS 0,4 mg/l BA 0,2 mg/l NAA medium. The results showed that after 41 days of cultivation, 100 per cent of explants were initiated.

## ÚVOD

Korkovník amurský (*Phellodendron amurense* Rupr.) je opadavá dřevina z čeledi Rutaceae, která pochází z oblastí Dálného východu (Mandžusko, ruské Poamuří, Japonsko). Do Evropy byl korkovník dovezen roku 1856 (Svoboda, 1981) a velice rychle se stal pro svůj exotický vzhled a nápadně korkovitou borku oblíbenou dřevinou. Dodnes je pěstován v arboretech a botanických zahradách. První zmínky o možnostech produkčního využívání této dřeviny v ČR pochází už z roku 1912 (Šiman, 1912). Rozsáhlé výzkumy věnované produkčním schopnostem korku a dřeva této dřeviny byly realizovány v 50. letech (Zavadil, 1956a; Kučinskij, 1953). Poslední výzkumy provedené na území České republiky poukazují na významnou produkci surového korku, který je možné těžít bez poškození a ztráty vitality stromu. Při srovnání výtěžnosti felogenů bylo zjištěno, že korkovník rostoucí v našich podmínkách je schopen produkovat větší hmotu korku než ve své domovině (Danzer et al., 2011).

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) řadí korkovník amurský mezi léčivé rostliny pro tvorbou léka, známého pod obchodním názvem Cortex *Phellodendron* (WHO, 2004). Hlavní účinnou látkou je berberin, který dodává léku typicky žlutou barvu, a magnoflorin a palmatin. V oblastech jihovýchodní Asie je sušené léko využíváno v alternativní medicíně jako tradiční homeopatikum (Danzer, 2010). Za zmínku stojí i možné využití metanolového výluhu floému pro hubení podkorního hmyzu (Kawaguchi et al., 1989). Korkovník amurský je především potenciálním zdrojem dřeva, které se dá pro svou texturu použít jako náhrada některých dovážených exotických dřev a korku. Korek by mohl být rovněž využíván zejména jako aglomerovaný izolační materiál ve stavebnictví a v jiných průmyslových odvětvích (Zavadil, 1956b; Jirásek, 1953; Hofman, 1953). Tento příspěvek seznamuje s vegetativním množением korkovníku amurského v podmínkách *in vitro* s cílem intenzivní produkce geneticky identických sazenic, což by vyřešilo problém nedostatečného množství porostů pro získávání osiva a delší generativní množení nejednotného výsadbového materiálu. V souvislosti s odvětvími, kterým může korkovník nabídnout své uplatnění, se reprodukce druhu v podmínkách *in vitro* jeví jako nadějný přístup (Park et al., 1999).

## MATERIÁL A METODY

### *Optimalizace média pro iniciaci proliferace prýtů*

Jako primární explantáty pro založení kultury *in vitro* byly použity axiální řízky dospělých jedinců (55 let), které byly odebrány z vrcholových větví (obr.1). Po sterilizaci segmentů 0,2% HgCl<sub>2</sub> po dobu 27 minut a trojím oplachu ve sterilní destilované vodě byly pupenové nody letorostů vkládány na média MS (Murashige, Skoog, 1962) a WPM (Lloyd, McCown, 1981) s 6-benzylaminopurinem (BA) a kyselinou  $\alpha$ -naftyloctovou (NAA). Založená primární kultura byla uložena v kultivační místnosti při teplotě 22 °C s fotoperiodou 16 hod. světlo a 8 hod. tma (Danzer, Fišerová, 2010). Podle dostupných pramenů byly vybrány tři varianty médií, které byly testovány s cílem optimální multiplikace prýtů - MS 1,7 BA mg/l (Danzer, Fišerová, 2010), WPM 1,7 BA mg/l (Alsalihi et al., 2003) a MS 0,4 mg/l 0,2 mg/l NAA (Azad et al., 2005).

Do 4 týdnů vyrostly z axilárních pupenů prýty schopné dalšího odběru a byl sledován jejich počet. Odebrané prýty byly vkládány na médium MS 0,7 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA a po dalších 4 týdnech kultivace (obr.2) byly zregenerované prýty zakořeňovány v podmínkách *in vitro* a *ex vitro*.



**Obr.1: Proliferace prýtu (rašení pupenu) axiálního řízku**  
Stáří iniciovaného prýtu 6 dní



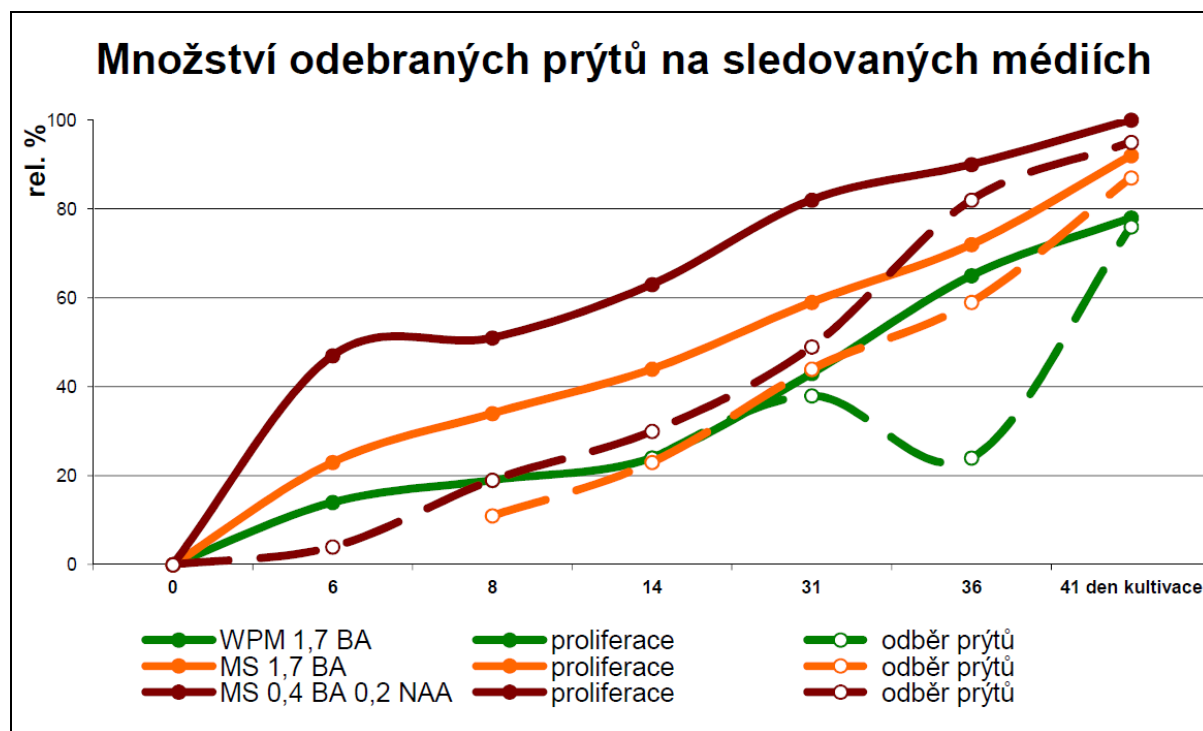
**Obr.2: Multiplikovaná kultura**  
*Phellodendron amurense* na mediu MS 0,7  
BA 0,1 NAA, stáří 24 dní

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### *Optimalizace média pro iniciaci proliferace a multiplikaci prýtů*

Explantáty korkovníku pěstovány na médiích MS a WPM s přidavkem fytohormonů (BA, NAA) vykazovaly diferentní růst. Nejintenzivněji byla proliferace iniciována na mediu MS 0,4 mg/l BA 0,2 mg/l NAA. Na stejném mediu získali Azad et al. (2005) nejlepší výsledky při regeneraci listových explantátů korkovníku. Přestože toto médium v porovnání s ostatními testovanými vykazuje nejlepší výsledky, je vhodné doporučit pro další multiplikaci odebraných prýtů jeho modifikaci. na MS 0,7 mg/l BA a 0,1 mg/l NAA. Při kultivaci prýtů na mediu MS 0,4 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA dochází k výraznější tvorbě kalusu, který multiplikaci inhibuje. Navýšení množství přidaného BA na úkor NAA snižuje tvorbu kalusu a zvyšuje multiplikaci. Nejpomalejší vývoj a zároveň i nejnižší množství odebraných prýtů, které bylo možné získat k další kultivaci, bylo zaznamenáno na mediu WPM 1,7 mg/l BA. Tato citlivost korkovníku amurského na složení media a obsah růstových regulátorů je známá již z předchozích pokusů (Danzer, Fišerová, 2010). K podobnému zjištění dospěli Alsalihi et

al. (2003), kterým se médium WPM při multiplikaci prýtů rodu *Prunus* také neosvědčilo. Graf 1 udává výsledky proliferace a multiplikace dle množství odebraných prýtů na testovaných médiích.



**Graf 1. Množství odebraných prýtů na sledovaných médiích**

Procentuální vývoj proliferace a odběr dostatečně zregenerovaných prýtů axiálních řízků v průběhu 41 dnů kultivace.

Je zřejmé, že při srovnání množství odebraných prýtů v průběhu 41 dní kultivace axiálních řízků byly všechny zregenerované prýty (100%) získány pouze na médiu MS 0,4 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA. V případě média WPM byl 36 den kultivace zaznamenán překvapivý pokles růstu prýtů způsobitelných k odběru (Obr. 1). Pro další multiplikaci prýtů doporučujeme médium MS 0,7 BA a 0,1 NAA, kde dochází ke snížení tvorby kalusu na bázi prýtu a zvyšuje se multiplikace a dozrávání prýtů.

## ZÁVĚR

Ze tří testovaných variant médií s různým množstvím dodaných fytohormonů, které byly použity k iniciaci proliferace a regeneraci prýtů *in vitro*, bylo nejlepších výsledků dosaženo při kultivaci na médiu MS 0,4 mg/l BA 0,2 mg/l NAA. Nejpomaleji regenerovaly prýty axiálních řízků rostoucích na médiu WPM 1,7 mg/l BA. V průběhu růstu na tomto mediu došlo i ke snížení množství odebraných řízků, které se při kultivaci na ostatních médiích zvyšovalo. Růst prýtů a jejich odběr na médiu MS 1,7 mg/l BA vykazoval konstantní vývoj bez zaznamenaných extrémů. Z doložených výsledků je zřejmé, že nejvhodnějším médiem pro regeneraci a proliferaci prýtů je MS 0,4 mg/l BA 0,2 mg/l NAA. Pro další multiplikaci doporučujeme upravit růstové regulátory na 0,7 mg/l BA a 0,1 mg/l NAA, čímž se sníží tvorba kalusu na bázi prýtu.

## SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Alsalihiy A., Křížan B., Fišerová H. Hradilík J. (2003): The effect of four different média on in vitro multiplication of peach rootstocks. *In: NITRA, S.A.O.S. Recent advances in plant biotechnology*. 1. vyd. Nitra, Nitra, IPGB SAS, s. 28.
- Azad M., Yokota S., Ohkubo T., Andoh Y., Yahara S., Yoshizawa N. (2004): Micropropagation of plantlets through callus in Kihada (*Phellodendron amurense* Rupr.). *J. Shita* 16: 122–130.
- Danzer M. (2010): Amur Corktree (*Phellodendron amurense* Rupr.) - Medicinal plant, growing opportunities in the Czech Republic. [CD-ROM]. In Conference proceedings - 2nd International Conference on Horticulture Post-graduate Study. s. 10-18. ISBN 978-80-7375-419-8.
- Danzer M., Fišerová H. (2010): Množení korkovníku amurského (*Phellodendron amurense* Rupr.) v podmínkách *in vitro*. *In: M. Barták, J. Hájek, J. Dubová (eds.): Rostlinné biotechnologie*, 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 38-41. ISBN 978-80-210-5382-3.
- Danzer M., Dymák R., Úradníček L. (2011): Výtěžnost korku korkovníku amurského (*Phellodendron amurense* Rupr.) v české republice. *In: M. Šrámek, P. Sedlák (eds.): SilvaNet - WoodNet*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 23-24. ISBN 978-80-7375-567-6.
- Hofman J. (1953): O korkovníku amurském, *Lesnická práce*, č. 2. 71–77.
- Jirásek V. (1953): O korku a rostlinách korkodárných. *Vesmír*, 32: 361-362.
- Kawaguchi H., Kim M., Ishida M., Ahn, Y.J., Yamamoto T., Yamaoka R., Kozuka M., Goto, K., Takahashi S. (1989): Several Antifeedants from *Phellodendron amurense* against *Reticulitermes speratus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 2635–2640.
- Kučinskij A.F. (1953): Barchat amurskij v kulturach SSSR, *Lesnoje chozjajstvo*, č. 10, s. 35.
- Lloyd G.B., McCown B.H. (1981): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Park Y.G., Chor M.S. (1999): *Phellodendron amurense* (Cork Tree): *In vitro* culture, micropropagation, and the production of berberine. *In: Y.P.S. Bajaj (ed.): Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 43: Méditinal and aromatic plants XI. 1. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 423 p. ISBN 3-540-63911-X, ISSN 0934-943-X.
- Svoboda A.M. (1981): Introdukce okrasných dřevin, nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1. Vydání, 176 s.
- Šiman K. (1912): Aklimatisace cizokrajných dřevin v zemích Československých. *Háj*, 41, s. 100-103
- Zavadil Z. (1956a): Zakládání korkovníkových plantáží. Strnady, VULHM, 37s
- Zavadil Z. (1956b): Technické vlastnosti dřeva a korku korkovníku amurského. Strnady, VULHM, 52s.
- World Health Organization (2004): Monographs on selected medicinal plants, Vol. 4., 444p. ISBN 978 92 4 154705 5

## PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla uskutečněna a prezentována za finanční podpory výzkumného záměru LDF Mendelu v Brně, reg. č. MSM: 6215648902, IGA LDF Mendelu v Brně č. 12/2010.