

MIKROPROPAGACE JABLONĚ LESNÍ (*MALUS SYLVESTRIS* MILL.)



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

MIKROPROPAGACE JABLONĚ LESNÍ (*MALUS SYLVESTRIS* MILL.)

Certifikovaná metodika

RNDr. Jana Malá, CSc.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Jaroslav Dostál

Strnady 2012

Lesnický průvodce 2/2012

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

Strnady 136, 252 02 Jíloviště

<http://www.vulhm.cz>

Vedoucí redaktorka: Šárka Holzbachová, DiS.; e-mail: holzbachova@vulhm.cz

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

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

ISBN 978-80-7417-057-7

ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION OF CRAB APPLE (*MALUS SYLVESTRIS* MILL.)

Abstract

Micropropagation technology was utilized for reproduction of endangered and valuable populations of crab apple (*Malus sylvestris* Mill.). In the Czech Republic, the composition of mentioned species has the character of residual populations with individual or group occurrence in forest stands, or with the occurrence in the non-forest areas. Procedures for regeneration from explants up to plantlets were standardized. The organogenesis, i. e. the induction in the most cases of axillary or adventitive shoots on the primary explants, proved the most advantageous technology for clonal propagation of crab apple. These shoots (microcuttings) were used for induction of rhizogenesis, and then the plantlets were acclimatized and cultured up to plants capable of outplanting. Keeping of technological criteria of explant culturing and complete plant regenerating determines morphological quality of *in vitro* produced planting stock.

Key words: crab apple, micropropagation, organogenesis, plantlets

Oponenti: Ing. Lada Krnáčová, Ministerstvo zemědělství, Praha 1
Ing. Josef Cafourek, Ph.D., Wotan Forest, a. s.

Adresa autorů:

RNDr. Jana Malá, CSc., mala@vulhm.cz

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., cvrckova@vulhm.cz.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D., machova@vulhm.cz

Ing. Jaroslav Dostál, dostal@vulhm.cz

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

Strnady 136

Jíloviště 252 02

Obsah:

I.	Cíl metodiky	7
II.	Vlastní popis metodiky	7
	1. Úvod	7
	2. Standardizovaný metodický postup mikropropagace	9
	a. Zakládání primárních kultur	9
	b. Kultivační podmínky multiplikace	10
	c. Zakořeňování a aklimatizace	11
	d. Výsadba na venkovní plochy	11
	e. Hodnocení růstu výpěstků <i>in vitro</i>	12
III.	Srovnání novosti postupů	14
IV.	Popis uplatnění metodiky	15
V.	Ekonomické aspekty	16
VI.	Dedikace	16
VII.	Seznam použité související literatury	17
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	18
	Summary	19

I. CÍL METODIKY

Podpora biodiverzity lesních ekosystémů pomocí efektivní reprodukce klonů vtroušeně rostoucího druhu jabloně lesní s charakteristickými morfologickými znaky. Metodika mikropropagace jabloně lesní popisuje ověřený postup reprodukce i zachování cenných klonů a populací.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

Jabloně lesní (*Malus sylvestris* Mill.) se vyskytuje v České republice jako příměs v suchých doubravách, na sutích a křovinatých stráních. Je polostinnou dřevinou, zcela mrazuvzdornou, nenáročnou na výživu a odolnou vůči znečištění. V lese má význam především jako krmná dřevina a medonosná dřevina. Pro svou odolnost se osvědčila do biokoridorů a ochranných lesních pásů.

Vlivem antropogenního působení (především změny přirozené druhové skladby v důsledku hospodaření, selektivní těžby) došlo k úbytku populací této přehlížené dřeviny, které je třeba v současné době považovat za ohrožené (stárnutí přežívajících jedinců, křížení s domácími šlechtěnými formami, vodní deficit krajiny, poškození houbovými chorobami aj.). S ostatními druhy vtroušených dřevin však představuje neodmyslitelnou složku ekosystémů. V lesních ekosystémech vytvářejí tyto dřeviny spodní patro a okraje lesních porostů, které chrání les před klimatickými výkyvy a náhlými meteorologickými anomáliemi, přispívají k udržování stálosti hydrologických zásob lesa a mikroedafonu, zabraňují nadměrné erozi lesních půd a zachytávají prach. Mimo tyto základní funkce se podílejí na vytváření vhodných refugií pro zvěř a ptactvo a slouží rovněž jako její hlavní potravní zdroje.

V současné kulturní krajině je třeba posílit cenné zbytkové populace z lesnického hlediska doposud přehlížených dřevin. Specifikou těchto dřevin je, že se vyskytují v porostech vtroušeně jako jednotlivé stromy nebo na nelesních půdách, které jsou součástí majetku vlastníků (nájemců) lesa a je tím omezena možnost výměny genetické informace. Východiskem je zakládání sbírek klonů a semenných sadů, což významně přispěje ke zvýšení genetické variability osiva těchto druhů. Pro reprodukci stávajících genových zdrojů lze využít možnosti vegetativní reprodukce (roubování, řízkování), včetně mikropropačních postupů. Tyto postupy umožňují rychle a ekonomicky výhodně namnožit kvalitní reprodukční materiál z vybraných dárčovských jedinců a zároveň zakládat množitelskou populaci *in vitro* v bance explantátů,

ve které lze původní materiál uchovávat pro další účely (zakládání klonových archivů *ex situ*, semenných sadů, genetické analýzy, následné výsadby ap.).

Další z nepřehlédnutelných výhod mikropropagačních postupů je možnost namnožení v podstatě neomezeného počtu identických jedinců z jediného kvalitního dárce v relativně krátkém časovém období, přičemž množství odebíraného rostlinného materiálu pro založení primárních kultur (většinou meristematická pletiva zimních pupenů) je minimální a dárcovský strom neohrožuje. Dostatečná genetická variabilita množené populace je zaručena vhodným počtem klonů a poměrem jejich zastoupení ve vytvářené množitelské populaci (syntetické směsi).

Neúspěšnější metodou, která se osvědčila pro klonové množení zejména listnatých dřevin je organogeneze. Klonové množení jehličnatých a listnatých dřevin z primárních explantátů je podmíněno vypracováním vhodných technologických postupů umožňujících indukci organogeneze, která musí být následována úspěšnou regenerací kompletní rostliny. Základními mechanismy uplatňujícími se při navození růstu axilárních nebo adventivních pupenů je dereprese meristémů primárního explantátu. Široké využití má tato metoda v případech, kdy je nutné získat klony vyselektovaných dílčích populací stromů např. při nedostatečné fruktifikaci nebo zničení semen hmyzem, anebo při selhání jiných způsobů vegetativní reprodukce (řízkování). Hlavním předpokladem úspěšné organogeneze je zajištění vhodných kultivačních podmínek (chemické složení živného média, teplota, vlhkost a osvitový režim). Neméně významně ovlivňují úspěšnost organogeneze i takové faktory, jako je stáří a fyziolo-



Obr. 1. Donorové stromy jabloně lesní na stanovišti (foto: J. Dostál)

gický stav dárcovského jedince, doba sběru, způsob a délka skladování zdrojového materiálu, povrchová sterilizace a technika preparace explantátů.

Princip využití mikropropagačních postupů při reprodukci vtroušených dřevin spočívá v aplikaci postupu, kdy jsou separativně podle příslušnosti ke konkrétním přírodním lesním oblastem shromažďovány propagule inventarizovaných přirozeně rostoucích jedinců vybraných druhů vtroušených okrajových dřevin, které jsou následně autovegetativně množeny mikropropagativními postupy a převáděny do výsadby schopného stavu. Z tohoto materiálu jsou dále zakládány syntetické směsi (zdrojové matečnice, semenné sady) za účelem provozního využívání uživatelem, čímž je dosaženo komplexní a originální řešení zachování genových zdrojů uvedeního druhu.

2. Standardizovaný metodický postup mikropropagace

a. Zakládání primárních kultur

V únoru až březnu ještě před vyrašením pupenů se odebírají rouby z rodičovských stromů (cca 50 pupenů od 1 klonu). Označí se, vloží se do mikrotenového sáčku a na převoz uskladní do chladové tašky. Rouby se uchovávají při 4 °C a je vhodné zpracovat rostlinný materiál (pupeny) do 14 dnů po odběru. Sníží se tím riziko šíření infekcí a poškození apikálního meristému.

Jednotlivé pupeny se sterilizují v 1% roztoku chlornanu sodného (Savo, Bochemie ČR) a třikrát promyjí sterilní destilovanou vodou. Ve sterilním prostředí laminárních boxů se odstraní vnější šupiny pupenů a extirpované vzrostné vrcholy jsou umístěny na indukční agarové živné médium (50 ml média v Erlenmeyerově 100ml baňce). K indukci organogeneze u jabloně lesní se používá modifikované médium MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) s koncentrací fytohormonů BAP 0,5 mg.l⁻¹ a IBA 0,1 mg.l⁻¹ a s koncentrací glutaminu 10 mg.l⁻¹, glycinu 2 mg.l⁻¹, sacharózy 30 g.l⁻¹, agaru 6 g.l⁻¹, pH se upravuje na hodnotu 5,8. Kultivace probíhá v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24 °C, 16hodinové světelné fotoperiodě, s osvětlením o intenzitě 30 μmol.m⁻².s⁻¹. Indukce axilárních případně adventivních pupenů na primárním explantátu trvá přibližně 4 – 6 týdnů.

b. Kultivační podmínky multiplikace

Po vyrašení axilárních, případně adventivních pupenů na primárním explantátu jsou kultury *in vitro* jabloně lesní pěstovány na multiplikačním médiu MS s koncentrací BAP 0,2 mg.l⁻¹, IBA 0,1 mg.l⁻¹, glutaminu 200 mg.l⁻¹, glycinu 2 mg.l⁻¹, kaseinového hydrolyzátu 200 mg.l⁻¹, sacharózy 30 g.l⁻¹, agaru 6 g.l⁻¹, pH je upravováno na hodnotu 5,8. Intervaly mezi jednotlivými pasážemi jsou 4 až 5 týdnů. Pro kultivaci jsou nezbytné konstantní kultivační podmínky (teplota 24 °C, osvětlení o intenzitě 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16hodinová světelná fotoperioda) a 100% relativní vzdušná vlhkost. Průběžně je nutné sledovat zdravotní stav kultur, resp. výskyt kontaminací. Kvalita mikropropagovaného materiálu je kontrolována na základě morfologických znaků. U listů a výhonů se sledují barva, tvar, délka a jejich počet.



Obr. 2. Kultura jabloně lesní v bance explantátů Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (foto: J. Dostál)

c. Zakořeňování a aklimatizace

Mikrořízky určené pro dopěstování kompletních rostlin se standardně zakořeňují v agarovém médiu MS o čtvrtinové koncentraci makro a mikroelementů, s koncentrací sacharózy 10 g.l^{-1} a auxinu IBA $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Zakořeňování probíhá za stejných kultivačních podmínek jako multiplikace. Pro zvýšení účinnosti zakořeňování probíhá první fáze zakořeňování (7 dní) ve tmě. První kořeny se objevují v závislosti na klonu v průběhu 3 – 4 týdnů.

Rostliny s vytvořenými kořeny se přesazují ze zakořeňovacího média do sadbovačů Quick Pot T 35 s agroperlitem (Perlit Praha s. r. o.) a dvakrát týdně se zalévají tekutým základním médiem MS (bez fytohormonů a sacharózy) ředěným v poměru 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhá v obdobných kultivačních podmínkách (teplota 24°C , osvětlení o intenzitě $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 24hodinová světelná fotoperioda) 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 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 žeber na vnitřní straně sadbovačů, které napomáhají správnému vývoji kořenů. Tento postup a použití biologicky ověřených sadbovačů zabraňuje nežádoucím odchylkám růstu a nepřípustné deformaci kořenů ve smyslu platné ČSN 48 2115.

d. 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 roce dopěstování na venkovním záhonu lze výpěstky *in vitro* jabloně lesní vysadit na stanoviště.

e. Hodnocení růstu výpěstků *in vitro*

Růstové charakteristiky výpěstků byly porovnávány s parametry uvedenými v ČSN 48 2115. V tab. 1 jsou uvedeny parametry výpěstků *in vitro* vysázených na dopěstování na venkovním záhonu. Po roce pěstování dosahují výpěstky jabloně lesní dle normy charakteru poloodrostků. Další růst výpěstků na stanovišti je dokumentován na demonstračním objektu v oboře Březka Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. (PLO 10, Středočeská pahorkatina). Výpěstky *in vitro* jsou na demonstračních objektech hodnoceny z hlediska jejich růstových a morfologických parametrů. Pro zhodnocení získaných výsledků byla využita metoda analýzy variance. Výsledky pětiletého hodnocení sazenic prokazují, že mikropropagované rostliny nevykazují retardace růstu. Růstové charakteristiky (přírůst, tloušťka kořenového krčku) jsou uvedeny v tab. 2.



Obr. 3. Výpěstky *in vitro* jabloně lesní na výzkumné ploše v oboře Březka (foto: J. Dostál)

Tab. 1. Růstové charakteristiky výpěstků *in vitro* jabloně lesní po výsadbě na venkovní záhony
Growth characteristics of Malus sylvestris plantlets after planting in the outside beds

Datum/ Date	Počet/Number [ks/piece]	Mortalita/Mortality [%]	Průměrná výška/ Average height [cm]	±SD [cm]	Průměrný přírůst/ Average increment [cm]	±SD [cm]	Tloušťka kořenového krčku/Thickness of root collar [cm]	±SD [cm]
27. 6. 2005	130		15,6	4,8			0,52	0,23
26. 10. 2006	120	7,7	96,7	36,5	81,1	28,5	1,0	0,27

Tab. 2. Růstové charakteristiky výpěstků *in vitro* jabloně lesní na demonstrační ploše Březka
Growth characteristics of Malus sylvestris plantlets on demonstration plot Březka

Rok/ Year	Vysazeno/ přežívá/ Planted/ survived [ks]	Mortalita/ Mortality [%]	Průměrná výška/ Average height [cm]	±SD [cm]	Tloušťka kořen. krčku/ Thickness of root collar [cm]	±SD [cm]	Přírůst/ Increase [cm]
2007	101	1,0	96,1	35,5	1,2	0,4	
2008	100	1,0	156,8	41,7	1,7	0,5	60,6
2009	97	4,9	188,4	60,2	-	-	31,6
2010	97	0	256,9	67,6	-	-	68,5
2011	96	1,0	342,3	95,6	-	-	85,4

Vysvětlivky:

BAP – 6-benzylaminopurine; MS - Murashige Skoog medium; IBA – β-indolylbutyric acid;

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost mikropropagačních postupů spočívá ve využití metody indukce organogeneze *in vitro* pro reprodukci explantátů odebíraných z dospělých stromů jabloně lesní, v originálním složení živných médií v průběhu mikropropagace a v originálním řešení zakořeňování a aklimatizace.

Mikropropagační technologie se již s úspěchem využívají u řady druhů listnatých dřevin (LIBBY, AHUJA 1993). Od zahájení intenzivního výzkumu této problematiky bylo dosaženo mj. významných poznatků o vývoji výpěstků *in vitro* ve venkovních podmínkách a bylo prokázáno, že rychlost a jiné parametry růstu mikropropagovaných rostlin jsou srovnatelné se sazenicemi generativního původu (HAMMATT 1999; MALÁ et al. 2007).

Pro mikropropagaci cenných populací vtroušeně se vyskytující dřeviny jabloně lesní byla vypracována standardizovaná metoda indukce organogeneze, která se pro klonové množení listnatých dřevin velmi dobře osvědčuje (PILATE et al. 2002). Pro úspěšnou indukci adventivních výhonů na vzrostných vrcholech, multiplikaci a zakořeňování mikrořízků byla originálně modifikovaná živná média a stanoveny přesné koncentrace fytohormonů. Stanoveny byly také standardizované postupy pro úspěšnou aklimatizaci a dopěstování kompletních rostlin v nesterilních substrátech (perlit, rašelina). Tato fáze růstu je považována za kritické období, protože kořeny vytvořené v agarových médiích nejsou ještě plně funkční a u listů není zcela vyvinuta kutikula ani průduchy (ĎURKOVIČ, MIŠÁLOVÁ 2009). Po aklimatizaci se rostliny přesazují na venkovní záhony a po dopěstování (zpravidla po roce) je lze vysadit na konečné stanoviště. Dostatečná genetická variabilita množené populace je zaručena vhodným složením výchozí klonové *in vitro* množitelské populace (MALÁ et al. 1999). Na rozdíl od zahraničí, kde se tyto metody běžně využívají k reprodukci vyšlechtěných genotypů (BOMMINENI et al. 2001), nebyly v ČR zatím tyto metody využity v širším provozním měřítku.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

V případě jabloně lesní se jedná o druh (a jeho regionální a dílčí populace), které lze množit generativně jen velmi omezeně. Namnožený materiál lze uplatňovat v lesnické praxi za účelem podpory biodiverzity v lesních biocenózách. Sadební materiál se využívá v souladu s odpovídajícími klimatickými podmínkami a v ekologickém zápoji s vhodnými druhy tak, aby došlo ke stabilizaci rovnováhy v lesních ekosystémech.

Nakládání se sadebním materiálem vypěstovaným metodami *in vitro* v lesnické praxi podléhá legislativním opatřením platným pro vegetativně množený materiál. Zdrojový materiál pro mikropropagaci je získáván kombinovanou hromadnou a individuální selekcí a musí splňovat požadavky na genetickou klasifikaci, uznávání a evidenci uznaných zdrojů (viz. § 29 lesního zákona č. 289/1995 Sb. ve znění pozdějších předpisů; § 11 – § 16 zákona č. 149/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů; § 7 – § 11 vyhl. MZe č. 29/2004 Sb.). Stanoviště pro výsadbu musí odpovídat zásadám stanoveným pro rajonizaci reprodukčního materiálu lesních dřevin a přírodním lesním oblastem a vegetačním lesním stupňům.

V projektech zaměřených např. na záchranu cenné populace je využití vegetativně množeného sadebního materiálu podmíněno dodržením konkrétních podmínek, mimo jiné dostatečným počtem klonů odebraných v přírodní lesní oblasti. U jabloně lesní (*Malus sylvestris*) jsou pro reprodukci vybírány stromy s charakteristickými morfologickými znaky, přičemž byl při odběrech dodržován minimální počet 30 stromů z jedné přírodní oblasti (ŠINDELÁŘ 2002).

Výpěstky *in vitro* musí současně splňovat kritéria kvality výsadbového materiálu. Z těchto důvodů byla (vedle standardizace kultivačních postupů při dopěstování kompletních rostlin) provedena evaluace růstových a morfologických parametrů výpěstků *in vitro* před výsadbou i následně po výsadbě na venkovní plochy s porovnáním ke standardům ČSN pro generativní sazenice dřevin s obdobným růstem.

Popsaná metodika byla již ověřena v poloprovozních podmínkách v zařízení Jihočeských lesů, a. s. , kde se podle uvedené metodiky podařilo napěstovat řádově 10 tis. sazenic.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Nedostatek vhodného sadebního materiálu vtroušeně se vyskytujících dřevin je deklarován významnými vlastníky lesního majetku v ČR, jimiž jsou např. Vojenské lesy a statky, s. p. Zájem o tyto dřeviny však průběžně projevují i další vlastníci lesa, kteří požadují reprodukční materiál původem z cenných populací lesních dřevin pro účely zvýšení biodiverzity lesních porostů a zvyšování kvality dřeva, vyplývající z očekávané produkce cenných sortimentů (např. LČR, s. p., Správy CHKO, základní organizace ČSOP, Městské lesy Vizovice, Lesy Karel Schwarzenberg). Zájem těchto subjektů vyplývá ze skutečnosti, že reprodukčního materiálu, který je možno legálně využívat pro výsadby do lesních porostů, je na školkařském trhu nedostatek. Pokud je takový materiál nabízen, není často zajištěna jeho dostatečná genetická variabilita. Předpokládá se proto, že produkce výpěstků *in vitro* vzácnějších dřevin z vytvořených klonových směsí s deklarovanými oblastmi jejich potenciálního využití bude mít uplatnění na trhu dlouhodobě i vzhledem k výkyvům fruktifikace a menší efektivnosti jiných způsobů vegetativního množení. Při posuzování vztahu nákladů a očekávaného hospodářského zisku je třeba věnovat pozornost i neekonomickým přínosům, jejichž finanční vyčíslení je velmi obtížné. Hlavními celospolečenskými přínosy jsou zachování genetických zdrojů a podpora biodiverzity. Na druhou stranu pro uživatele metodiky může být ekonomickým přínosem rozšíření sortimentu dřevin, deklarace jejich genetické hodnoty, a tím i vyšší cena sadebního materiálu cenných populací vtroušených dřevin a větší zisk uživatelského subjektu. Vedle celospolečenských přínosů se předpokládá zvýšení tržeb u uživatele výsledků výrobou sadebního materiálu požadovaného sortimentu. Při produkci kontejnerovaných poloodrostků a odrostků v ročním objemu cca 25 000 kusů lze při ceně jedné sazenice cca 65,- Kč/ks předpokládat tržby cca 1 625 000,- Kč, zisk 208 340,- Kč (očekává se 13,5% ziskovost výroby). 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.

VI. DEDIKACE

Vypracování metodiky bylo podporováno: výzkumným záměrem MZE0002070203.

VII. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- BOMMINENI V. R., MATHEWS H., SAMUEL S. B., KAMER M., WAGNER D. R. 2001. A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear. HortScience, 36 (6): 1102-1106.
- COELHO M. T., DIOGO M. G., CONSCIENCIA M., MARQUES F., GONCALVES J. C. 2005. Estudos na fase de rizogénese de *Sorbus torminalis* (L.) Crantz micropropagado. In: Silva R., Páscoa F. (eds.): Actas das Comunicacoes do 5 Congresso florestal nacional: a floresta e as gentes. 16 a 19 Maio de 2005. Lisboa, Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais: 1-8.
- DE KLERK G. J., HANEČÁKOVÁ J., JASIK J. 2001. The role of cytokinins in rooting of stem slices cut from apple microcuttings. Plant Biosystems, 135: 79-84.
- DRUART P. 2003. Micropropagation of apples (*Malus sp.*) In: Jain S. M., Ishii K. (eds.): Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, Kluwer: 433-463.
- ĎURKOVIČ J., MIŠALOVÁ A. 2009. Wood formation during *ex vitro* acclimatisation in micropropagated true service tree (*Sorbus domestica* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96: 343-348.
- FÉR F. 1994. Lesnická dendrologie. 2. část. Listnaté stromy. Praha, VŠZ; Písek, Matice lesnická: 162 s.
- HAMMATT T. 1999. Delayed flowering and reduced branching in micropropagated mature wild cherry (*Prunus avium* L.) compared with rooted cuttings and seedlings. Plant Cell Report, 18: 478-484.
- KEPENEK K., KAROĞLU Z. 2011. The effects of paclobutrazol and daminozide on *in vitro* micropropagation of some apple (*Malus domestica*) cultivars and M9-rootstock. African Journal of Biotechnology, 10 (24): 4851-4859.
- LIBBY W. J., AHUJA M. R. 1993. Micropropagation and clonal options in forestry. In: Ahuja M. R. (ed.): Micropropagation of woody plants. Dordrecht, Kluwer: 425-442.
- MAGYAR-TÁBORI K., DOBRÁNSZKI J., JAMBOR-BENCZÚR E. 2002. High *in vitro* shoot proliferation in the apple cultivar Jonagold induced by benzyladenine analogues. Acta Agronomica Hungarica, 50 (2): 191-195.
- MALÁ J., CVIKROVÁ M., CHALUPA V. 2007. Micropropagation of mature trees of *Ulmus glabra*, *U. minor* and *U. laevis*. In: Jain S. M., Haggman H. (eds.): Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, Springer: 237-246.

- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- PILATE G., PAQUES M., LEPLÉ, J.-C., PLOMION C. 2002. Outils et méthodes. Les biotechnologies chez les arbres forestiers. *Revue Forestiere Francaise*, LIV, 2: 161-180.
- SEDLÁK J., PAPRŠTEIN F. 2003. Influence of growth regulators on in vitro propagation of *Pyrus communis* cv. Koporecka. *Acta Horticulturae*, 616: 379-382.
- ŠINDELÁŘ J. 2002. K problematice autovegetativního množení lesních dřevin z hlediska genetiky a šlechtění – náměty pro lesnickou praxi. *Zprávy lesnického výzkumu*, 47 (2): 73-76.
- THAKUR A., KANWAR J. S. 2008. Micropropagation of 'Wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of Rooting. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36 (2): 104-111.

VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., ŠÍMA P. 1999. Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 44 (4): 6-10.
- MALÁ J., ŠÍMA P. 2000. Možnosti využití biotechnologických metod v lesním hospodářství. *Lesnická práce*, 79 (11): 495-497.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., ČÍŽKOVÁ L. 2005. Využití mikropropagace pro reprodukci genových zdrojů vybraných ušlechtilých listnatých dřevin (*Malus sylvestris*, *Pyrus pyraeaster*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* a *Prunus avium*). *Zprávy lesnického výzkumu*, 50 (4): 216-221.

MICROPROPAGATION OF CRAB APPLE (*MALUS SYLVESTRIS* MILL.)

Summary

Crab apple (*Malus sylvestris* Mill.) is one of a scarce species among forest trees and occurs in scattered population density in Central Europe.

Micropropagation represents the effective and economically advantageous technology enabling the reproduction of crab apple planting material derived from selected elite parents and also the preservation gene resources in the explant bank for further utilization. The organogenesis is regarded as the most advantageous technology that proved suitable for clonal propagation of particularly broad-leaved trees. Disposal planting material from *in vitro* cultivation for forest practice is under legislature for vegetative propagated plant material.

The modified agar medium MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) with concentrations of phytohormones BAP 0.5 mg . l⁻¹ and IBA 0.1 mg . l⁻¹, 10 mg . l⁻¹ of glutamine, 2 mg . l⁻¹ of glycine, 30 g . l⁻¹ of saccharose, and 6 g . l⁻¹ of agar, pH adjusted to 5.8 was used for induction of crab apple organogenesis. After 6 weeks, the cultures were transferred onto the multiplication MS 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, pH adjusted to 5.8. The cultures were transferred every 4 weeks. Cultivation proceeded in air-conditioned room at 24 °C, and under white fluorescent light (30 μmol . m⁻² . s⁻¹) and a 16-hour photoperiod.

Microcuttings for culturing of complete plants were rooted in agar medium MS diluted 1:4 by distilled water, with IBA 0.6 mg . l⁻¹, and 10 g . l⁻¹ of saccharose. The cultures grew first 7 days in the darkness for accelerating of root growth and afterwards were transferred into the same cultivation conditions as during induction and multiplication. Plants with well-developed roots were transferred from rooting medium into pots (Quick Pot T 35) with agropertil and watered by basal MS medium without phytohormones and saccharose diluted by distilled water 1:10. Acclimatization proceeded under the same conditions like induction and multiplication 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 agropertil) 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. Optimal period for outdoor culturing plants of crab apple before outplanting on the forest stands was 1 year.

Described micropropagation technology was attested in pilot plant conditions in Biotechnology laboratory Olešná of Jihočeské lesy a. s.

LESNICKÝ

PRŮVODCE



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