

MIKROPROPAGACE HRUŠNĚ POLNIČKY (*PYRUS PYRASTER* (L.) BURGSDORF)



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

Certifikovaná metodika

2/2013

Mikropropagace hrušně polničky (*Pyrus pyraister* (L.) Burgsdorf)

Certifikovaná metodika

RNDr. Jana Malá, CSc.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Jaroslav Dostál

Lesnický průvodce 2/2013

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 978-80-7417-065-2

ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION OF WILD PEAR (*PYRUS PYRASTER* (L.) BURGSDORF)

Abstract

Micropropagation technology was utilized for reproduction of scattered and valuable trees of wild pear (*Pyrus pyraister* (L.) Burgsdorf). Wild pear occurs in the Czech Republic as an additive in deciduous forests from lowland positions until the lower zone of beech woods. Procedures for regeneration from explants up to plantlets were standardized. The organogenesis, i.e. the induction of axillary or adventitive buds or shoots on the primary explants (apical meristems of dormant buds), proved the most effective technology for clonal propagation of wild pear. 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.

Key words: wild pear, micropropagation, organogenesis, plant regeneration, plantlets

Oponenti: Ing. Lada Krnáčová, MZe ČR, Praha 1

Ing. Josef Cafourek, Ph.D., Wotan Forest, a. s.

Adresa autorů:

RNDr. Jana Malá, CSc., Ing. Helena Cvrčková, Ph.D., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.,
Ing. Jaroslav Dostál

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

e-mail: mala@vulhm.cz
cvrckova@vulhm.cz
machova@vulhm.cz
dostal@vulhm.cz

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	9
	c. Zakořeňování a aklimatizace	11
	d. Výsadba na venkovní plochy	12
	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	17
VII.	Seznam použité související literatury	17
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	18
	Summary	19

I. CÍL METODIKY

Efektivní reprodukce ortetů hrušně polničky (*Pyrus pyrastra* (L.) Burgsdorf), vtroušeně rostoucích stromů vyznačujících se výjimečným růstem a charakteristickými morfologickými znaky, pro zachování cenných genotypů a populací za účelem zvýšení biodiverzity lesních ekosystémů.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. ÚVOD

Areál rozšíření hrušně polničky (*Pyrus pyrastra* (L.) Burgsdorf) sahá ze západní a jižní Evropy přes Malou Asii až po Kavkaz. V České republice se vyskytuje jako příměs v listnatých lesích od lužních poloh až do spodního pásma bučin (ÚRADNÍČEK et al. 2009). Je světlomilnou dřevinou, nenáročnou na výživu a odolnou vůči znečištění. V lese má význam především jako krmná a medonosná dřevina. Pro svou odolnost se osvědčila do biokoridorů a ochranných lesních pásů. Poskytuje výborné tvrdé dřevo tmavě červené barvy, využívané v řezbářství a nábytkářství. V ovocnářství se využívají semenáčky hrušně polničky pro svou odolnost jako podnože při roubování kulturních odrůd hrušně obecné (*Pyrus communis* L.).

Hrušeň polnička se vyskytuje relativně vzácně. Pro své malé zastoupení nebývá uváděna podobně jako další vtroušené dřeviny v lesních hospodářských plánech, ani se s ní zpravidla nepočítá v plánech obnovy. Má malou konkurenční schopnost danou mj. pomalejším růstem a nižšími výškami v dospělosti. Je citlivá vůči běžným hospodářským zásahům, které jsou zaměřeny především na pěstování a podporu hlavních hospodářských dřevin. Její přirozená obnova je často problematická, semena nebo semenáčky bývají většinou likvidovány zvěří. S ostatními druhy vtroušených dřevin však představuje neodmyslitelnou složku ekosystémů. V lesních ekosystémech vytvářejí vtroušené 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, zabráňují 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 jejich hlavní potravní zdroje.

Ne všechny v přírodě planě rostoucí hrušně jsou hrušně polničky. Genové zdroje tohoto druhu jsou vystaveny kontaminaci spontánním křížením s pěstovanou hrušní obecnou. Hybridizace je vedle antropických vlivů považována za hlavní příčinu narušení její druhové čistoty. Spolehlivá identifikace planých, kulturními odrůdami nekontaminovaných jedinců není u hrušně polničky jednoduchá. Důležité znaky pro správnou determinaci hrušně polničky jsou nejen na listech, větvích a plodech, ale i na květech. Pro mikropropagaci hrušně polničky byly vybrány stromy na základě 11 kvantitativních a 14 kvalitativních znaků.

Mikropropagační postupy umožňují rychle a ekonomicky výhodně namnožit kvalitní reprodukční materiál z vybraných jedinců a zároveň zakládat množitelskou populaci *in vitro* v bance explantátů, ve které lze původní materiál uchovávat pro další účely (zakládání klonových archivů *in 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 se neohrožuje. Dostatečná genetická variabilita množené populace je zaručena vhodným počtem klonů a poměrem jejich zastoupení ve vytvářené množitelské populaci (syntetické směsi).

Nejúspěšnější 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 fyziologický 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 mikropropagačními 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 komplexního a originálního řešení zachování genových zdrojů uvedeného 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 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 se 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 hrušně polničky se používá modifikované médium MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) s koncentrací fytohormonů BAP 0,2 mg.l⁻¹, GA₃ 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* hrušně polničky 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 (obr. 1). Navození vyššího počtu adventivních výhonů se dosáhne přesazením kultur v mul-

tiplikační fázi na médium stejného složení, kde BAP v koncentraci $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ je nahrazen TDZ v koncentraci $3,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Vyšší počet výhonů ($4,5 \pm 2,6$ na jednu kulturu) i větší délka výhonů ($7,5 \pm 1,2 \text{ cm}$) je někdy provázána vitrifikací explantátů, avšak po přesazení na médium s BAP ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$) tento efekt mizí a výhony lze využít k další multiplikaci. Pro kultivaci jsou nezbytné konstantní kultivační podmínky, tj. teplota $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$, osvětlení o intenzitě $30 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 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. 1: Explantátová kultura hrušně polničky (foto: J. Vorel)
Explant culture of wild pear

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 $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ (obr. 2). 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 agropérlitem (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 pod-



Obr. 2: Zakořeněný mikrořízek hrušně polníčky (foto: J. Vorel)
Rooted microcutting of wild pear

mínkách (teplota 24 °C, osvětlení o intenzitě 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 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 mm $\times$ 215 mm $\times$ 200 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 žebër na vnitřní straně sadbovačů, které napomáhají správnému vývoji kořenů. Tento postup a použití biologicky ověřených sadbovačů zabrání nežádoucím odchylkám růstu a nepřipustné 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* hrušně polničky 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 hrušně polničky dle normy charakteru poloodrostků. Další růst výpěstků na stanovišti je dokumentován na demonstračním objektu Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i. v oboře Březka (PLO 10, Středočeská pahorkatina) (obr. 3). Výpěstky *in vitro* jsou na demonstračních objektech hodnoceny z hlediska jejich růstových a morfologických parametrů. Pro zhodnocení získaných výsledků byla využita metoda analýzy variance.

Tab. 1: Růstové charakteristiky výpěstků *in vitro* hrušně polničky po výsadbě na venkovní záhony
Growth characteristics of *Pyrus pyrastrer* plantlets after planting in the outside beds

Datum/Date	Počet/Number	Mortalita/ Mortality	Průměrná výška/ Average height	±SD	Průměrný přírůst/ Average increment	±SD	Tloušťka kořenového krčku/ Thickness of root collar	±SD
	[ks/pieces]	[%]	[cm]	[cm]	[cm]	[cm]	[cm]	[cm]
27.6. 2005	390		14,5	3,4			0,51	0,19
26.10.2006	372	4,6	93,6	32,5	78,1	25,5	0,90	0,22



Obr. 3: Výpěstky *in vitro* hrušně polničky na výzkumné ploše v oboře Březka (foto: J. Dostál)
Wild pear plantlets on demonstration plot Březka

Výsledky pětiletého hodnocení sazenic prokazují, že mikropropagované rostliny nevykazují retardace růstu. Růstové charakteristiky (přírůst, tloušťka kořenového krčku) jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Růstové charakteristiky výpěstků *in vitro* hrušně polničky na demonstrační ploše Březka
Growth characteristics of *Pyrus pyrastra* on demonstration plot Březka

Rok/Year	Vysazeno/ přežívá/ Planted/survived [ks]	Mortalita/ Mortality [%]	Průměrná výška/ Average height [cm]	SD± [cm]	Přírůst/Increment [cm]	Průměrná d _{1,3} / Average DBH [mm]	SD± [mm]
2007	329	0	115,8	35,4			
2008	329	0	150,5	46,3	34,681	5,2	3,5
2009	329	0	174,1	52,7	23,629	8,3	5,5
2011	311	5,5	245,1	81,4	71,013	14,9	8,9

Vysvětlivky:

BAP – 6-benzylaminopurine; **GA₃** – gibberellic acid; **IBA** – β-indolylbutyric acid;

TDZ – thidiazuron, **MS** – Murashige Skoog médium

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

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

Pro reprodukci cenných jedinců listnatých dřevin za účelem urychlení šlechtitelských postupů se již s úspěchem využívají u řady druhů listnatých dřevin mikropropagační technologie (LIBBY, AHUJA 1993). Z hlediska zachování genetických zdrojů je důležité i zjištění významných poznatků o vývoji výpěstků *in vitro* ve venkovních podmínkách. 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 hrušně polničky byla vypracována standardizovaná metoda indukce organogeneze, která se pro klonové množení listnatých dřevin velmi dobře osvědčuje (BOMMINENI et al. 2001; PILATE et al. 2002; SEDLÁK, PAPRŠTEIN 2003; THAKUR, KANWAR 2008; VUJOVIČ et al. 2012). Pro úspěšnou indukci adventivních výhonů na vzrostných vrcholech, multiplikaci a zakořeňování mikrořízků byla originálně modifikována 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 (ĐURKOVIČ, MIŠALOVÁ 2009). Po aklimatizaci se rostliny přesazují na venkovní záhony a po dopěstování (zpravidla po roce) je lze vysadit na konečné stanoviště. Metodika byla ověřena v poloprovozních podmínkách Biotechnologické laboratoře v Olešné, kde se podle uvedené metodiky podařilo napěstovat řádově 10 tis. sazenic.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

V případě hrušně polničky se jedná o druh (a jeho regionální a dílčí populace), který 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.; § 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 hrušně polničky jsou pro reprodukci vybírány stromy vyznačující se nadprůměrným

vzrůstem a charakteristickými morfologickými znaky. V současné době se touto metodou podařilo reprodukovat 33 dospělých stromů.

Výpěstky *in vitro* musí současně splňovat kriteria 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 a následně i po výsadbě na venkovní plochy s porovnáním ke standardům ČSN pro generativní sazenice dřevin s obdobným růstem.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zájem o sadební materiál vtroušeně rostoucích dřevin je průběžně deklarován významnými vlastníky a správcí lesa, kteří požadují sazenice původem z cenných populací lesních dřevin jak pro účely zvýšení biodiverzity lesních porostů, tak i pro účely zvyšování kvality dřeva, vyplývající z očekávané produkce cenných sortimentů (např. Vojenské lesy a statky, s. p., Městské lesy Vizovice, Ing. Jerome Colloredo-Mannsfeld, Lesní a rybniční správa Zbiroh). 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 vyčíslení v penězích je velmi obtížné. Hlavními celospolečenskými přínosy je 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 sazenic a větší zisk uživatelského subjektu. Standardizovaná metodika mikropropagace hrušně polničky se uplatní i při rychlé reprodukci geneticky identických, fyziologicky uniformních podnoží, které jsou navíc zbaveny endogenních patogenních mikroorganismů. Vedle celospolečenských přínosů se dá tedy předpokládat zvýšení tržeb u uživatele výsledků výrobou sazenic požadovaného sortimentu. Např. 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.
- ĎURKOVIČ J., MIŠALOVÁ A. 2009. Wood formation during *ex vitro* acclimatisation in micropropagated true service tree (*Sorbus domestica* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult, 96: 343-348.
- HAMMATT T. 1999. Delayed flowering and reduced branching in micropropagated mature wild cherry (*Prunus avium* L.) compared with rooted cuttings and seedlings. Plant Cell Rep., 18: 478-484.
- LIBBY W. J., AHUJA M. R. 1993. Micropropagation and clonal options in forestry. In: M. R. AHUJA (ed.): Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Acad. Publishers, 425-442.
- MALÁ J., CVIKROVÁ M., CHALUPA V. 2007. Micropropagation of mature trees of *Ulmus glabra*, *U. minor* and *U. laevis*. In: S. M. JAIN, H. HAGGMAN (eds.): Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer, 237-246.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 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 Hort. (ISHS), 616: 379-382.

- THAKUR A., KANWAR J. S. 2008. Micropropagation of 'Wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of Rooting Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, 36 (2): 104-111.
- ÚRADNÍČEK L., MADĚRA P., TICHÁ S., KOBLÍŽEK J. 2009. Dřeviny České republiky, Lesnická práce, 98-99.
- VOJVOVIĆ T., RUŽIĆ D. J., CEROVIĆ R. 2012. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. Hort. Sci. (Prague), 39 (3): 101-107.

VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZE- LY METODICE

- CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., MALÁ J. (1999): The influence of cytokinins BAP and TDZ on the organogenesis of pear. In: Books of abstract of International Symposium Auxins and Cytokinins in Plant Development, Prague, 26.-30.6. 1999. Biologia plantarum, 42: 45.
- MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., ŠÍMA P. (1999): Využití mikroporogace 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 mikroporogace pro reprodukci genových zdrojů vybraných ušlechtilých listnatých dřevin (*Malus sylvestris*, *Pyrus pyraſter*, *Sorbus torminalis*, *S. aucuparia* a *Prunus avium*). Zprávy lesnického výzkumu, 50 (4): 216-221.

MICROPROPAGATION OF WILD PEAR (*PYRUS PYRASTER* (L.) BURGSDORF)

Summary

Wild pear (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsdorf) is a forest tree species with exceptional growth and characteristic morphological features, which occurs scarcely in warmer regions of the Czech Republic from lowlands to foothills.

Micropropagation technology was used to reproduce ortets of wild pear. Propagated material can be applied in forestry practice in order to support biodiversity of forest biocenoses.

The modified agar MS medium (MURASHIGE, SKOOG 1962) with concentrations of phytohormones BAP 0.2 mg.l⁻¹, GA₃ 5 mg.l⁻¹, IBA 0.1 mg.l⁻¹ and 10 mg.l⁻¹ of glutamine, 2 mg.l⁻¹ of glycine, 30 g.l⁻¹ of sucrose and 6 g.l⁻¹ of agar, pH adjusted to 5.8, is recommended for induction of organogenesis of wild pear. Further multiplication proceeds on the MS medium with concentrations of phytohormones BAP 0.2 mg.l⁻¹, IBA 0.1 mg.l⁻¹ and 200 mg.l⁻¹ of glutamine and casein hydrolyzate, 2 mg.l⁻¹ of glycine, 30 g.l⁻¹ of sucrose and 6 g.l⁻¹ of agar, pH adjusted to 5.8. The cultures were transferred every 4-5 wks. Optimum cultivation takes place in air-conditioned room at 24 °C under a 16-hour white fluorescent light photoperiod with light intensity of 30 µmol.m⁻².s⁻¹.

Microcuttings for culturing of complete plants are rooted in standard agar MS medium with the quarter concentrations of macro- and microelements, 0.6 mg.l⁻¹ of IBA and 10 g.l⁻¹ of sucrose. Rooting takes place under the same culture conditions as multiplication. To increase the efficiency of rooting, the cultures grow the first 7 days in the darkness. Complete plantlets are transferred from rooting medium into pots (Quick Pot T 35) with agropperlite and then to the non-sterile substrate. The cultivation proceeds in a gradual reduction of humidity. After acclimatization, the plantlets are grown in outdoor beds. After a year of growing, wild pear plantlets reached a form of semisaplings according to the standard. Further growth of the plantlets was documented on the demonstration site of the Forestry and Game Management Research Institute in the preserve Březka (PLO 10, Central Bohemian Upland), where the plantlets were evaluated from their growth and morphological parameters point of view. The plantlets of wild pear evaluated after five years of growth do not exert any signs of retardation. At present, the above described micropropagation technology could be regarded as sufficiently efficient, because more than 10 000 plantlets of wild pear have grown.



Obr. 4: Hrušeň polnička v Českém krasu (foto: V. Buriánek)
Wild pear in the area Český kras

LESNICKÝ PRŮVODCE



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