

**MIKROPROPAGACE A VYUŽITÍ
SADEBNÍHO MATERIÁLU TŘEŠNĚ PTAČÍ
(*PRUNUS AVIUM*)**

Recenzovaná metodika

**Jana Malá
Pavλίna Máchová
Helena Cvrčková**

Strnady 2008

Lesnický průvodce 2/2008

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 978-80-86461-98-4

ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION AND USE OF *PRUNUS AVIUM* PLANTING STOCK

Abstract

Micropropagation technology is frequently used for reproduction of endangered and valuable populations of wild cherry. Procedures for regeneration of explants up to plantlets were standardized and reproductive plant material was acquired for consequent plant breeding and reintroduction.

The organogenesis, i. e. the induction in most cases of axillary or adventive shoots on the primary explants, proved to be the most advantageous technology for clonal propagation of wild cherry. These shoots (microcuttings) were used for induction of rhizogenesis and then the plantlets were acclimatized and cultured up to plants capable for outplanting. Maintenance of technological criteria for explant culturing as well as complete plant regeneration determine morphological quality of in vitro produced planting stock.

Recenzenti: Ing. J. Cafourek, Ph.D.
Ing. M. Řešátko, CSc.

Adresa autorů:

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

Obsah:

CÍL METODIKY	7
VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
Úvod	7
Standardizovaný metodický postup mikropropagace	8
Zakládání primárních kultur	8
Kultivační podmínky multiplikace	8
Zakořeňování a aklimatizace	8
Výsadba na venkovní plochy	9
Hodnocení růstu výpěstků in vitro	9
SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	11
POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	14
DEDIKACE	15
LITERATURA	15
Seznam použité související literatury	15
Seznam publikací, které předcházely metodice	16
SUMMARY	17

CÍL METODIKY

Cílem mikropropagace lesních dřevin je vedle zajišťování materiálu pro reprodukci cenných, ohrožených a endemtních populací, které nelze efektivně množit jiným způsobem, získání sazenic v rámci šlechtitelských programů a tvorba syntetických populací.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Úvod

Třešeň ptačí je dřevina rozšířená po celé Evropě s výjimkou nejnižnějších částí. Vyskytuje se na písčito-hlinitých a hlinitých půdách bohatých na živiny v termofytku a mezofytku, ale zasahuje i do submontánního stupně, kde roste jen na chráněných místech. Je odolná vůči imisím a využívá se k rekultivacím. Třešeň poskytuje velice kvalitní dřevo a je jednou z lesních dřevin perspektivních pro zakládání lignikultur. Efektivní metodou reprodukce je mikropropagace, kterou lze rychle a ekonomicky výhodně namnožit kvalitní sadební materiál z vybraných rodičovských jedinců a zároveň dlouhodobě uchovávat genové zdroje v explantátové bance pro další využití, např. při zakládání klonových archivů (směs klonů), semenných sadů, pro studium genetické variability, k reintrodukcii apod. Jednou z nepřehlédnutelných výhod mikropropagačních postupů je možnost namnožení 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 rodičovský strom nepoškozuje. Dostatečná genetická variabilita množené populace je zaručena vhodným klonovým složením výchozí in vitro množitelské populace. Nejúspěšnější mikropropagační metodou, která se osvědčila pro klonové množení zejména listnatých dřevin, je organogeneze. Regenerace dřevin z primárních explantátů je podmíněna vypracováním vhodných technologických postupů umožňujících indukci organogeneze, která musí být následována úspěšnou regenerací kompletní rostliny. Základními mechanismy uplatňujícími se při růstových pochodech jsou dereprese meristémů axilárních pupenů nebo reorganizace meristémů a růst adventivních pupenů. 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. Dodržením ověřených metodických postupů lze však dosáhnout efektivní reprodukce požadovaných genotypů.

Standardizovaný metodický postup mikropropagace

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) a třikrát promyjí sterilní destilovanou vodou. Ve sterilním prostředí laminárních boxů se odstraní vnější šupiny pupenů a extirpované vzrostlé vrcholy jsou umístěny na indukční agarové živné médium (50 ml média v Erlenmeyerově 100ml baňce). K indukci organogeneze u třešně ptačí se používá modifikované médium MS (MURASHIGE, SKOOG 1962) s koncentrací fytohormonů BAP 0,2 mg.l⁻¹ a IBA 0,1 mg.l⁻¹ a s koncentrací glutaminu a kaseinového hydrolyzátu 200 mg.l⁻¹, sacharóza v koncentraci 30 g.l⁻¹, agar 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.

Kultivační podmínky multiplikace

Po vyrašení axilárních, případně adventivních pupenů na primárním explantátu jsou kultury in vitro třešně ptačí pěstovány na multiplikačním médiu MS s koncentrací BAP 0,3 mg.l⁻¹, IBA 0,1 mg.l⁻¹ a s koncentrací glutaminu a kaseinového hydrolyzátu 200 mg.l⁻¹, koncentrace sacharózy je 30 g.l⁻¹ a 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 μmol m⁻².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.

Zakořeňování a aklimatizace

Mikrořízky určené pro dopěstování kompletních rostlin se standardně zakořeňují v agarovém médiu MS o čtvrtinové koncentraci makro a mikroelementů, koncentrací sacharózy 10 g.l⁻¹ a auxinu IBA 0,6 mg.l⁻¹. Zakořeňování probíhá za stejných

kultivačních podmínek jako multiplikace. Pro zvýšení účinnosti zakořenění probíhá první fáze zakořeňování (7 dní) ve tmě. První kořeny se objevují v závislosti na klonu v průběhu 3 - 4 týdnů.

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 (bez fytohormonů a sacharózy) ředěným v poměru 1 : 10 destilovanou vodou. Aklimatizace probíhá v obdobných kultivačních podmínkách (teplota 24 °C, osvětlení o intenzitě 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 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, spol. s r. o.) v poměru 2 : 1 : 1 a přenáší 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 nepřijatelné deformaci kořenů ve smyslu platné ČSN 48 2115.

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). Vzhledem k rychlému růstu sazenic je pro třešň ptačí optimální výsadba na stanoviště po roce dopěstování ve venkovních podmínkách.

Hodnocení růstu výpěstků in vitro

Morfologie sazenic vypěstovaných in vitro (výpěstky in vitro) byla porovnána se sazenicemi odpovídajícím parametrům ČSN 48 2115 (graf 1). Výpěstky in vitro byly hodnoceny podle dřevin (javor, jasan, jilm), které mají podobný charakter růstu jako třešň ptačí. V morfologii náhodně vybraných výpěstků nebyly pozorovány abnormality vývoje nadzemní části a kořenového systému (tab. 1 a 2).

Vyžrálost kořenového systému byla ověřována stanovením obsahu ligninu a jeho depozice v buňkách kořenových pletiv u aklimatizovaných rostlin po jejich výsadbě do perlitu a pěstebního substrátu. Lignifikace je považována za spolehlivý znak

odrážející stupeň maturace kořenů (FUKUDA, KOMAMINE 1980). V hypodermis kořene a v Caspariho proužku a endodermis kořene se mimo ligninu ukládá také polymerní suberin zahrnující řadu fenolových lipofilních látek, který je součástí bariéry zabráňující apoplastickému transportu (SCHREIBER et al. 1999). U některých rostlinných druhů se ve specializovaných kořenových pletivech vyvíjí ztlustění buněčných stěn (ϕ -thickening), které zvyšuje mechanickou pevnost. Lignin byl detegován kyselinou solnou s floroglucinolem a Mäuleovou reakcí (JOHANSEN 1940). Obsah ligninu v pletivech byl stanoven spektrofotometricky v extraktech vazbou na thioglykolovou kyselinu (BRUCE, WEST 1984).

Biochemické analýzy umožnily určit nejen rozdíly v průběhu lignifikace kořenů, ale také odlišnosti kořenové architektury a sekundárních protektivních pletiv. Největší vzrůst tvorby ligninu a také nejvýraznější rozdíly celkového obsahu ligninu byly zjištěny během kultivace v agoperlitu. Po přesazení do směsi zeminy, rašeliny a perlitu již tyto rozdíly nebyly signifikantní. Obsahy ligninu mezi mikropropagovanými výpěstky a sazenicemi vypěstovaných ze semen se nelišily. U kořenů třešně ptačí přesazené ex vitro bylo zjištěno nápadné ztlustění stěn (ϕ -thickening) buněk kortikální vrstvy přiléhající k endodermis, které je dáno jejich silnou lignifikací. Je otázkou, zda vysoký obsah ligninu v kořenech třešně je charakteristický pro růst kořenového systému, nebo je způsoben faktory vnějšího prostředí.

Po dopěstování ve venkovních podmínkách byly výpěstky in vitro třešně ptačí spolu s generativními sazenicemi vysázeny na demonstrační objekty v přírodní lesní oblasti 10 (Městské lesy Písek, Středočeská pahorkatina) a 16 (Lesní družstvo Polná, Českomoravská vrchovina). Objekty jsou oploceny, označeny informační tabulí s popisem plochy, a je na nich prováděna běžná údržba. V průběhu růstu výpěstků in vitro a generativních sazenic byly sledovány: přírůst, tloušťka kořenového krčku a mortalita. Pro zhodnocení výsledků byla využita metoda analýzy variance. Růst a vývoj sazenic je hodnocen od roku 1998.

Výsledky hodnocení sazenic prokazují, že mikropropagované rostliny nevykazují retardace růstu a morfologie nadzemní části je srovnatelná s generativními sazenicemi. Růstové charakteristiky (přírůst, tloušťka kořenového krčku) jsou uvedeny v tabulce 3a, b.

Ve tvaru a větvení nadzemní části se výpěstky in vitro a generativní sazenice nelišily.

Vysvětlivky:

MS - médium podle Murashige a Skooga; BAP - 6-benzylaminopurin; IBA - β -indolylmásečná kyselina; NAA - α -naftyloctová kyselina

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost mikropropagačních postupů spočívá v modifikaci živných médií pro kultivaci explantátů odebíraných z dospělých stromů, v originálním řešení aklimatizačních postupů na základě hodnocení kvality sadebního materiálu.

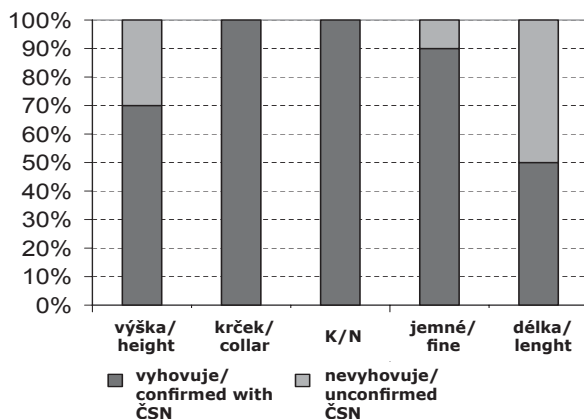
První práce dokazující možnost vypěstování kompletních rostlin z primárních explantátů (výhony, pupeny, listy, zygotická embrya, kotyledony), v podmínkách *in vitro* se u listnatých dřevin datují do 30. let minulého století (GAUTHERET 1934, *Ulmus campestris*), u jehličnanů o něco později (REINERT, WHITE 1956, *Picea glauca*).

V českých zemích byly ve VÚLHM, jako první mikropropagovány počátkem 70. let smrk (*Picea abies*) a douglaska (*Pseudotsuga menziesii*) (CHALUPA, DURZAN 1973). Díky dlouholetému výzkumu je v současné době úspěšně rozpracována, standardizována a ověřena metodika pěstování explantátových kultur pro většinu druhů listnatých i jehličnatých lesních dřevin přirozeně se vyskytujících nebo lesnický pěstovaných v ČR.

Třešňí ptačí se intenzivně zabývají ve Velké Británii, Německu a Francii v dlouhodobých šlechtitelských programech, v nichž se pro reprodukci jejich genových zdrojů používají již dlouho a úspěšně mikropropagační technologie (CORNU, CHAIX 1981, HAMMATT, GRANT 1998, HAMMATT 1999, ESCALLETES, DOSBA 1993). V České republice byla metoda *in vitro* využita při reprodukci ohrožených a cenných populací třešňí ptačí pro založení archivu explantátů. Byly vypracovány standardní postupy pro dopěstování kompletních rostlin a získán reprodukční materiál, který je využitelný pro další šlechtitelské záměry a reintrodukci (MALÁ et al. 1999).

Nejúspěšnější metodou, která se osvědčila pro klonové množení třešňí ptačí, je organogeneze, tj. indukce nejčastěji adventivních nebo axilárních výhonů na primárním explantátu. Tyto výhony (mikrořízky) jsou pak využity k indukci rhizogeneze a následně jsou kompletní rostliny aklimatizovány a dopěstovány ve výsadby schopné sazenice. Dodržení technologie dopěstování kompletní rostliny rozhoduje o morfologické kvalitě sadebního materiálu vypěstovaného *in vitro*. K indukci kořenového systému dochází v agarovém médiu. Ve srovnání s indukcí rhizogeneze v jiných substrátech je tento postup výhodnější, protože se získá vyšší podíl úspěšně zakořeněných rostlinek (80 – 85 %) a ztráty explantátů jsou výrazně nižší (PINKER et al. 1995). Na zvýšení počtu zakořeněných rostlin o téměř 20 % se kladně podílí iniciace růstu kořenů ve tmě.

Kořeny rychle rostoucí třešňí ptačí se plnohodnotně vyvíjejí až ve směsi zeminy, perlitu a rašeliny. Potvrdili jsme dřívější závěry, že stupeň lignifikace kořenů rostlin lze považovat za doprovodnou známku funkční vyvinutosti kořenových pletiv. Pro lesnickou praxi je důležité zjištění, že nebyly nalezeny rozdíly v obsahu ligninu v kořenových pletivech mikropropagovaných sazenic a generativních sazenic. Stejně tak nebyly zjištěny rozdíly v morfologii a růstu mezi výpěstky *in vitro* a generativními sazenicemi.



Graf. 1: Hodnocení jednotlivých znaků/Evaluation of particular marks
 Porovnání s ČSN 48 2115 platnou v současné době (s předpokládanou tolerancí podle komentáře k ČSN). Grafy představují procentické vyjádření sadebního materiálu odpovídajícího požadavkům ČSN 48 2115 (včetně tolerancí dle komentáře k normě). Použité popisy v grafech jsou následující: výška – výška nadzemní části, krček – průměr kořenového krčku, K/N – poměr objemů kořenů ku nadzemní části, jemné – podíl objemu kořenů slabších než 1 mm v objemu celého kořenového systému. délka – délka kulového kořene/Comparison with ČSN 48 2115 at present valid (with supposed tolerance according to ČSN commentary). Graphs present proportional expression of planting stock corresponding to the ČSN 48 2115 requirements (incl. tolerance according to the standard). Used description in graphs is: height – height of above-ground part, collar – average of root collar, K/N – ratio of root volumes to above-ground part, fine – ratio of root volumes thinner than 1 mm in volume of the entire root system, length - length of taproot

Tab. 1: Růstové charakteristiky výpěstků třešně ptačí po výsadbě na venkovní záhony lesní školka Baně/Growth characteristics of wild cherry plantlets after planting in the outside beds of Baně nursery

Rok/ Year	Počet ks/ Number piece	Mortalita%/ Mortality	Průměrná výška cm/ Average height	± SDcm	Průměrný přírůst cm/ Average increment	± SDcm	Tloušťka kořenového krčku cm/ Thickness of root collar	± SDcm
30.4.	163		18,21	6,76			0,43	0,15
26.10.	162	0,61	33,18	22,08	14,97	9,54	0,86	0,48

Tab. 2: Základní morfologické charakteristiky sadebního materiálu třešně ptačí/
Basic morphological characteristics of wild cherry planting stock

Výška/ Height (cm)	Průměr krčku/Collar diameter (mm)	Délka kůl.kořene/ Length of taproot cm)	Objem kořenů k nadzem. částem/ Volume of roots to above ground parts	Podíl jemných kořenů/Proportion of fine roots (%)
48,0±17,52	7,49±1,247	20,4±2,21	2,670±1,357	35,63±10,022

Poznámka: průměr = průměrná hodnota z 20 ks, sx = směrodatná odchylka výběru
Note: average = mean value from 20 pcs, sx - standard deviation

Tab. 3a. Růstové charakteristiky třešně ptačí na demonstračních plochách/
Growth characteristics of wild cherry on demonstration plots

Výpěstky in vitro - demonstrační objekt Kluky/Plantlets in vitro - demonstration
object Kluky

Rok/ Year	Vysazeno/přežívá/ Planted/survived [ks]	Mortalita/ Mortality [%]	Průměrná výška/ Average heighth [cm]	Tloušťka koř. krčku/ Thickness of root collar [mm]	
1998	200	197	1,5	52,2	5,9
1999		183	8,5	125,4	11,3
2000		183	8,5	175,0	22,4
2001		183	8,5	227,0	37,4
2002		181	9,5	261,2	-
2003		181	9,5	295,8	-
2004		181	9,5	333,2	-
2005		181	9,5	424,0	-

Generativní sazenice - demonstrační objekt Kluky/Generative plants - demon-
stration object Kluky

Rok/ Year	Vysazeno/přežívá/ Planted/survived [ks]	Mortalita/ Mortality [%]	Průměrná výška/ Average heighth [cm]	Tloušťka koř. krčku/ Thickness of root collar [mm]	
1999	100	100	0,0	51,7	5,0
2000		98	2,0	102,7	11,5
2001		97	3,0	148,2	21,8
2002		95	5,0	191,3	-
2003		95	5,0	236,4	-
2004		95	5,0	294,4	-
2005		95	5,0	314,8	-

Tab. 3b. Růstové charakteristiky třešně ptačí na demonstračních plochách/Growth characteristics of wild cherry on demonstration plots

Výpěstky in vitro - demonstrační objekt Polná/Plantlets in vitro - demonstration object

Rok/ Year	Vysazeno/přežívá/ Planted/survived [ks]	Mortalita/ Mortality [%]	Průměrná výška/ Average height [cm]	Tloušťka koř. krčku/ Thickness of root collar [mm]
1998	200	88	56,0	5,6
1999		69	65,5	11,5
2000		68	66,0	159,5
2001		68	66,0	216,0
2002		67	66,5	264,5
2003		67	66,5	298,1
2004		67	66,5	329,5
2005		67	66,5	445,6

Generativní sazenice - demonstrační objekt Polná/Generative plants - demonstration object Polná

Rok/ Year	Vysazeno/přežívá/ Planted/survived [ks]	Mortalita/ Mortality [%]	Průměrná výška/ Average height [cm]	Tloušťka koř. krčku/ Thickness of root collar [mm]
1999	100	92	8,0	47,5
2000		85	15,0	81,3
2001		81	19,0	135,0
2002		79	21,0	177,0
2003		78	22,0	223,6
2004		77	23,0	272,0
2005		77	23,0	345,4

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

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 Vyhlášky 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 a dále výsledkům šlechtitelského testování. Podíl mikropropagovaného materiálu při zalesňování je stanoven platnými pravidly určujícími poměr vegetativního a generativního reprodukčního materiálu.

V projektech zaměřených např. na záchranu cenné populace je využití vegetativně množeného sadebního materiálu podmíněno dodržením konkrétních podmínek, dostatečného počtu klonů, podílu zastoupení vegetativního a generativního materiálu při výsadbě apod. 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 vzhledem 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.

DEDIKACE

Metodika je výstupem výzkumného záměru č. MZE0002070202 „Šlechtění lesních dřevin a záchrana genových zdrojů cenných a ohrožených populací včetně využití biotechnologických postupů, metod molekulární biologie a poznatků lesního semenářství v lesním hospodářství“.

LITERATURA

Seznam použité související literatury

- BRUCE R. J., WEST C. A. 1984. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.*, 91: 889-897.
- CORNU D., CHAIX C. 1981. Multiplication par culture in vitro de merisiers adultes (*Prunus avium*). In: Proc. IUFRO Sect. S2 01. 5th Int. Workshop „In Vitro“ Cultivation for Tree Species, Fontainebleau, France: 71-79.
- ESCALETTES V., DOSBA F. 1993. In vitro adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. *Plant Sci.*, 90: 201-209.

- FUKUDA A. H., KOMAMINE A. 1980. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.*, 65: 57-60.
- GAUTHERET R. 1934. Culture du tissu cambial. *CR Acad.Sci.Paris*, 198: 2195-2196.
- 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.
- HAMMATT N., GRANT N. J. 1998. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* EHRH. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). *Plant Cell Reports*, 17: 526-530.
- CHALUPA V., DURZAN D. J. 1973. Growth and development of resting buds of conifers in vitro. *Can. J. For. Res.*, 3: 196-208.
- JOHANSEN D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-797.
- PINKER I., JESCH H. H., KLAUSCH A. 1995. Rooting and acclimatization of in vitro propagated shoots of *Tilia cordata* "WEGA". *Gartenbauwissenschaft*, 60: 253-258.
- REINERT J., WHITE P. R. 1956. The cultivation on vitro of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*. *Physiol. Plant*, 9:177-789.
- SCHREIBER L., HARTMANN K., SKRABS M., ZEIER J. 1999. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.*, 50: 1267-1280.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- 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.
- MALÁ J., CVIKROVÁ M., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., MARTINCOVÁ J. 2002. Reprodukce ohrožených populací třešně ptačí (*Prunus avium*) in vitro. *Zprávy lesnického výzkumu*, 47: 5-8.
- SOUKUP A., MALÁ J., HRUBOVÁ M., KÁLAL J., VOTRUBOVÁ O., CVIKROVÁ M. 2004. Differences in anatomical structure and lignin content of roots of pedunculate oak and wild cherry – tree plantlets during acclimation. *Biologia plantarum*, 4: 481-489.
- 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* and *Prunus avium*). *Zprávy lesnického výzkumu*, 50: 219-274.

MICROPROPAGATION AND USE OF *PRUNUS AVIUM* PLANTING STOCK

Summary

Wild cherry (*Prunus avium*) is an economically important woody species throughout Europe with the exception of its most southern parts. Micropropagation represents the effective and economically advantageous technology enabling the reproduction of wild cherry planting material derived from selected elite parents and also the preservation of gene resources in the explant bank for further use. The organogenesis is regarded as the most advantageous technology that proved to be suitable for clonal propagation of particularly 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, SKOOG 1962) 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 was used for induction of wild cherry organogenesis. After 12 weeks, the cultures were transferred onto the multiplication MS medium with concentrations of phytohormones BAP 0.3 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 temperature 24 °C and under white fluorescent light (30 μmol.m⁻².s⁻¹) and a 16hrs photoperiod.

Microcuttings for culturing of complete plants were rooted in agar medium MS diluted 1 : 4 with IBA 0.6 mg.l⁻¹, and 10 g.l⁻¹ of saccharose. For the first 7 days the cultures grew in the darkness for accelerating of root growth and then were transferred into 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 agropelit and watered by basal MS medium diluted by distilled water 1 : 10 without phytohormones and saccharose. 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 agropelit) and located in glasshouse, where they were adapted to the 70% relative air humidity for 3–4 weeks. Acclimatized plants were planted onto outdoor beds. Optimal time for outdoor culturing of wild cherry plants before outplanting in 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.