

VYUŽITÍ METODY MIKROPROPAGACE PRO ZÁCHRANU SILNĚ OHROŽENÉHO DRUHU BŘÍZY TRPASLIČÍ (*BETULA NANA*)

LESNICKÝ PRŮVODCE



Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, Ph.D.
RNDr. JANA MALÁ, CSc.
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, Ph.D.



Certifikovaná metodika

1/2015

Využití metody mikropropagace pro záchranu silně ohroženého druhu břízy trpasličí (*Betula nana*)

Certifikovaná metodika

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

RNDr. Jana Malá, CSc.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Strnady 2015

Lesnický průvodce 1/2015

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

<http://www.vulhm.cz>

Vedoucí redaktor: Ing. Jan Řezáč; e-mail: rezac@vulhm.cz

Výkonná redaktorka: Miroslava Valentová; e-mail: valentova@vulhmop.cz

Grafická úprava a zlom: Klára Šimerová; e-mail: simerova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-093-5

ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION OF *BETULA NANA*

Abstract

Betula nana belongs to strongly endangered species in the Czech Republic. At the present time, it occurs rarely only in the Šumava and the Ore 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. Procedures for regeneration from explants up to plantlets were standardized. Shoots from multiapex cultures were used for rhizogenesis. After acclimatization, the plantlets were cultured up to plantlets capable of outplanting. Keeping of technology criteria of explant culturing, the plantlets meet the requirements of quality of planting material.

Keywords: *Betula nana*; micropropagation; organogenesis; preservation of gene sources

Oponenti: Ing. Lada Krnáčová, Ministerstvo zemědělství, Praha 1
Ing. Jiří Sedlák, Ph.D., Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský,
Holovousy, s. r. o.

Adresa autorů:

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

RNDr. Jana Malá, CSc.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště

e-mail: machova@vulhm.cz

mala@vulhm.cz

cvrckova@vulhm.cz

Obsah:

I.	Cíl metodiky.....	7
II.	Vlastní popis metodiky.....	7
	1. Úvod	7
	2. Standardizovaný metodický postup mikropropagace	8
	2.1 Zakládání primárních kultur	8
	2.2 Kultivační podmínky multiplikace	9
	2.3 Zakořeňování a aklimatizace	9
	2.4 Výsadba na venkovní plochy	10
III.	Srovnání novosti postupů	12
IV.	Popis uplatnění metodiky.....	12
V.	Ekonomické aspekty	13
VI.	Dedikace.....	13
VII.	Seznam použité související literatury.....	14
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	15
	Summary	16

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je přispět k záchraně a konzervaci genetických zdrojů silně ohroženého druhu břízy trpasličí a podpořit udržení biologické rozmanitosti.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. 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 a v Krušných 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 byla vypracována standardizovaná metoda reprodukce *in vitro* (mikropropagace).

Mikropropagace představuje vhodnou technologii pro konzervaci ohrožených genotypů i rychlé získání dostatečného množství klonového sadebního materiálu pro případnou reintrodukcii ohrožených druhů rostlin na původní stanoviště. Pro většinu listnatých dřevin lze s úspěchem využít metodu organogeneze (MALÁ 1998, 2000). Efektivní postupy mikropropagace (organogeneze) jsou založeny na indukci morfogenetických procesů probíhajících při vytváření axilárních nebo adventivních pupenů na primárním explantátu. Předpokladem úspěšnosti této metody je zajištění vhodných kultivačních podmínek, zejména chemického složení živného média, koncentrace a poměru fytohormonů, teploty, vlhkosti a osvitového režimu. Úspěšnost organogeneze významně ovlivňují i takové faktory jako je stáří a fyziologický stav dárcovského jedince, doba sběru, způsob a délka skladování zdrojového materiálu, povrchová sterilizace a technika preparace explantátů. Pro efektivní využití této metody je neméně důležité i vypracování postupů rhizogeneze a aklimatizace multiplikovaných explantátů. Dodržením ověřených metodických postupů lze dosáhnout efektivní reprodukce požadovaných genotypů. Metoda organogeneze byla využita i při reprodukci vzácných a endemických druhů lesních dřevin, např.

jeřábů, jabloně lesní a hrušně polničky (MALÁ et al. 2012, 2013, 2014). Využití metody mikropropagace pro reprodukci ohroženého druhu *Betula uber* (Ashe) Fernald popsali JAMISON a RENFROE (1998).

V České republice byla metoda *in vitro* využita pro reprodukci břízy trpasličí při založení archivu explantátů a vypracování standardizované metody dopěstování kompletních rostlin s cílem získat reprodukční materiál, který je možné využít i pro případnou reintrodukcii.

2. Standardizovaný metodický postup mikropropagace

2.1 Zakládání primárních kultur

V jarním období (březen – v závislosti na průběhu počasí a nadmořské výšce stanoviště) ještě před vyrašením pupenů se odebírají rouby z donorových jedinců (cca 20 pupenů od 1 klonu). Množství odebíraného rostlinného materiálu pro založení primárních kultur je minimální a dárcovský strom se tedy nepoškozuje. Odebíraný materiál se označí, vloží do mikrotenového sáčku a na převoz se uskladní do chladové tašky. Rouby se uchovávají při 4 °C a je vhodné zpracovat rostlinný materiál (pupeny) co nejdříve, max. do 14 dnů po odběru. Sníží se tím riziko šíření infekcí a poškození apikálního meristému.

Jednotlivé pupeny se sterilizují v 1% roztoku SAVO (Bochemie, ČR) a třikrát promyjí sterilní destilovanou vodou. Ve sterilním prostředí v laminárních flowboxech se odstraní vnější šupiny pupenů a extirpované vzrostné vrcholy se umístí na indukční agarové živné médium (50 ml média v Erlenmeyrově 100ml baňce). K indukci organogeneze se používá modifikované WPM médium (LLOYD, McCOWN 1980), s obsahem 0,2 mg.l⁻¹ BAP (6-benzylaminopurine), 0,1 mg.l⁻¹ IBA (β-indolylbutyric acid), glutaminu 10 mg.l⁻¹, glycinu 2 mg.l⁻¹, sacharózy 30 g.l⁻¹, agaru (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., ČR) 6 g.l⁻¹, pH 5,8. Kultivace probíhá v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24 °C, 16hodinové světelné fotoperiodě a s osvětlením o intenzitě 30 μmol.m⁻².s⁻¹.

Na indukčním médiu WPM s nízkým obsahem fytohormonů dochází za ca 4–6 týdnů k proliferaci nasazených explantátů v prýty.

2.2 Kultivační podmínky multiplikace

Po vyrašení axilárních, případně adventivních pupenů na primárním explantátu jsou kultury *in vitro* břízy trpasličí kultivovány na multiplikačním médiu WPM s koncentrací BAP $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, IBA $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$, glutaminu 200 mg.l^{-1} , caseinu hydrolyzátu 200 mg.l^{-1} , glycinu 2 mg.l^{-1} a sacharózy 30 g.l^{-1} , 6 g.l^{-1} agaru od firmy ROTH, pH 5,8.

U explantátových kultur břízy trpasličí byl pozorován výrazný vliv rozdílných typů agarů na multiplikaci. Vliv rozdílných typů agarů na růst explantátových kultur různých druhů rostlin popsalo více autorů, např. DEBERGH (1983), SCHOLTEN, PIERIK (1998) a CASSELLS, COLLINS (2000). Přestože byly provedeny analýzy složení jednotlivých testovaných agarů (různí výrobci, různé šarže komerčních výrobků apod.) a stanoveny jejich fyzikálně-chemické charakteristiky, rozdíly v reakci *in vitro* kultur různých druhů na agarové agens nemají exaktní vysvětlení. V multiplikační fázi se pro explantátové kultury břízy trpasličí osvědčilo použití agaru firmy ROTH. Explantáty v multiplikační fázi jsou kultivovány při $24 \text{ }^\circ\text{C}$ a 24hodinové světelné periodě (36W/33 Philips tubes, The Netherlands; intenzita osvětlení $30 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (obr. 1).



Obr. 1: Explantátová kultura břízy trpasličí
Fig. 1: Explant culture of *Betula nana*

2.3 Zakořeňování a aklimatizace

Výhony z vícevrcholových kultur určených pro odběr mikrořízků za účelem dopěstování kompletních rostlin se přesazují na médium WPM s obsahem $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA, sacharózy 10 g.l^{-1} , agaru (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., ČR) 6 g.l^{-1} , pH 5,8, výhony jsou kultivovány při $24 \text{ }^\circ\text{C}$ na světle (36W/33 Philips Tubes, The Netherlands)

s 24hodinovou světelnou periodou a intenzitou osvětlení $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. První kořeny se objevují v průběhu 4–6 týdnů. Při použití zakořeňovacího modifikovaného média WPM byla u explantátových kultur břízy trpasličí dosažena 100% účinnost zakořenění. U explantátových kultur břízy trpasličí dochází i ke spontánnímu zakořeňování na multiplikačním médiu.

Rostliny s vyvinutými kořeny se přesazují ze zakořeňovacího média do sadbovačů Quick Pot T 35 s agroperlitem (Perlit Praha spol. s. r. o.) a dvakrát týdně se zalévají tekutým základním médiem MS (MURASHIGE, SKOOG 1962), bez fytohormonů a sacharózy a ředěným v poměru 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhá v obdobných kultivačních podmínkách (teplota 24°C , osvětlení o intenzitě $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), s 24hodinovou světelnou fotoperiodou a při 90% relativní vzdušné vlhkosti.

Po třech týdnech v agroperlitu se rostliny přesazují do sadbovačů Quick Pot T 60 (rozměr $350 \text{ mm} \times 215 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$, s 15 buňkami) s nesterilním pěstebním substrátem ze směsi zeminy (Zahradnický substrát a. s. Soběslav), rašeliny (Rašelina a. s. Soběslav) a perlitu (Perlit Praha spol. s. r.o.) v poměru 2 : 1 : 1 a přenášejí se do skleníku, kde se postupně adaptují (3–4 týdny) na 70% relativní vzdušnou vlhkost. Pro růst v agroperlitu i pěstebním substrátu se osvědčily sadbovače Quick Pot firmy HERKUPLAST – KUBERN GmbH, které nebrání rozvoji kvalitního kořenového systému. Jejich předností je, že nemají pevné dno a kořenový systém rostlin se může dobře vyvíjet na vzduchovém polštáři. Dalšími výhodami jsou rozměry a kónický tvar sadbovačů, které jsou vhodné pro růst kosterních kořenů, a dále rozmístění vertikálních žebér na vnitřní straně sadbovačů, které napomáhají správnému vývoji kořenů. Tento postup a použití biologicky ověřených sadbovačů zabraňuje nežádoucím odchylkám růstu a nepřijatelné deformaci kořenů ve smyslu platné ČSN 48 2115.

2.4 Výsadba na venkovní plochy

Po aklimatizaci se výpěstky *in vitro* vysazují k dopěstování na venkovní záhony, případně se přesadí do vhodných obalů, které umožňují správný růst kořenového systému, viz Katalog biologicky ověřených obalů (www.vulhmop.cz). Po dopěstování výsadbyschopných sazenic na venkovním záhonu lze výpěstky *in vitro* břízy trpasličí použít pro případnou reintrodukcí (obr. 2).

Vysvětlivky:

BAP – 6-benzylaminopurine; **MS** – Murashige Skoog médium; **IBA** – β -indolylbutyric acid; **WPM** – Woody Plant médium



Obr. 2: Výpěstky *in vitro* břízy trpasličí

Fig. 2: Plantlets of *Betula nana*

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Standardizovaná metodika mikropropagace pro vegetativní reprodukci břízy trpasličí dosud nebyla popsána, spočívá ve využití metody indukce organogeneze *in vitro* pro reprodukci dospělých stromů, v optimalizovaném průběhu multiplikace a v doporučeném postupu zakořeňování a aklimatizace.

U rodu *Betula* se pro mnoho druhů pro indukci organogeneze osvědčilo WPM médium, např. HÄGGMAN et al. (2007) jej použili u druhu *Betula pendula*. CHALUPA (1987) s úspěchem použil WPM médium s nižším obsahem BAP (0,5–1 mg.l⁻¹) pro indukci organogeneze u *Betula pubescens* a *Betula pendula*. Pro druh *Betula platyphylla* se pro navození indukce organogeneze rovněž použilo WPM médium s obsahem BAP 1 mg.l⁻¹ (ZENG et al. 2015).

U břízy trpasličí se osvědčilo pro indukční i multiplikační fázi WPM médium s nižším obsahem BAP (0,2 mg.l⁻¹). U explantátových kultur břízy trpasličí byl pozorován výrazný vliv rozdílných typů agarů na fázi multiplikace.

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. Také u břízy trpasličí je navození indukce adventivních kořenů snadné, dokonce dochází ke spontánnímu zakořeňování na multiplikačním médiu.

Byly vypracovány standardní technologické postupy, pomocí nichž lze u silně ohrožené břízy trpasličí úspěšně dopěstovat kompletní rostliny, které je možné využít i pro případnou reintrodukcii.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Betula nana patří v ČR k silně ohroženým druhům, jedná se o druh boreální. Jednou z možností jeho záchrany je mikropropagace v definovaných *in vitro* podmínkách, v nichž jsou vyloučeny nepříznivé faktory limitující přirozenou obnovu ohrožených druhů. Tyto technologie zaručují i genetickou identitu množného materiálu (D'AMATO 1978).

Významnou výhodou mikropropagačního postupu je možnost množení z meristemických pletiv, která jsou prostá patogenních zárodků, takže získaný sadební materiál může napomoci při ozdravování napadených populací.

Z ekonomického hlediska je nepřehlédnutelné, že mikropropagovaný rostlinný materiál, který se uchovává v archivu explantátů, lze kdykoliv použít pro další namnožení neomezeného počtu jedinců v relativně krátkém časovém období.

Uplatnění metodiky je především v zajištění zachování biodiverzity lesních ekosystémů, namnožený materiál lze uplatnit za účelem podpory biodiverzity horských vrchovišť či rašelinišť. Namnožené klony břízy trpasličí jsou uchovávány v klonovém archivu *in vitro* Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Při posuzování ekonomických aspektů nelze opomenout, že ochrana biologické rozmanitosti na úrovni stanovišť je jedním ze základních cílů Státní politiky životního prostředí ČR schválené usnesením vlády č. 235 ze dne 17. března 2004. Vedle celospolečenských přínosů se dá předpokládat i zvýšení tržeb u uživatele výsledků výrobou sazenic požadovaného sortimentu. Bříza trpasličí je pěstována též jako skalnička na zahrádkách. Při předpokládané produkci kontejnerovaných výpěstků v ročním objemu cca 10 000 kusů lze při ceně jedné sazenice cca 140,- Kč/ks předpokládat tržby cca 1 400 000,- Kč, zisk 189 000,- Kč (očekává se 13,5% ziskovost výroby). Využití metodiky v případné komerční reprodukci by přispělo ke zvýšení dostupnosti tohoto druhu pro pěstitele. Hlavními celospolečenskými přínosy však zůstává zachování genetických zdrojů a podpora biodiverzity.

VI. DEDIKACE

Vypracování metodiky bylo podporováno z poskytnuté institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace MZe ČR – Rozhodnutí č. RO0115 (č.j. 5774/2015-MZE-17011).

VII. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- 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.
- D'AMATO F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: Frontiers of Plant Tissue Culture, THORPE T.A., (ed.), Int. Assoc. Plant Tissue Culture, University of Calgary, Alberta: 287-295.
- DEBERGH P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiologia Plantarum, 59: 270-276.
- 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. 1987. European hardwoods. In: BONGA J.M., DURZAN D.J. (eds.): Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Nijhoff: 224-246.
- JAMISON J.A., RENFROE M.H. 1998. Micropropagation of *Betula uber* (Ashe) Fernald. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 34: 147-151.
- 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., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J. 2012. Mikropropagace jabloně lesní (*Malus sylvestris* Mill.). Strnady, VÚLHM: 19 s. Lesnický průvodce, 2
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J. 2013. Mikropropagace hrušně polníčky (*Pyrus pyraeaster* /L./ Burgsdorf). Strnady, VÚLHM: 20 s. Lesnický průvodce, 2

- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., BURIÁNEK V. 2014. Mikropropagace cenných endemitních druhů jeřábů. Strnady, VÚLHM: 20 s. Lesnický průvodce, 4
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- SHOLTEN H.J., PIERIK R.L.M. 1998. Agar as gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reportes*, 17: 230-235.
- WELANDER M. 1993. Micropropagation of birch. In: AHUJA, M.R (ed.): *Micropropagation of woody plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 223-246.
- ZENG F.-S., SUN F.-K., LIANG N.-S., ZHAO X.-T., LUO W., ZHAN Y.-G. 2015. Dynamic change of DNA methylation and cell redox state at different micropropagation phases in birch. *Trees*, 29: 917-930.

VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- MALÁ J. 2000. Zachování a reprodukce genových zdrojů okrajových a ohrožených lesních dřevin s využitím moderních biotechnologických metod. Závěrečná zpráva VÚLHM.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., ŠÍMA P. 1999. Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých lesních dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 44: 6-11.
- MÁCHOVÁ P., MALÁ J., CVRČKOVÁ H. 2012. Mikropropagace břízy trpasličí. *Zprávy lesnického výzkumu*, 57 (3): 202-206.

MICROPROPAGATION OF *BETULA NANA*

Summary

Micropropagation *in vitro* technology, the standardized induction of organogenesis, multiplication, rooting and acclimatization procedures are described. Dormant axillary buds of *Betula nana* 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, 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 from company ROTH, pH adjusted to 5.8 (Fig. 1). For multiplication of *Betula nana* the agar ROTH was the most effective. 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 24hrs photoperiod. Plants with well-developed roots were transferred from rooting medium into pots (Quick Pot T 35) with agropelrit 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 agropelrit), and located in glasshouse, where they were adapted for 3–4 weeks to the 70% of relative air humidity.

The growing explant cultures are now stored in the explant archive in Forestry and Game Management Research Institute, Strnady, Prague.

LESNICKÝ PRŮVODCE



Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
www.vulhm.cz