

VYUŽITÍ MIKROPROPAGACE PRO
REPRODUKCI AUTOCHTONNÍCH DRUHŮ
JILMU (*ULMUS GLABRA* HUDS.,
ULMUS MINOR GLED. A *ULMUS LAEVIS* PALL.)



RNDr. JANA MALÁ, CSc.
Ing. PAVLÍNA MÁCHOVÁ, PH.D.
Ing. HELENA CVRČKOVÁ, PH.D.
Ing. JAROSLAV DOSTÁL
Mgr. KAREL DOLEŽAL, Dr.

LESNICKÝ PRŮVODCE

Certifikovaná metodika

4/2010

**VYUŽITÍ MIKROPROPAGACE
PRO REPRODUKCI
AUTOCHTONNÍCH DRUHŮ JILMU
(*ULMUS GLABRA* HUDS.,
ULMUS MINOR GLED.
A *ULMUS LAEVIS* PALL.)**

Certifikovaná metodika

RNDr. Jana Malá, CSc.

Ing. Pavlína Máchová, Ph.D.

Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.

Ing. Jaroslav Dostál

Mgr. Karel Doležal, Dr.

Lesnický průvodce 4/2010

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště
<http://www.vulhm.cz>

Odpovědný redaktor: Mgr. E. Krupičková
e-mail: krupickova@vulhm.cz

ISBN 978-80-7417-034-8
ISSN 0862-7657

USE OF MICROPROPAGATION FOR REPRODUCTION OF AUTOCHTHONOUS SPECIES OF ELMS (*ULMUS GLABRA* HUDS., *ULMUS MINOR* GLED. AND *ULMUS LAEVIS* PALL.)

Abstract

Elms are found, both naturally and cultivated, throughout temperate zone of the northern hemisphere. Micropropagation technology is used for reproduction of all species (*Ulmus glabra*, *U. minor*, and *U. laevis*) occurring in the Czech Republic. The *in vitro* induction of organogenesis, multiplication of shoots, rooting and acclimatization of above mentioned elm species were optimized and standardized. New aromatic cytokinins, the 6-(3-hydroxybenzylamino)purine (mTopolin) and the 6-(3-methoxybenzylamino)purine-9- β -D-ribofuranoside (MeOBap) were used for retardation of the senescence during multiplication stage and for rooting support. Technological criteria for explant culturing and for complete plant regeneration were determined.

Key words: elms, clonal propagation, plant regeneration

Recenzenti: Ing. Lada Krňáčová
Ing. Milan Pexidr

Adresa autorů:

RNDr. Jana Malá, CSc., Ing. Pavlína Máchová, Ph.D., Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.,
Ing. Jaroslav Dostál
Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.
Strnady 136, Jíloviště 252 02
e-mail: mala@vulhm.cz; machova@vulhm.cz; cvrckova@vulhm.cz

Mgr. Karel Doležal, Dr.
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.
Rozvojová 263, 165 02 Lysolaje - Dejvice
e-mail: karel.dolezal@upol.cz

Obsah

| | |
|---|-----------|
| CÍL METODIKY..... | 7 |
| ÚVOD | 7 |
| VLASTNÍ POPIS METODIKY | 7 |
| Standardní metodické postupy mikropropagace..... | 7 |
| Zakládání primárních kultur | 7 |
| Indukce organogeneze a multiplikace..... | 8 |
| Zakořeňování a aklimatizace | 9 |
| Výsadba na venkovní plochy..... | 10 |
| SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ..... | 11 |
| POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY | 12 |
| DEDIKACE | 13 |
| LITERATURA..... | 13 |
| Seznam použité související literatury | 13 |
| Seznam publikací, které předcházely metodice | 14 |
| SUMMARY..... | 16 |

CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsání efektivního postupu reprodukce rodičovských nebo šlechtitelských stromů u autochtonních populací jilmů (jilm horský – *Ulmus glabra* HUDS., jilm habrolistý – *Ulmus minor* GLED. a jilm vaz – *Ulmus laevis* PALL.), které byly silně ohroženy grafiózou a zachování jejich genetického materiálu pro budoucí generace.

ÚVOD

Jilmy představují významný prvek diverzity lesních ekosystémů v celém severním mírném lesním pásmu. V lesnické praxi se obvykle člení na tři základní druhy (jilm horský – *Ulmus glabra* HUDS., jilm habrolistý – *Ulmus minor* GLED. a jilm vaz – *Ulmus laevis* PALL.).

V České republice je zastoupení jilmů silně ohroženo grafiózou. Zejména jilm habrolistý již téměř na svých původních stanovištích vymizel a dospělé stromy nepoškozené grafiózou se vyskytují velmi vzácně. V lesnické praxi se běžně používá vegetativní množení jilmů roubováním a řízkováním. Roubovanci však často trpí odhojováním roubu od podnože a řízkování je efektivní pouze, pokud jsou řízky odebírány z mladých jedinců do cca 15 let. Dosud netradiční metodou je množení jilmů explantátovými kulturami (CHALUPA 1983, BIONDI et al. 1984, CORCHETTE et al. 1993, FINK et al. 1986, KARNOSKY et al. 1982, MALÁ 2000, MALÁ et al. 2007). Zvládnutí techniky mikropropagace je nezbytné i pro genetické inženýrství, tj. zavádění nových vlastností, např. rezistence ke grafióze do genomu jilmu (FENNING et al. 1993).

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Standardní metodické postupy mikropropagace

Zakládání primárních kultur

Rostlinný materiál (dormantní pupeny) lze odebírat z rodičovských stromů v jarním (březen, duben) a podzimním termínu (říjen, listopad). Pupy se jednotlivě sterilizují v 1% roztoku chlornanu sodného (Savo, Bochemie, a. s., ČR) a třikrát promyjí sterilní destilovanou vodou. Vnější šupiny pupenů se sterilně odstraní a extirpované

vzrostné vrcholy se umístí na indukční agarové živné médium připravené v poměru 6 g agaru (Dr. Kulich Pharma, s. r. o., ČR) na 1 000 ml živného média a plněné po 50 ml do Ehrlenmeyerových 100ml baněk. Kultury explantátů jsou umístěny v kultivačních místnostech, kde se udržují definované podmínky teploty a osvit (24 °C, bílé fluorescenční světlo ($30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 16hodinová fotoperioda).

Indukce organogeneze a multiplikace

K indukci organogeneze se extirpované vzrostné vrcholy umístí na modifikované MS médium (viz tab. 1) doplněné o BAP v koncentraci $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, IBA $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ a s koncentrací glycinu 2 mg.l^{-1} , glutaminu 200 mg.l^{-1} a kaseinového hydrolyzátu 200 mg.l^{-1} . Po vytvoření prvních výhonů se kultury přesadí na multiplikační médium. Podmínkou úspěšné kultivace je včasné přesazení kultur na čerstvá média (pasáže po 10 – 14 dnech). Multiplikační médium se liší použitým cytokininem mTopolinem o koncentraci $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Pro kultivaci je vhodné udržovat konstantní podmínky teploty a osvit (24 °C, bílé fluorescenční světlo ($30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 16hodinovou fotoperiodu).



Obr. 1: Vícevrcholová kultura jilmu horského

Tab. 1. MURASHIGE a SKOOG médium

| Mikroelementy | mg.l⁻¹ |
|---|--------------------------|
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 |
| FeNaEDTA | 36.70 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 |
| KI | 0.83 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 16.90 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.25 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.60 |
| Makroelementy | mg.l⁻¹ |
| CaCl ₂ | 332.02 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.00 |
| KNO ₃ | 1900.00 |
| MgSO ₄ | 180.54 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.00 |
| Vitamíny | mg.l⁻¹ |
| Glycine | 2.00 |
| Myo-Inositol | 100.00 |
| Nicotinic acid | 0.50 |
| Pyridoxine HCl | 0.50 |
| Thiamine HCl | 0.10 |

Zakořeňování a aklimatizace

Před využitím vícevrcholových kultur (obr. 1) k dopěstování kompletních rostlin doporučujeme kultury vybrané pro odběr mikrořízků pasážovat po dobu 8 týdnů na multiplikačním médiu s cytokininem MeOBap v koncentraci 0,2 mg.l⁻¹. K zakořeňování mikrořízků je vhodné použít výhony o délce cca 4 cm. Zakořeňování probíhá ve dvou stupních, přičemž v prvním týdnu se mikrořízky kultivují ve tmě na třikrát zředěném základním médiu MS bez cytokininů doplněném 6 mg.l⁻¹ NAA a pak jsou přesazeny na stejné médium bez fytohormonů za stejných osvitových a teplotních kultivačních podmínek jako pro multiplikaci. Rostliny s vyvinutými kořeny se přesazují ze zakořeňovacího média do vhodných sadbovačů, např. do 24buňkových

sadbovačů o rozměrech 352 mm × 216 mm × 100 mm (BCC HIKO V – 150, Stuewe & Sons, Inc., Tagent, USA) naplněných agroperlitem (Perlit Praha, spol. s r. o.) a 2x týdně se zalévají základním médiem MS (ředění 1 : 10, destilovaná voda).

Pro aklimatizaci se osvědčila teplota 20 °C, osvětlení o intenzitě 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 24hodinová světelná fotoperioda a vysoká relativní vzdušná vlhkost (90%), která se postupně snižuje na 70 % postupným odvětráváním.

Po třech týdnech v agroperlitu se rostliny přesazují do sadbovačů HIKO V – 530 (rozměr 350 mm × 215 mm × 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, spol. s r. o.) v poměru 2 : 1 : 1. Pro další dopěstování se využívá skleník, kde se postupně adaptují (3 – 4 týdny) při 70% relativní vzdušné vlhkosti. Pro růst v agroperlitu i pěstebním substrátu se osvědčily sadbovače firmy BCC Growing trays, které nebrání rozvoji kvalitního kořenového systému. Jejich předností je, že nemají pevné dno a kořenový systém rostlin se může dobře vyvíjet. Dalšími výhodami jsou rozměry a kónický tvar sadbovačů, které jsou vhodné pro růst kosterních kořenů, a dále rozmístění podélných nálitků na vnitřní straně sadbovačů, které napomáhají správnému vývoji kořenů.

Výsadba na venkovní plochy

Po aklimatizaci se výpěstky *in vitro* vysazují k dopěstování na venkovní záhony, případně jsou přesazeny do vhodných obalů se zahradnickým substrátem, které umožňují správný růst kořenového systému, viz Katalog biologicky ověřených obalů (www.vulhmop.cz). Vzhledem k rychlému růstu sazenic je pro jilmy optimální výsadba na cílové stanoviště po roce dopěstování ve venkovních podmínkách, obr. 2.

Vysvětlivky:

MS – médium podle MURASHIGE a SKOOGA (1962); BAP – 6-benzylaminopurin; IBA – β -indolylmáselná kyselina; NAA – α -naftyloctová kyselina, MeOBap – 6-(3-methoxybenzylamino)purin; mTopolin – 6-(3-hydroxybenzylamino)purin



Obr. 2: Výpěstky *in vitro* jilmu habrolistého na venkovním záhonu

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost mikropropagačních postupů spočívá ve využití metody indukce organogeneze pro reprodukci explantátů odebíraných z dospělých stromů jilmů s originálním využitím nových derivátů cytokininů (mTopolin a MeOBap) a v originálním řešení zakořeňování a aklimatizace.

Organogeneze se ukázala prozatím jako nejúspěšnější mikropropagační metoda pro listnaté dřeviny. Existují však některé překážky, které brání širšímu využití těchto technik pro reprodukci dospělých stromů jilmů. Je to především senescence (předčasné stárnutí kultur) a podobně jako u dalších dřevin se i u některých klonů jilmu vyskytuje problém se zakořeňovací fází (MALÁ et al. 2006). Při mikropropagaci rostlin se nejčastěji používá pro indukci organogeneze a multiplikace cytokinin 6-benzylaminopurin (BAP), u některých rostlinných druhů včetně jilmů byla však po jeho použití pozorována senescence (McCOWN, McCOWN 1987, CHENG, SHI 1995) a inhibice růstu kořenů nebo jejich nerovnoměrný růst (WERBROUCK et al. 1995, 1996). Mikropropagační postup organogeneze u jilmů byl proto inovován

využitím nového cytokininu přidávaného v multiplikační fázi (mTopolin – 6-(3-hydroxybenzylamino)purin), čímž se výrazně snížila senescence kultur a využitím cytokininu MeOBap (6-(3-methoxybenzylamino)purin) se urychlilo zakořeňování mikrořízků.

Originalita popsaného řešení mikropropagace spočívá tedy především ve využití nových derivátů cytokininů. Cytokininy, purinové deriváty substituované na aminokyselině v poloze 6 (N⁶) jsou důležitou třídou fytohormonů, které se podílejí na regulaci mnoha fyziologických a vývojových procesů v rostlinách (LETHAM, PALNI 1983). Endogenní cytokininy se mohou vyskytovat v různých metabolických formách např. ve formě volných bází, ribozidů (R), N-glukozidů (G), O-glukozidů (OG) a nukleotidů (5'MP) (LETHAM, PALNI 1983). V závislosti na charakteru substituce se mohou vyskytovat isoprenoidní nebo aromatické formy cytokininů. Mezi aromatické cytokininy patří 6-benzylaminopurin (BAP), meta- a ortho-topolin a jejich metabolity. Isoprenoidní formy jsou reprezentovány cytokininy odvozenými od bázi N⁶ – (Δ^2 – isopentenyl)adenin, dihydrozeatin a zeatin (STRNAD 1997). Na základě experimentální práce s rozdílnými cytokininy BAP, mTopolin a MeOBap na multiplikaci explantátů a na následné zakořeňování mikrořízků byl vypracován standardní postup, který zvyšuje schopnost multiplikace a zakořeňování jilmů ve srovnání s obecně používaným cytokininem BAP.

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Moderní biotechnologické postupy (zahrnující mikropropagace a genetické inženýrství) představují v současné době nové možnosti zachování a reprodukce genetických zdrojů ohrožených původních druhů a dílčích populací rodu *Ulmus* a současně představují nové možnosti ve šlechtění lesních dřevin. Aplikace biotechnologií umožňuje překonání fyziologických bariér, rychlou a efektivní reprodukci ohrožených populací případně vyšlechtěných genotypů, ať již pomocí klasických metod nebo postupy genetického inženýrství.

Výpěstky *in vitro* lze využít pro provozní výsadby (klonové archivy *ex situ*, semenné sady) nebo přímo k reintrodukcii na původní stanoviště.

Stanoviště pro výsadbu musí odpovídat zásadám stanoveným pro rajonizaci reprodukčního materiálu lesních dřevin, přírodním lesním oblastem a vegetačním lesním stupňům. Podíl mikropropagovaných klonů při zalesňování není u jilmů stanoven, genetický monitoring u původních populací v ČR nebyl dosud proveden, ale na základě praxe se předpokládá, že zastoupení cca 30 klonů z jedné přírodní lesní oblasti by mělo být dostačující k tomu, aby nedocházelo ke snižování genetické variability populace.

Výpěstky *in vitro* musí splňovat kritéria požadovaná pro sadební materiál uvedená v ČSN 482115, v zákoně č. 149/2003 Sb. (zákon o uvádění do oběhu reprodukčního materiálu lesních dřevin) a ve vyhláškách č. 29/2004 Sb. a č. 139/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů. Výpěstky *in vitro* jilmu jsou v ČR vysazeny na šesti demonstračních objektech společně se sazenicemi generativního původu. Nejstarší výsadby na ploše Kluky a Polná (založené v roce 1998) byly hodnoceny z hlediska morfologie, růstu a mortality. Mezi jedinci odlišného původu (*in vitro* a generativní sazenice) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v průměrném přírůstu, morfologii a mortalitě, obr. 3.

Popsaná metodika byla již ověřena v poloprovozních podmínkách v zařízení Laboratoř biotechnologií Olešná, Jihočeské lesy, a. s., kde se podle uvedené metodiky podařilo napěstovat několik desítek tisíc sazenic.

DEDIKACE

Vypracování metodiky bylo podporováno: výzkumným projektem MZE č. 0002070203 a projektem č. QI92A247.

LITERATURA

Seznam použité související literatury

- BIONDI S., CANCIANI L., BAGNI N. 1984. Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured *in vitro*. Can. J. Bot., 62: 2385-2390.
- CORCHETE M. P., DIEZ J. J., VALLE T. 1993. Micropropagation of *Ulmus pumila* L. from mature trees. Plant Cell Rep., 12: 534-536.
- FENNING T. M., GARTLAND K. M. A., BRASIER, C. M. 1993. Micropropagation and regeneration of elm, *Ulmus procera* SALISBURY. J. Exp. Bot., 44: 1211-1217.
- FINK C. V. M., STICKLEN M. B., LINEBERGE R. D., DOMIR S. C. 1986. *In vitro* organogenesis from shoot tip, internode, and leaf explants of *Ulmus* x „Pioneer“. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 7: 237-245.
- CHALUPA V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. Commun. Inst. Forest. Czech., 13: 7-39.
- CHENG Z. M., SHI N-Q. 1995. Micropropagation of mature Siberian elm in two steps. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 41: 197-199.

- KARNOSKY D. F., MICKLER R. A., LANGE D. D. 1982. Hormonal control of shoot and root induction in hypocotyls cycles cultures of American elm. *In vitro*, 18: 275.
- LETHAM D. S., PALNI L. M. S. 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34: 163-197.
- MCCOWN D. D., MCCOWN B. H. 1987. North American hardwoods. In: Bonga J. M., Durzan D. (eds.): *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 3: Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms, p. 247-26. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- STRNAD M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.*, 101: 674-688.
- WERBROUCK S. P. O., VAN DER JEUGT B., DEWITTE W., PRINSEN E., VAN ONCKELEN H. A. 1995. The metabolism of benzyladenine in *S. floribundum* SCHOTT „PETITE“ in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Rep.*, 14: 662-665.
- WERBROUCK S. P. O., STRNAD M., VAN ONCKELEN H. A., DEBERGH P. C. 1996. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol. Plant.*, 98: 291-298.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- MALÁ J. 2000. Micropropagation of mature elm trees *in vitro*. *J. Forest. Sci.*, 46: 260-264.
- MALÁ J., GAUDINOVÁ A., DOBREV P., EDER J., CVIKROVÁ M. 2006. Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots. *Biologia Plantarum*, 50 (1): 8-4.
- 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*, p. 237-246, Springer Verlag.



Obr. 3: Výpěstky *in vitro* jilmu habrolistého 12 let po výsadbě na demonstračním objektu Kluky

USE OF MICROPROPAGATION FOR REPRODUCTION OF AUTOCHTHONOUS SPECIES OF ELMS (*ULMUS GLABRA* HUDS., *ULMUS MINOR* GLED. AND *ULMUS LAEVIS* PALL.)

Summary

The genus *Ulmus* comprises numerous tree species found in temperate regions of the northern hemisphere and in mountainous parts of the tropics. *U. glabra* HUDS., *U. minor* GLED., and *U. laevis* PALL. are distributed in the Czech Republic. They are highly valued for they are able to withstand environmental stresses such as air pollution, drought, and flooding. From these reasons they represent an important component of forest ecosystems diversity. On the other hand, they are the most widely planted ornamental trees in the countryside and also in street planting as avenue trees in the cities.

The organogenesis is regarded as the most advantageous micropropagation technology that proved to be particularly suitable for clonal propagation of broadleaved trees. Disposal of planting material from *in vitro* cultivation in forest breeding practice is under legislature for vegetative propagated plant material.

The modified agar medium MS (MURASHIGE and SKOOG 1962) with concentrations 0.2 mg.l⁻¹ of BAP, 0.1 mg.l⁻¹ of IBA, 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) were used for induction of organogenesis. The primary cultures were transferred onto the multiplication MS medium with concentration of 0.5 mg.l⁻¹ of mTopolin, and 0.1 mg.l⁻¹ of IBA, 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 after every 10 – 14 days. Cultivation proceeded in air-conditioned room at 24 °C, and under white fluorescent light (30 μmol.m⁻².s⁻¹) and a 16 hrs photoperiod.

Elm cultures selected for collection of microcuttings could be before rooting cultured in multiplication media supplemented by 0.2 mg.l⁻¹ of MeoBap for 8 weeks. Microcuttings for culturing of complete plants were rooted in the agar medium MS diluted 1 : 3 without cytokinins, and with 6 mg.l⁻¹ of NAA, and 10 g.l⁻¹ of saccharose. The cultures were grown in the darkness and after 1 week were transferred into the same medium without phytohormones in which they were cultured under the same conditions as during induction and multiplication stages.

Plants with well-developed roots were transferred from rooting medium into pots BCC HIKO V – 150 (Stuewe & Sons, Inc., Tangent, USA) with agroperlite and

watered by basal MS medium diluted 1 : 10 without phytohormones and saccharose. Cultures were acclimatized in air-conditioned room at 20°C and 90% relative air humidity, which gradually decreases to 70% under white fluorescent light (30 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and a 24 hrs photoperiod. After 3 weeks, the plants were transferred into pots BCC HIKO V – 530 with non-sterile substrate (in relations 2 soil : 1 peat : 1 agroperlite) and located in glasshouse, where they were adapted for 3 – 4 weeks in the 70% of relative air humidity. Acclimatized plants were planted onto outdoor beds. Optimal time for outdoor culturing of elm plants 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, joint-stock company.

LESNICKÝ PRŮVODCE



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