

MIKROPROPAGACE JE ÁBU B E KU (*SORBUS TORMINALIS* (L.) CRANTZ)

LESNICKÝ PR VODCE



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

Recenzovaná metodika

4/2009

**MIKROPROPAGACE JEŘÁBU BŘEKU
(*SORBUS TORMINALIS* (L.) CRANTZ)**

Recenzovaná metodika

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

Strnady 2009

Vypracování metodiky bylo podporováno výzkumným záměrem MZe č. 0002070203.

Lesnický průvodce 4/2009

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 978-80-7417-013-3

ISSN 0862-7657

MICROPROPAGATION OF WILD SERVICE TREE (*SORBUS TORMINALIS* (L.) CRANTZ)

Abstract

The wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ) is a medium-sized deciduous tree reaching 15 to 25 m of height, with a trunk diameter up to 1.3 m. Nowadays, the wild service tree has become one of the most valuable hardwoods due to its great potential of wider use in forestry and forest ecology, as well as for its importance in the wood-processing industry. According to the latest data, this species is disappearing from forests of the Czech Republic and has been classified as endangered. Methods of clonal propagation on base of micropropagation technology were proved to be useful for its preservation. Described procedures for regeneration of explants up to plantlets were standardized and reproductive plant material was acquired for consequent plant breeding and reintroduction. Difficulties occurring during rooting stage of organogenesis were solved using exploitation of new different aromatic cytokinin MeoBAPr (6-(3-methoxybenzylamino) purine-9- β -D-ribofuranoside). Technological criteria for explant culturing and for complete plant regeneration were determined.

Key words: wild service tree, clonal propagation, organogenesis, plant regeneration

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

Adresa autorů:

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

Obsah:

CÍL METODIKY	7
VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
Úvod	7
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	12
e. Hodnocení růstu výpěstků <i>in vitro</i>	13
SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	14
POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	15
LITERATURA	16
Seznam použité související literatury	16
Seznam publikací, které předcházely metodice	17
SUMMARY	18

CÍL METODIKY

Cílem metodiky mikropropagace jeřábu břeku je popsání efektivního postupu reprodukce rodičovských nebo šlechtitelských stromů, které jsou významné z hlediska produkce a kvality dřeva a zachování jejich genetického materiálu pro budoucí generace.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Úvod

Jeřáb břek (*Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ)) se řadí mezi vzácné druhy lesních dřevin. V Evropě, kde sahá jeho rozšíření na sever do severozápadní německé nížiny, východního Polska a jižní části Ruska, se vyskytuje do nadmořské výšky 600 m. V lesních společenstvech se vyskytuje jen vtroušeně, netvoří čisté porosty, má malou konkurenční schopnost, plody jsou oblíbenou potravou zvěře (HEJNÝ, SLAVÍK 1992). Optimum výskytu leží v oblasti doubrav, v nichž zaujímá nejteplejší polohy. V České republice je nejhojnější ve středočeské silursko-devonské pánvi, v Českém středohoří a na jižní Moravě. Vzácněji zasahuje do přechodných společenství mezi bučinami a doubravami (habřiny s jedlí), kde se může udržet jen na místech se zvláštními půdními podmínkami (na sutích, slunných mělkých hřebenech a kamenitých vrcholech). Stejně zastoupení v nejteplejších variantách doubrav a šipákových hájů má po celé střední Evropě (FÉR 1994). Jedná se o pomalu rostoucí strom, který může v 80 - 100 letech dosáhnout až výšky 20 - 25 m. V současné době se tento druh řadí k cenným listnáčům s velkým potenciálem pro případné využití v lesnictví a lesnické ekologii. Patří také mezi nejvíce ceněné druhy v dřevařském průmyslu (DEMESURE et al. 2000).

Efektivní metodou reprodukce dospělých stromů jeřábu břeku 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. pro zakládání klonových archivů (směs klonů), semenných sadů, pro studium genetické variability, k reintrodukci 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 meristemická pletiva zimních pupenů) je minimální a rodičovský strom se 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 ovlivňuje úspěšnost organogeneze i takové faktory, jako je stáří a fyziologický stav dárcevodského 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. Pěstováním jeřábu břeku se zabývají intenzivně zejména v Německu, kde výsadba břekových plantáží by mohla nahradit v budoucnosti potřebu tropického dřeva. V České republice byla metoda *in vitro* využita při reprodukci ohrožených a cenných populací jeřábu břeku pro založení archivu explantátů a zavedení poloprovozní metody mikropropagace tohoto druhu. Byly vypracovány standardní postupy pro dopěstování kompletních rostlin a získání reprodukčního materiálu, který je využitelný pro další šlechtitelské záměry a reintrodukci (MALÁ et al. 1999).

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 extirpané vzrostlé



Obr. 1: Vícevrcholová kultura jeřábu břeku/Multiapex culture of wild service tree

vrcholy jsou umístěny na indukční agarové živné médium (50 ml média v Erlenmeyerově 100ml baňce). K indukci organogeneze u jeřábu břeku 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* jeřábu břeku pěstovány na multiplikačním médiu MS s koncentrací BAP 0,2 mg.l⁻¹, IBA 0,1 mg.l⁻¹, glutaminu 100 mg.l⁻¹, glycinu 2 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 μmol.m⁻².s⁻¹, 16hodinová světelná fotoperioda) a 100% relativní vzdušná vlhkost. Průběžně



Obr. 2: Výpěstky *in vitro* jeřábu břeku na venkovním záhonu v lesní školce Baně/Wild service tree plantlets in the outside beds of forest nursery Baně

Tab. 1: Růstové charakteristiky výpěstků in vitro jeřábu břeku po výsadbě na venkovní záhony lesní školka Baně/
Growth characteristics of wild service tree plantlets after planting in the outside beds of nursery Baně

Datum/ Date	Po et (ks)/ Number (pieces)	Mortalita/ Mortality (%)	Pr m rná výška/ Average height (cm)	±SD (cm)	Pr m rny p ir st/ Average increment (cm)	±SD (cm)	Tlouš ka ko enového kr ku/Thickness of root collar (cm)	±SD (cm)
27. 6. 98	110		15,1	5,0			0,52	0,23
26. 10. 99	105	4,5	95,7	39,3	80,6	27,5	1,0	0,27

Note: SD – standard deviation

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.

c. Zakořeňování a aklimatizace

Vícevrcholové kultury určené pro odběr mikrořízků za účelem dopěstování kompletních rostlin se standardně přesazují na MS médium s koncentrací MeoBAPr 0,125 mg.l⁻¹, IBA 0,1 mg.l⁻¹, glutaminu 100 mg.l⁻¹, glycinu 2 mg.l⁻¹, sacharózy 30 g.l⁻¹, agaru 6 g.l⁻¹, pH je upravováno na hodnotu 5,8. Po dvou pasážích jsou z kultur odebrány mikrořízky, které zakořeňují v agarovém médiu MS o třetinové koncentraci makro a mikroelementů bez cytokininů a s obsahem NAA 14 mg.l⁻¹, sacharózy 10 g.l⁻¹ a agaru 6 g.l⁻¹. Zakořeňování probíhá za stejných kultivačních podmínek jako multiplikace. Pro zvýšení účinnosti zakořeňování probíhá první fáze rhizogeneze (7 dní) ve tmě. První kořeny se objevují v závislosti na klonu v průběhu 4 – 6 týdnů.

Rostliny s vyvinutými 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 podmínkách (teplota 24 °C, osvětlení o intenzitě 30 μmol.m⁻².s⁻¹, 24hodinová světelná fotoperioda) a při 90% relativní vzdušné vlhkosti.

Po třech týdnech v agropérlitu se rostliny přesazují do sadbovačů Quick Pot T 60 (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, s. r. o.) v poměru 2 : 1 : 1 a přenášejí se do skleníku,

Tab. 2: Růstové charakteristiky výpěstků *in vitro* jeřábu břeku na demonstrační ploše Polná/Growth characteristics of wild service tree plantlets on demonstration plot Polná

Rok/ Year	Vysazeno/p eživá/ Planted/survived (ks/pieces)		Mortalita/ Mortality (%)	Pr m rná výška/ Average height (cm)	±SD (cm)	Tlouš ka ko en. kr ku/ Thickness of root collar (cm)	±SD (cm)
2000	102	101	0,01	99,7	41,2	1,2	0,4
2001		100	0,01	131,3	49,1	1,7	0,5
2002		97	4,90	165,9	47,4	-	-
2003		97	0,00	196,9	47,6	-	-
2004		96	1,03	242,2	51,1	-	-
2005		95	1,04	264,4	66,6	-	-
2007		89	6,32	328,5	77,1	-	-
2008		89	0,00	356,6	81,3	-	-

Note: SD – standard deviation

kde se postupně adaptují (3 – 4 týdny) na 70% relativní vzdušnou vlhkost. Pro růst v agropelitu 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, Změna Z1.

Vysvětlivky: BAP – 6-benzylaminopurine; MeoBAPr – 6 - (3-methoxybenzylamino) purine-9- β-D- ribofuranoside; MS - Murashige Skoog medium; IBA – β - indolylbutyric acid; NAA – α - naphtylacetic acid

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* jeřábu břeku vysadit na stanoviště.

e. Hodnocení růstu výpěstků *in vitro*

Růstové charakteristiky výpěstků byly porovnávány s parametry uvedenými v ČSN 48 2115, Změna Z1. V tabulce 1 jsou uvedeny parametry výpěstků *in vitro* vysázených na dopěstování na venkovním záhonu. Po roce pěstování dosahují výpěstky jeřábu břeku charakteru poloodrostků. Další růst výpěstků na stanovišti je dokumentován na demonstračním objektu Polná (PLO 16, Lesní družstvo Polná, Českomoravská vrchovina). 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 desetiletého hodnocení sazenic prokazují, že mikropropagované rostliny nevykazují retardace růstu. Růstové charakteristiky (přírůst, tloušťka kořenového krčku) jsou uvedeny v tabulce 2.



Obr. 3: Výpěstky *in vitro* jeřábu břeku na demonstrační ploše Polná/
Wild service tree plantlets in demonstration plot Polná

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost mikropropagačních postupů spočívá ve využití metody indukce organogeneze *in vitro* pro reprodukci explantátů odebíraných z dospělých stromů jeřábu břeku, v originálním využití nového derivátu cytokininu a v originálním řešení zakořeňování a aklimatizace.

Organogeneze se ukázala prozatím jako nejúspěšnější mikropropagační metoda pro listnaté dřeviny. Jednou z hlavních příčin, která brání širšímu využití mikropropagačních technik u mnoha dřevin, je problém se zakořeňovací fází (MALÁ et al. 2005). Při mikropropagaci rostlin se nejčastěji používá cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP), u některých rostlinných druhů včetně jeřábu břeku byla však po jeho použití pozorována inhibice růstu kořenů nebo jejich nerovnoměrný růst (WERBROUCK et al. 1995, 1996). Uvedený postup byl proto inovován využitím nového cytokininu MeoBAPr (6 - (3-methoxybenzylamino) purine-9-β-D-ribofuranoside), který urychluje zakořeňování mikrořízků.

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-benzylaminopurine (BAP), meta- a orthotopolin 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 a MeoBAPr na multiplikaci explantátů a na následné zakořeňování mikrořízků jeřábu břeku byl vypracován protokol, který zvyšuje schopnost zakořeňování jeřábu břeku ve srovnání s obecně používaným cytokininem BAP. Originalita řešení mikropropagace spočívá ve využití nového derivátu cytokininu MeoBAPru. Při použití tohoto cytokininu nevznikají glykosidy, které mají inhibiční vliv na indukci adventivních kořenů (MALÁ et al. 2009).

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Nakládání se sadebním materiálem vypěstovaným metodami *in vitro* v lesnické praxi podléhá legislativním opatřením platným pro vegetativně množný 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, 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 množného sadebního materiálu podmíněno dodržением konkrétních podmínek, mimo jiné dostatečným počtem klonů, podílem 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.

LITERATURA

Seznam použité související literatury

- DEMASURE B., LEGUERROUÉ B., LUCCHI G., PRAT D., PETIT R. J. 2000. Genetic variability of a scattered temperate forest tree: *Sorbus torminalis* L. (CRANTZ). Ann. For. Sci., 57: 63-71.
- FÉR F. 1994. Lesnická dendrologie. 2. část. Listnaté stromy. Praha, VŠZ – lesnická fakulta a Písek, Matice lesnická: 162 s.
- HEJNÝ S., SLAVÍK B. 1992. Květena České republiky. Praha, Academia.
- LETHAM D. S., PALNI L. M. S. 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Ann. Rev. Plant Physiol., 34: 163-197.
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., KARÁDY M., NOVÁK O., STRNAD M., DOLEŽAL K. 2009. Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ): the regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. Journal of Plant Growth Regulation, v tisku.
- 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: 291-297.

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., 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: 219–274.

MICROPROPAGATION OF WILD SERVICE TREE (*SORBUS TORMINALIS* (L.) CRANTZ)

Summary

The wild service tree (*Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ) is one of a scarce species among forest trees occurring in scattered populations at low density in Central Europe. For long-term sustainability of wild service tree genetic resources, micropropagation technologies could prove to be useful. Micropropagation represents the effective and economically advantageous technology enabling the reproduction of wild services tree planting material acquired from selected elite parents as well as preservation of gene resources in the explant bank for further use. The organogenesis is regarded as the most advantageous technology that showed to be suitable for clonal propagation of particularly broadleaved trees.

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 wild service tree organogenesis. After 4 - 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, 100 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. The cultures were transferred every 4 - 5 weeks. 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.

The cultures set up for rooting were transferred on MS medium with concentration of phytohormone MeoBAPr 0.125 mg.l⁻¹ and IBA 0.1 mg.l⁻¹, 100 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.

Microcuttings after 2 passages in agar medium with MeoBAPr were rooted in agar medium with one-third strength MS enriched with 14 mg.l⁻¹ of NAA, 10 g.l⁻¹ of saccharose and 6 g.l⁻¹ of agar. They were cultured first for 7 days in the darkness for accelerating of root growth and then were transferred onto hormone-free medium (one-third strength MS) and exposed to light. Plants with well-developed roots were transferred from rooting medium into pots (Quick Pot T 35) with agropelrit and watered by basal MS medium without phytohormones and saccharose diluted by distilled water 1 : 10.

Acclimatization proceeded under 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 the glasshouse, where they were adapted for 3 – 4 weeks to the 70% of relative air humidity. Acclimatized plants were planted onto outdoor beds. Optimal time for outdoor culturing plants of wild services tree before outplanting on the forest stands was 1 year.

Disposal of planting material from *in vitro* cultivation in forest breeding practice is under legislature for vegetative propagated plant material.

Described micropropagation technology was attested in pilot plant conditions in Biotechnology laboratory Olešná of Jihočeské lesy, joint-stock company.

LESNICKÝ

PR VODCE

