

MIKROPROPAGACE BŘÍZY TRPASLIČÍ

MICROPROPAGATION OF *BETULA NANA*

PAVLÍNA MÁCHOVÁ - JANA MALÁ - HELENA CVRČKOVÁ

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady

ABSTRACT

Dormant axillary buds of endangered *Betula nana* were used for tissue culture establishment. Optimal cultivation media for organogenesis induction, multiplication and rooting were established. The modified agar medium WPM (LLOYD, McCOWN 1980), with concentrations of phytohormones BAP 0.2 mg l⁻¹ and IBA 0.1 mg l⁻¹ was used for induction of birch organogenesis. The effect of different cytokinins and agars on multiplication was tested. The best results we obtained on WPM medium with concentrations of phytohormones BAP 0.2 mg l⁻¹ and IBA 0.1 mg l⁻¹, 200 mg l⁻¹ of glutamine, 200 mg l⁻¹ of casein hydrolysate, 30 g l⁻¹ of saccharose, and 6 g l⁻¹ of agar from company ROTH, pH adjusted to 5.8. Propagated shoots rooted in the agar WPM medium with concentration IBA (0.5 mg l⁻¹). 100% of rooting rate of microcuttings was reached in this condition. The mortality during acclimatization was not over 2%.

Klíčová slova: bříza trpasličí, mikropropagace, organogeneze

Key words: *Betula nana*, micropropagation, organogenesis

ÚVOD

Bříza trpasličí patří k vzácným glaciálním reliktvům naší přírody, řadíme ji mezi druhy silně ohrožené (C2 - Vyhláška 395/1992 Sb. ve znění vyhl. 175/2006 Sb.) a ve stejné kategorii je i chráněna. Vyskytuje se v severní a východní Evropě, od Grónska po Ural, na jihu po severní Německo, severní Polsko a hory střední Evropy. V České republice se vyskytuje vzácně jen na Šumavě, v Krušných a Jizerských horách. Tento keř dosahující výšky 20 – 50 (max. 120) cm roste na silně kyselých půdách vrchovišť a rašelinných luk podhůří a hor. Pro zachování tohoto silně ohroženého původního druhu byly ověřovány možnosti reprodukce *in vitro* (mikropropagace).

Mikropropagace představuje vhodnou technologii pro konzervaci ohrožených genotypů i rychlé získání dostatečného množství klonového sadebního materiálu pro případnou repatriaci ohrožených druhů rostlin na původní stanoviště. První práce dokazující možnost vypěstování kompletních rostlin z primárních explantátů (výhony, pupeny, listy, zygotická embrya, kotyledony) v podmínkách *in vitro* se u listnatých dřevin datují do 30. let (GAUTHERET 1934, *Ulmus campestris*), u jehličnanů o něco později (BALL 1950, *Sequoia sempervirens*; REINERT, WHITE 1956, *Picea glauca*). V českých zemích byly ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. jako první mikropropagovány počátkem 70. let smrk (*Picea abies*) a douglaska (*Pseudotsuga menziesii*) (CHALUPA, DURZAN 1973). Většinu listnatých dřevin lze úspěšně množit pomocí organogeneze (MALÁ 1998, 2000). Tato metoda byla využita i pro reprodukci vybraných klonů břízy trpasličí. Cílem práce bylo dosáhnout organogeneze, tj. indukce ad-

ventivních nebo axilárních výhonů na primárním explantátu, jejich namnožení, zakořenění a dopěstování kompletních rostlin.

MATERIÁL A METODIKA

Indukce organogeneze

Primární kultury klonů břízy trpasličí byly založeny ze zimních pupenů (sběr v březnu) odebraných ze 7 dospělých donorových stromů v Jizerských horách. Od každého klonu bylo izolováno 30 pupenů, které byly po sterilizaci v 1% roztoku SAVO (Bochemie, ČR) třikrát promyty sterilizovanou vodou. Ve sterilním prostředí byly odstraněny vnější šupiny pupenů a extirpované vzrostné vrcholy byly umístěny na indukční agarové živné médium WPM (LLOYD, McCOWN 1980), s obsahem 0,2 mg.l⁻¹ BAP (6-benzylaminopurine), 0,1 mg.l⁻¹ IBA (β-indolylbutyric acid), glutamin 10 mg.l⁻¹, glycin 2 mg.l⁻¹, sacharóza 30 g.l⁻¹, agar (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., ČR) 6 g.l⁻¹, pH 5,8 (50 ml média v Erlenmeyerově 100ml baňce). Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24 °C, 24hodinové světelné fotoperiodě a s osvětlením o intenzitě 30 μmol.m⁻².s⁻¹.

Multiplikace a testování dvou druhů agaru

Multiplikační fáze probíhala na živném médiu WPM s obsahem BAP 0,2 mg.l⁻¹, IBA 0,1 mg.l⁻¹, glutamin 200 mg.l⁻¹, casein hydrolyzát 200 mg.l⁻¹, glycin 2 mg.l⁻¹, sacharóza 30 g.l⁻¹, agar 6 g.l⁻¹, pH 5,8.

Explantáty byly kultivovány při 24 °C a 24hodinové světelné periodě (36W/33 Philips tubes, Eindhoven, the Netherlands; intenzita osvitů 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (obr. 1). V multiplikační fázi byl ověřován vliv agarového nosiče na multiplikaci. Multiplikační médium bylo připravováno s agarem firmy ROTH a s agarem firmy Dr. Kulich Pharma, s. r. o. (ČL 97).



Obr. 1.
Explantátová kultura břízy trpasličí (foto: J. Dostál)
Fig. 1.
Explant culture of *Betula nana* (photo: J. Dostál)

Testování cytokininů ve fázi multiplikace

Pro testování vlivu cytokininů byly vybrány explantátové kultury břízy trpasličí kultivované 12 měsíců na multiplikačním médiu s obsahem BAP. Bylo odebráno 40 výhonů, výhony byly kultivovány na multiplikačním médiu s testovanými cytokininy BAP v koncentraci 0,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a mT (6-(3-hydroxybenzylamino)purine) v koncentraci 0,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, v experimentu byl použit agar firmy ROTH v koncentraci 6 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pokus probíhal po dobu 12 týdnů, s 4týdenním intervalem pasážování explantátů na čerstvá živná média se stejným složením, poté bylo provedeno zhodnocení morfologické kvality a rychlosti růstu (počet nově vzniklých výhonů a jejich průměrná délka) na testovaných typech kultivačních médií. Experiment byl 3x opakován a získaná data byla vyhodnocena pomocí testu ANOVA a Sheffého metodou (tab. 1).

Zakořeňování

Pro navození rhizogeneze se použilo WPM médium s obsahem 0,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IBA, sacharóza 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, agar (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., ČR) 6 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 5,8, výhony byly kultivovány při 24 °C s 24hodi-



Obr. 2.
Výpěstky *in vitro* břízy trpasličí (foto: J. Vorel)
Fig. 2.
Plantlets of *Betula nana* (photo: J. Vorel)

Tab. 1.
Efektivnost mikropropagace břízy trpasličí
Efficiency of *Betula nana* micropropagation

Klon/ Clone	Počet nově vytvořených výhonů po 12 týdnech kultivace na médiu s BAP \pm SD/Number of new propagated shoots after 3 months of cultivation on medium with BAP \pm SD	Počet nově vytvořených výhonů po 12 týdnech kultivace na médiu s mT \pm SD/Number of new propagated shoots after 3 months of cultivation on medium with mT \pm SD
1	4,00 \pm 0,89	3,67 \pm 0,52
2	3,50 \pm 0,55	4,17 \pm 1,17
3	3,67 \pm 0,82	4,33 \pm 1,37
4	4,17 \pm 0,98	4,17 \pm 0,75
5	4,00 \pm 1,26	4,00 \pm 1,41
6	3,67 \pm 0,52	4,67 \pm 1,03
7	4,67 \pm 0,82	3,83 \pm 1,17

Pozn.: Vliv klonu ani cytokininu na multiplikační fázi nebyl statisticky významný.

novou světelnou periodou (36W/33 Philips Tubes, The Netherlands) a intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Aklimatizace a dopěstování výsadbyšchopných sazenic

Ve fázi aklimatizace byly rostliny s vyvinutým kořenovým systémem přesazeny do agropelitu a jedenkrát denně zalévány základním roztokem MS (MURASHIGE, SKOOG 1962), ředěným 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhala v klimatizované místnosti při teplotě 20°C a 24hodinové světelné fotoperiodě, s osvětlením o intenzitě $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a při 90% relativní vzdušné vlhkosti. Po 14 dnech byly rostliny přesazeny do nesterilního substrátu tvořeného směsí zeminy, rašeliny, perlitu (2 : 1 : 1) a poté byly přeneseny do skleníku, kde byly postupně adaptovány na 70% relativní vzdušnou vlhkost. Pro dopěstování byly použity obaly BBC Growing trays, které nebrání rozvoji kvalitního kořenového systému. Výpěstky *in vitro* byly dopěstovány do výsadbyšchopných sazenic na venkovních záhonech Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (obr. 2).

VÝSLEDKY

Indukce organogeneze

Ze všech odebraných jedinců břízy trpasličí se podařilo založit explantátové kultury. Na indukčním médiu WPM s nízkým obsahem fytohormonů došlo přibližně za 4 – 6 týdnů k proliferaci nasazených explantátů v prýty. V explantátovém archivu je v současnosti vedeno 7 klonů břízy trpasličí.

Multiplikace a ověřování vlivu druhu agaru

Na živném médiu WPM s obsahem BAP $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, IBA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, glutamin $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, casein hydrolyzát $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, glycin $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, sacharóza $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a při použití agaru od firmy Dr. Kulich Pharma, s. r. o. v koncentraci $6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dosahovaly výhony délky 2 – 3 cm, v průběhu multiplikace se vytvářela z jednoho explantátu vícevrcholová kultura tvořená 2 – 3 adventivními výhony. U média s agarem firmy ROTH byly výhony silnější, dosahovaly délky 3 – 6 cm a počet indukovaných výhonů se zvýšil na 3 – 5. V multiplikační fázi se osvědčilo použití agaru firmy ROTH.

Experiment s cytokininy ve fázi multiplikace

Pro indukci adventivních i axilárních pupenů u explantátových kultur břízy trpasličí nebyl mezi testovanými cytokininy pozorován statisticky významný rozdíl. Průměrná multiplikační rychlost, při hodnocení počtu nově vzniklých výhonů na explantátovou kulturu, dosahovala $4,35 \pm 1,09$ výhonů. Klonové rozdíly u explantátů břízy trpasličí nebyly pozorovány a použití rozdílných cytokininů nemělo vliv na morfoloickou kvalitu a délku výhonů ($3,2 \pm 0,6 \text{ cm}$ u všech klonů).

Zakořeňování

Při použití zakořeňovacího modifikovaného média WPM byla u explantátových kultur břízy trpasličí dosažena 100% účinnost zakořeňování. U explantátových kultur břízy trpasličí bylo pozorováno spontánní zakořeňování na multiplikačním médiu.

Aklimatizace a dopěstování výsadbyšchopných sazenic

Ztráty při aklimatizaci nepřesáhly 2 %. Výpěstky *in vitro* byly pěstovány na venkovních záhonech Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. a poté byly vysazeny na výzkumnou plochu

Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. v Jizerských horách (lokality Jizerka).

DISKUSE A ZÁVĚR

Metodiky mikropropagace již byly vypracovány pro celou řadu druhů rodu *Betula*, pro břízu trpasličí však nebylo dosud užití této metody v literatuře popsáno. Podstatou organogeneze jsou morfogenetické pochody probíhající při vytváření axilárních nebo adventivních pupenů. Předpokladem úspěšné organogeneze je zajištění vhodných kultivačních podmínek. Neméně významně ovlivňují výsledný efekt i nepřímé faktory, jako je doba sběru zdrojového materiálu, jeho stáří, fyziologický stav, skladování, povrchová sterilizace a preparace explantátů (MALÁ 2000). Podmínky indukce organogeneze se liší nejen v závislosti na druhu dřeviny, ale u některých druhů se projevuje i klonová specifická (WELANDER 1993). Pro zakládání explantátových kultur u rodu *Betula* lze využít dormantní pupeny, části listů a výhonů (HÄGGMAN et al. 2007). V případě množení dospělých jedinců lze využít jako výchozí materiál dormantní pupeny nebo vrcholy mladých výhonů (CHALUPA 1987; JONES et al. 1996). Výhodné je, že množství odebíraného rostlinného materiálu pro založení primárních kultur je minimální a dárcovský strom se nepoškozuje. Někteří autoři (SIMOLA 1985; ILIEV, TOMITA 2003; AUBAKIROVA, KALASHNIKOVA 2011) při zakládání explantátových kultur u rodu *Betula* vycházejí z metody nepřímé organogeneze, kdy v kontrolovaných podmínkách dochází k tvorbě kalusu u segmentů listu či výhonů a následně se vzniklý kalus využívá jako výchozí materiál pro navození organogeneze. Pro indukci organogeneze u rodu *Betula* se používají média WPM, MS, N6 (WELANDER 1993) s rozdílným obsahem cytokininů. U druhu *Betula pendula* se osvědčilo použití média WPM s obsahem BAP $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v kombinaci s NAA $37 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (HÄGGMAN et al. 2007). CHALUPA (1987) s úspěchem použil pro indukci organogeneze u *Betula pubescens* a *Betula pendula* WPM médium s nižším obsahem BAP ($0,5 - 1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Jako nejúspěšnější médium pro indukci organogeneze u rodu *Betula* označila WELANDER (1993) médium N6 s obsahem $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP a $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA. Jako indukční médium u břízy trpasličí se v naší laboratoři osvědčilo agarové živné médium WPM s obsahem BAP ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a IBA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a nižším obsahem glutaminu $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako vhodné multiplikační médium u rodu *Betula* autoři (HÄGGMAN et al. 2007; WELANDER 1993) uvádí médium WPM s obsahem $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, $0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA nebo $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA nebo $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP a $5,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA. U břízy trpasličí se osvědčilo WPM médium s nižším obsahem BAP ($0,2 - 0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), v rámci pokusů proběhlo také testování nového aromatického cytokininu mT, u něhož statisticky významný vliv na multiplikační rychlost nebyl prokázán.

U explantátových kultur břízy trpasličí byl pozorován výrazný vliv rozdílných typů agaru na multiplikaci. O vlivu rozdílných typů agaru na explantátové kultury různých druhů rostlin psali např. DEBERGH (1983), SCHOLTEN, PIERIK (1998) a CASSELLS, COLLINS (2000). Autoři popisují empiricky vliv agarového média na *in vitro* kultury širokého spektra rostlin. Byly provedeny analýzy složení jednotlivých testovaných agarů (různí výrobci, různé šarže komerčních výrobků apod.), stanoveny jejich fyzikálně-chemické charakteristiky, přesto rozdíly v reakci *in vitro* kultur různých druhů nemají exaktní vysvětlení.

Navození fáze zakořeňování není u explantátových kultur většiny druhů rodu *Betula* obtížné (WELANDER 1993). HÄGGMAN et al. (2007), CHALUPA (1987), KAUPPI et al. (1999) uvádějí 95 – 100% úspěšnost zakořeňování na $1/5 - 1/2$ WPM médiu s $0,1 - 0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IBA a se sníženým obsahem sacharózy $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Také u břízy trpasličí je navození indukce adventivních kořenů snadné, dokonce dochází ke spontánnímu zakořeňování na multiplikačním médiu.

Pomocí vypracované metodiky organogeneze se u silně ohrožené břízy trpasličí podařilo úspěšně dopěstovat kompletní rostliny a v explantátových

tátové bance Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. je dlouhodobě uchováváno po 10 vícevrcholových kulturách od 7 klonů.

Poděkování:

Příspěvek vznikl v rámci řešení výzkumného záměru MZE0002070203.

REINERT J., WHITE P. R. 1956. The cultivation *in vitro* of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*. *Physiologia Plantarum*, 9: 177-189.

SHOLTEN H. J., PIERIK R. L. M. 1998. Agar as gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reportes*, 17: 230-235.

SIMOLA L. K. 1985. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea*. *Scientia Horticulturae*, 26:77-85.

WELANDER M. 1993. Micropropagation of Birch. In: Ahuja, M.R (ed.): *Micropropagation of woody plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 223-246.

LITERATURA

AUBAKIROVA L. S., KALASHNIKOVA E. A. 2011. Experimental morphogenesis in curly birch tissue culture. *Russian Agriculture Sciences*, 37: 109-110.

BALL E. 1950. Differentiation in callus of *Sequoia sempervirens*. *Growth*, 14: 295-325.

CASSELLS A. C., COLLINS I. M. 2000. Characterization and comparison of agars and other gelling agents for plant tissue culture use. In: Cassells A. C., Doyle B. M., Curry R. F. (eds.): *Proceedings of the international symposium on methods and markers for quality assurance in micropropagation*. *Acta Horticulturae*, 530: 203-212.

DEBERGH P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, 59: 270-276.

GAUTHERET R. 1934. Culture du tissu cambial. *C.R Hebd. Seanc., Acad. Sci. Paris*, 198: 2195-2196.

HÄGGMAN H., SUTELA S., WELANDER M. 2007. Micropropagation of *Betula pendula* ROTH including genetically modified material. In: Jain S. M., Häggman H. (eds.): *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht, Springer: 153-162.

CHALUPA V., DURZAN D. J. 1973. Growth and development of resting buds of conifers *in vitro*. *Canadian Journal of Forest Research*, 3: 196-208.

CHALUPA V. 1987. European hardwoods. In: Bonga J. M., Durzan D. J. (eds.): *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrecht, Nijhoff: 224-246.

ILIEV I., TOMITA M. 2003. Micropropagation of *Betula pendula* ROTH. „Fastigiata“ by adventitious shoot regeneration from leaf callus. *Propagation of Ornamental Plants*, 3 (1): 20-26.

JONES O. P., WELANDER M., WALLER B. J., RIDOUT M. S. 1996. Micropropagation of adult birch trees: production and field performance. *Tree Physiology*, 16: 521-525.

KAUPPI A., KAUPPI M., ULVINEN T. 1999. A new columnar form of *Betula pubescens* from Finland: morphological characteristics and micropropagation. *Annales Botanici Fennici*, 36: 33-41.

LLOYD G., MCCOWN H. B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Intern. Plant. Propag. Soc.*, 30: 421-427.

MALÁ J. 1998. Biotechnologické metody množení a šlechtění lesních dřevin. *Závěrečná zpráva VÚLHM*.

MALÁ J. 2000. Zachování a reprodukce genových zdrojů okrajových a ohrožených lesních dřevin s využitím moderních biotechnologických metod. *Závěrečná zpráva VÚLHM*.

MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

MICROPROPAGATION OF *BETULA NANA*

SUMMARY

Betula nana belongs to strongly endangered species in the Czech Republic. At the present time, it occurs rarely only in the Šumava, the Ore and the Jizerské Mountains. *Betula nana* is bush form of birch species. Micropropagation represents more effective technology enabling the reproduction of plants. The organogenesis is regarded as the most advantageous technology that proved suitable for clonal propagation of particularly broad-leaved trees. In this study a micropropagation *in vitro* technology, the standardized induction of organogenesis, multiplication, rooting and acclimatization procedures are described.

Dormant axillary buds were used for tissue culture establishment. The modified agar medium WPM (LLOYD, MCCOWN 1980), with concentrations of phytohormones BAP 0.2 mg l⁻¹, and IBA 0.1 mg l⁻¹, 10 mg l⁻¹ glutamine, 30 g l⁻¹ sucrose, and 6 g l⁻¹ agar (ČL 97, Dr Kulich Pharma, Ltd.), pH adjusted to 5.8 was used for induction of birch organogenesis. After 4–6 weeks, the cultures were transferred onto the multiplication WPM medium with concentrations of phytohormones BAP 0.2 mg l⁻¹ or 0.5 mg l⁻¹, and IBA 0.1 mg l⁻¹, 200 mg l⁻¹ glutamine, 200 mg l⁻¹ casein hydrolysate, 30 g l⁻¹ sucrose, and 6 g l⁻¹ of agar, pH adjusted to 5.8 (Fig. 1). We tested two types of agars, agar from company ROTH and agar from company Dr. Kulich Pharma Ltd. (ČL 97). For multiplication of *Betula nana* the agar ROTH was effective. The effect of different cytokinins (BAP 0.5 mg l⁻¹ and mT 0.5 mg l⁻¹) on multiplication was tested (Tab. 1). The data were analysed by ANOVA and Sheffé's method. There were no significant differences in the number of new shoots among clones cultivated on the same media and with different cytokinins. The cultures were transferred every 4 weeks. The agar-WPM medium without cytokinins but with concentration of auxin IBA (0.5 mg l⁻¹), and 10 g l⁻¹ of sucrose was used for induction of rhizogenesis. This medium gives 100% rooting. Cultivation proceeded in air-conditioned room at 24°C, and under white fluorescent light (36W/33 Philips tubes, Eindhoven, the Netherlands; 30 μmol m⁻² s⁻¹), and a 24hrs photoperiod. Plants with well-developed roots were transferred from rooting medium into pots (Quick Pot T 35) with agroperlite and watered by basal MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) medium without phytohormones and sucrose diluted by distilled water 1:10. Acclimatization proceeded in air-conditioned room at 20°C, and under white fluorescent light (36W/33 Philips tubes, Eindhoven, the Netherlands; 30 μmol m⁻² s⁻¹), and 24hrs photoperiod at the 90% of relative air humidity. After 3 weeks, the plants were transferred into pots (Quick Pot T 60) with non-sterile substrate (in relations 2 soil : 1 peat : 1 agroperlite), and located in glasshouse, where they were adapted for 3–4 weeks to the 70% of relative air humidity. Acclimatized plants were planted onto outdoor beds (Fig. 2). The mortality during acclimatization did not exceed 2%.

By means of described micropropagation procedures, viable plantlets of *Betula nana* were reproduced.

Recenzováno

ADRESA AUTORA/CORRESPONDING AUTHOR:

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D., Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště, Česká republika
tel.: 257 892 268; e-mail: machova@vulhm.cz