

INDUKCE ORGANOGENEZE A MULTIPLIKACE KORKOVNÍKU AMURSKÉHO (*PHELLODENDRON AMURENSE* RUPR.) V *IN VITRO* PODMÍNKÁCH

INDUCTION AND MULTIPLICATION OF AMUR CORK TREE (*PHELLODENDRON AMURENSE* RUPR.) BY *IN VITRO* ORGANOGENESIS

MARTINA KOMÁRKOVÁ ✉ - JIŘÍ ČÁP - PAVLÍNA MÁCHOVÁ

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., Strnady 136, Jíloviště, 25202, Czech Republic

✉ e-mail: komarkova@vulhm.cz

ABSTRACT

Amur cork tree (*Phellodendron amurense* Rupr.) is known for its anti-inflammatory, antipyretic, cholagogue, and antibacterial properties, and it is also a potential source of industrial cork. Shoot organogenesis and subsequent plant multiplication of Amur cork tree were established from mature seeds of trees growing on research plots in the Czech Republic. Germination percentage was increased by mechanical disruption of the seed coat, the highest number of germinated plants was achieved within 8–10 weeks of culture on MS medium containing 2 mg.l⁻¹ BAP and 0,2 mg.l⁻¹ NAA. Within 4 weeks of transfer to the multiplication medium containing 2 mg.l⁻¹ BAP and 0,2 mg.l⁻¹ NAA, chlorosis and reduced growth were observed in all cultured microcuttings. Lowering the BAP concentration to 0,4 mg.l⁻¹ led to a resumption of growth, the newly emerging shoots and leaves were vital and the multiplication rate was around 90%. Our developed plant regeneration method may be useful in future studies on *ex vitro* establishment of *in vitro* derived plants.

For more information see Summary at the end of the article.

Klíčová slova: aktivace semene; korkovník amurský; *in vitro* multiplikace; živné médium

Key words: seed activation; cork tree; *in vitro* multiplication; plant growth medium

ÚVOD

Korkovník amurský (*Phellodendron amurense* Rupr.) je listnatý opadavý strom, patří do čeledi Rutaceae. Rostoucí jako solitér může dosahovat výšky až 15 m, v zápoji pak dokonce 28 m a dožívat se až 300 let. Průměr kmene dosahuje přes 1 m, korková vrstva je silná až 6 cm. Rozšíření druhu zahrnuje území Dálného východu (Rusko, Chabarovsko, Primorsko, Amurská oblast), severovýchodní Číny, Japonska a Koreje. V České republice (ČR) se korkovník vyskytuje od roku 1911 (POLANSKÝ 1934). V průběhu 50. let 20. stol. byly na našem území založeny výzkumné plochy s prvotním účelem zjistit možnost náhrady korkové suroviny za korek dovážený především ze Španělska a jeho další využití v lesnictví a dřevozpracujícím průmyslu. Ve východní části USA je korkovník považován za invazní druh, v ČR však zatím nejsou poznatky, které by ukazovaly na volné šíření korkovníku v krajině a eventuální vytlačování domácích dřevin.

Korkovník patří mezi tradiční čínské léčivé rostliny, a to díky produkci mnoha biologicky aktivních flavonoidů, využívaných pro výrobu léků potlačujících záněty, horečku a bakteriální infekce (IKUTA et al. 1998). Význam korkovníku tkví také v těžbě korku, podle kterého získala dřevina svůj název. V současnosti jsou bohužel rozsáhlé porosty korkovníku, zejména v Číně, značně ohroženy právě kvůli jeho nadměrné těžbě a využití ve farmaceutickém a nábytkářském průmyslu.

Ačkoliv se v literatuře uvádí, že korkovník patří mezi dvoudomé dřeviny, v nedávné době byl v Číně popsán také jednodomý jedinec, na základě čehož bylo zjištěno, že vývoj pohlaví u korkovníku je určen epigeneticky, pravděpodobně pomocí DNA metylace (HE et al. 2023). Korkovník se dobře množí semeny, jejichž klíčivost je v průměru 31 %, u nestratifikovaných semen je však až o polovinu nižší. Semena korkovníku mají tvrdé osetí, které propouští vodu, ale mechanicky brání klíčení. CHIEN et al. (2006) testovali různé způsoby ovlivnění

dormance a klíčivosti semen, zahrnující prudké změny teplot, chladovou stratifikaci či aplikaci kyseliny gibberelové. Jako nejvhodnější způsob překonání dormance autoři navrhli mechanické narušení osemení či inkubaci semen v tekutém dusíku, který vyvolal vznik prasklin v osemeni.

Metoda vegetativního množení korkovníku zahrnuje klasický postup množení kořenovými řízků, využitelná je však také metoda *in vitro* mikropropagace. Pomocí metody mikropropagace lze získat klonový materiál z jednotlivých stromů či materiál rostoucí ze zralých semen, hojně využívané je také rychlé a efektivní namnožení sadebního materiálu. V současné době je vypracováno velké množství postupů mikropropagace pro různé lesní dřeviny, přesto však musí být ke každému klonu, i v rámci druhu, přistupováno zvlášť a růstové podmínky musí být vždy přizpůsobeny požadavkům dané dřeviny. Pro správný růst rostlinných explantátů je důležité zvolit vhodné živné médium s přídatkem adekvátních rostlinných hormonů, zajistit dostatečný osvit a vhodnou kultivační teplotu. Mezi další významné faktory ovlivňující úspěšnost mikropropagace patří také fyziologické stáří množného jedince, doba odběru rostlinného materiálu, sterilizace vstupního rostlinného materiálu či způsob jeho pěstování na živném médiu. Namnožené jedince lze následně pomocí změny poměru fytohormonů v živném médiu zakořenit a dovést v *ex vitro* podmínkách do výsadby schopného stavu. Množením korkovníku v *in vitro* podmínkách se zabývají především čínští autoři, kteří se snaží touto cestou namnožit a zachránit zbytkové populace korkovníku v asijských zemích. Převod rostlin do *in vitro* podmínek byl testován jak pomocí somatické embryogeneze (AZAD et al. 2009), tak přímou organogenezi ze semen (YANG et al. 2011), stonků (WANG et al. 2011) či listů (AZAD et al. 2005). Zmínění čínští autoři uvádí jako nejvhodnější fytohormon pro indukci organogeneze thidiazuron (TDZ, 1 mg.l⁻¹), pro růst výhonů pak doporučují poměrně vysoké koncentrace BAP (0,5 mg.l⁻¹, či dokonce 2,2 mg.l⁻¹) (WANG et al. 2011; YANG et al. 2011). Jakožto vhodný auxin shodně navrhuji α -Naphthaleneacetic Acid (NAA). Z dlouholetých zkušeností s *in vitro* pěstováním lesních dřevin jsme se rozhodli otestovat publikované koncentrace fytohormonů, a zároveň použít taková množství, která vyhovují běžným lesním dřevinám rostoucím v ČR.

Cílem naší práce bylo najít a popsat nejvhodnější způsoby *in vitro* organogeneze korkovníku amurského ze semen, s důrazem na fázi indukce a multiplikace. Vyhodnocen byl způsob aktivace semene ke klíčení a vhodný poměr rostlinných hormonů použitý pro konkrétní fázi organogeneze.

MATERIÁL A METODIKA

Sběr rostlinného materiálu (plody se semeny) probíhal na vybraných výzkumných plochách Mydlovarský luh, Mochov a Písty, kde s ohledem na výšku některých plodících jedinců bylo nutné použít teleskopické nůžky. Přesto, že se jednalo o odběr pro prvotní testování možnosti pěstování *in vitro*, bylo již přihlédnuto k morfologii rodičovských stromů, zejména k tvárnosti kmene.

Plody v podobě černé bobule byly rozříznuty skalpelem, v každém plodu se nacházelo v průměru 5 semen. Uvolněná semena byla přes noc inkubována ve sterilní destilované vodě s přídatkem 0,05% PPM (Plant Preservative Mixture) při 4 °C.

Sterilizace semen byla zahájena počáteční fází, zahrnující 30 min promytí pod tekoucí vodou, 15 min promytí jarovou vodou, 15 min promytí roztokem Mucosol[®] (1% roztok, Brand GmbH + CO) a 15 min promytí sterilní destilovanou vodou. Následující fáze již probíhaly za sterilních podmínek v laminárním boxu. Semena byla nechána 15 min v 1% roztoku NaClO (SAVO) a poté byla třikrát po sobě promyta po 15 min sterilní destilovanou vodou.

Část semen byla pro testování organogeneze ponechána bez dalších úprav, u druhé části semen bylo pomocí skalpelu naříznuto osemení. Takto připravený rostlinný materiál byl následně zasazen na indukční živné médium (50 ml média ve skleničce). K indukci organogeneze bylo použito MS médium (MURASHIGE, SKOOG 1962) doplněné o 30 g.l⁻¹ sacharózy, 7 g.l⁻¹ agaru, 200 mg.l⁻¹ hydrolyzátu kaseinu, 200 mg.l⁻¹ glutaminu, pH bylo upraveno na 5,8. Testovány byly koncentrace 0, 1 a 2 mg.l⁻¹ fytohormonu BAP (6-benzylaminopurin) s 0,2 mg.l⁻¹ NAA. Každá varianta byla testována na celkovém souboru 40 semen, z čehož bylo 10 semen bez mechanického narušení a 30 semen bylo aktivovaných mechanickým narušením skalpelem. Kultivace probíhala v klimatizovaných podmínkách při teplotě 21 °C, 16hodinové světelné fotoperiodě, s osvětlením o intenzitě 30 μ mol.m⁻².s⁻¹. Vyklíčení semen trvalo přibližně 8–10 týdnů.

Po úspěšném založení primárních kultur byly vyklíčené rostliny zasazeny na multiplikační médium, které slouží k namnožení výhonů. Složení multiplikačního média bylo opět testováno, a to především s ohledem na koncentraci a poměr rostlinných hormonů (2; 1; 0,8 a 0,4 mg.l⁻¹ BAP; 0,2 mg.l⁻¹ NAA). Interval mezi pasážemi se pohyboval v rozmezí 4–6 týdnů. Kultivační podmínky byly stejné, jako při zakládání primárních kultur. Po 40 dnech pěstování na multiplikačním médiu byla zhodnocena vitalita rostlin, přítomnost chlorózu a multiplikační rychlost (procento rostlin s dvěma či více novými výhony).

Vyhodnocení multiplikační rychlosti explantátů bylo provedeno ve třech biologických opakováních s použitím Tukeyho testu (Minitab) k vyhodnocení významnosti ($P < 0,05$) rozdílů mezi zvolenými koncentracemi BAP (2; 1; 0,8 a 0,4 mg.l⁻¹ BAP).

VÝSLEDKY

Sterilizační metoda semen korkovníku zahrnovala použití slabého roztoku NaClO, což vedlo ke 100% úspěšnosti sterilizace, po dobu testování klíčivosti semen se neobjevila žádná houbová ani bakteriální kontaminace.

Klíčivost semen byla testována na třech druzích živných médií s rozdílnými koncentracemi fytohormonů (tab. 1). Bez mechanického narušení osemení nedošlo ani po 12 týdnech inkubace k aktivaci a prorůstání semene. U semen aktivovaných mechanickým narušením bylo jako nejvhodnější indukční médium zvoleno MSI3 s 40% klíčivostí, obsahující nejvyšší koncentraci cytokininů. Naopak na médiu bez přídatku fytohormonů byla úspěšnost klíčení minimální (6,7%).

Zhruba u 10 % všech testovaných semen došlo k vyklíčení, mimo děložní listy však rostlina dále nerostla (obr. 1) a po několika týdnech uhynula.

Úspěšně vyklíčené rostliny korkovníku byly následně přesazeny na multiplikační médium, se složením uvedeným v tabulce 2. Jako nevhodné se ukázalo multiplikační médium MSM4 s nejvyšší koncentrací cytokininů, na němž sice rostliny tvořily postranní výhony a množily se (multiplikační rychlost 60%), ale byly chlorotické, křehké a neprosplávaly (obr. 2 A). Po přesazení na MSM3 byl u rostlin během měsíce znát vitální růst, chlorózy se vyskytovaly jen na starších listech, nově narostlé vrcholové části výhonu již stopy chlorózu nevykazovaly (obr. 2 B). Na médiu MSM3 se rostliny velmi dobře množily (multiplikační rychlost 95 %) a tvořily v průměru kolem pěti nových výhonů.

Kvalitních růstových parametrů bylo dosaženo také při použití média MSM2 a MSM1 s nejnižší koncentrací cytokininu. Po 3 měsících na médiu s BAP 0,4 mg.l⁻¹ si rostliny zachovaly vitální růst, byly zelené, prospívaly a odnožovaly v průměru 4 výhony za pasáž (obr. 3).

Tab. 1.

Složení indukčních médií pro růst semen korkovníku amurského; počet vyklíčených semen a klíčivost (%) je spočítána pro semena aktivovaná mechanickým narušením jejich osemení

Composition of induction growth media of Amur cork seeds; the number of germinated seeds and germination percentage is calculated for the seeds with the mechanical removal of their seed coat

Typ média/ Medium type	BAP (mg.l ⁻¹)	NAA (mg.l ⁻¹)	Počet vyklíčených semen/ Number of germinated seeds	Klíčivost/ Germination (%)
MSI1	0	0	2/30	6,7
MSI2	1	0,2	8/30	26,7
MSI3	2	0,2	12/30	40

**Obr. 1.**

Zastavení růstu u vyklíčeného semene s děložními listy (foto: M. Komárková)

Fig. 1.

Growth arrest in germinated cotyledoned seed (photo: M. Komárková)

Tab. 2.

Složení testovaných živných multiplikačních médií pro namnožení rostlin korkovníku amurského; výskyt chlorózy (+ ano, - ne); multiplikační rychlost (procento explantátů se dvěma či více novými výhony). Data uvádí průměry ± SD (n = 10), 30 rostlin pro každou variantu. Hodnoty následované stejným písmenem (písmeny) ve stejném sloupci se podle Tukeyova testu významně neliší (P < 0,05)

Composition of multiplication growth media of Amur cork; occurrence of chlorosis (+ yes, - no); multiplication rate (percentage of explants with two or more new shoots). Data given as means ± SD (n = 10), 30 plants per treatment. Values followed by the same letter(s) within the same column are not significantly different according to Tukey's test (P < 0.05)

Typ média/ Medium type	BAP (mg.l ⁻¹)	NAA (mg.l ⁻¹)	Chloróza/ Chlorosis	Multiplikační rychlost/ Multiplication rate (%)
MSM1	0,4	0,2	-	90,0±1,7 ^a
MSM2	0,8	0,2	-	93,3±0,6 ^a
MSM3	1	0,2	-	93,3±1,2 ^a
MSM4	2	0,2	+	57,0±0,6 ^b

**Obr. 2.**

Zlepšení vitality explantátů korkovníku amurského po přesazení na MS médium s nižší koncentrací BAP (A – BAP 2 mg.l⁻¹, B – BAP 1 mg.l⁻¹) (foto: M. Komárková)

Fig. 2.

Improvement of vitality of Amur cork tree explants after transplanting to MS medium with lower BAP concentration (A – BAP 2 mg.l⁻¹, B – BAP 1 mg.l⁻¹) (photo: M. Komárková)

DISKUSE

Sterilizace semen určených pro *in vitro* pěstování probíhala pomocí slabého roztoku chlornanu sodného (1% SAVO), což je v případě semen zcela dostačující sterilizační postup. Mezi další běžně používané sterilizační metody patří například použití ethanolu (EtOH) či chloridu rtuťnatého (HgCl_2), tyto roztoky však především při vyšších koncentracích negativně ovlivňují růstové parametry klíčící rostliny (BARAMPURAM et al. 2014).

Jak uvádí CHIEN et al. (2006), klíčení semen korkovníku je podmíněné chladovou stratifikací, změnami teplot či mechanickým narušením jejich osemení. Počáteční experiment s klíčením semen na živném médiu potvrdil, že aby došlo ke klíčení, musí být osemení nejprve mechanicky narušeno skalpelem, neboť bez tohoto zásahu nedošlo ani po 12 týdnech k aktivaci semene. Klíčivost semen korkovníku byla nejvyšší při růstu na médiu MSI3 (40% klíčivost) s vysokou koncentrací cytokininů. Právě cytokininy, spolu s gibereliny, pozitivně ovlivňují klíčení semen a překonání dormance (MIRANSARI, SMITH 2014). Jako nejvhodnější multiplikační médium se osvědčilo MSM1 a MSM2 s nižšími koncentracemi cytokininů (BAP $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$, respektive $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$). Potvrdila se nám tak domněnka, že korkovník rostoucí v *in vitro* podmínkách nevyžaduje vysoké koncentrace cytokininů, jak uvádí někteří čínští autoři, např. WANG et al. (2011). Při zvýšeném množství cytokininu BAP v živném médiu byly rostliny chlorotické a velmi křehké. Negativní vliv vysoké koncentrace BAP na růst rostlin a vznik chlorózu byl popsán také u maliníku (*Rubus idaeus*) (MURVANIDZE et al. 2022). Pravděpodobnou příčinou tohoto jevu je negativní působení cytokininů na aktivitu transkripčních faktorů (TF) regulujících množství železa v organismu. Jak

popisují HINDT, GUERINOT (2012), cytokininy dokáží inhibovat TF FRO2 a IRT1, které mají zásadní vliv na příjem a rovnováhu železa v rostlině. Výsledný nedostatek železa pak vede k narušení fotosyntézy či k nemožnosti tvorby ferredoxinu a chlorofylu. Ačkoliv rostly explantáty korkovníku stejně dobře na médiu MSM1 jako na MSM2, doporučujeme pro dlouhodobé pěstování použití média MSM1 s nejnižší koncentrací BAP. Důvodem je potenciální negativní vliv dlouhodobého působení vyšších koncentrací BAP na schopnost rhizogeneze, jak bylo ukázáno například u jeřábu břeku (MALÁ et al. 2009), u tropického *Pterocarpus marsupium* Roxb. (AHMAD, ANIS 2019) či u podnoží kulturních druhů švestek (GENTILE et al. 2014).

ZÁVĚR

Sterilizace semen byla 100% úspěšná s použitím slabého roztoku chlornanu sodného. Pro aktivaci semene bylo nutné mechanické narušení jeho osemení, ke klíčení došlo za 8–10 týdnů. Jako nejvhodnější indukční médium pro růst klíčících rostlin bylo MS médium s přídavkem 2 mg.l^{-1} BAP, na kterém dosahovala klíčivost 40 %. Pro multiplikaci explantátů doporučujeme použít MS médium s nižší koncentrací cytokininu ($0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP), dostačující pro rychlé množení výhonů a zajišťující kvalitní růstové parametry.

Poděkování:

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE – RO0123.



Obr. 3.

Explantáty korkovníku amurského po 3 měsících na MS médiu s $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP (foto M. Komárková)

Fig. 3.

Amur cork tree explants after 3 months on MS medium with 0.4 mg.l^{-1} BAP (photo: M. Komárková)

LITERATURA

- AHMAD A., ANIS M. 2019. Meta-topolin improves *in vitro* morphogenesis, rhizogenesis and biochemical analysis in *Pterocarpus marsupium* Roxb.: A potential drug-yielding tree. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38: 1007–1016. DOI: 10.1007/s00344-018-09910-9
- AZAD M.A.K., YOKOTA S., OHKUBO T., ANDOH Y., YAHARA S., YOSHIZAWA N. 2005. In vitro regeneration of the medicinal woody plant *Phellodendron amurense* Rupr. through excised leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80: 43–50. DOI: 10.1007/s11240-004-8809-5
- AZAD M.A.K., YOKOTA S., BEGUM F., YOSHIZAWA N. 2009. Plant regeneration through somatic embryogenesis of a medicinal plant, *Phellodendron amurense* Rupr. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*, 45: 441–449. DOI: 10.1007/s11627-008-9171-9
- BARAMPURAM S., ALLEN G., KRASNYANSKI S. 2014. Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118: 179–185. DOI: 10.1007/s11240-014-0472-x
- GENTILE A., JÁQUEZ GUTIÉRREZ M., MARTINEZ J., FRATTARELLI A., NOTA P., CABONI E. 2014. Effect of meta-topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118: 373–381. DOI: 10.1007/s11240-014-0489-1
- HE L., FAN Y., ZHANG Z., WEI X., YU J. 2023. Identifying genes associated with female flower development of *Phellodendron amurense* Rupr. using a transcriptomics approach. *Genes*, 14: 661. DOI: 10.3390/genes14030661
- HINDT M.N., GUERINOT M.L. 2012. Getting a sense for signals: Regulation of the plant iron deficiency response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 1823: 1521–1530. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.010
- CHIEN C.T., CHEN S.Y., CHANG S.H., CHUNG J. D. 2006. Dormancy and germination in seeds of the medicinal Asian tree species *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* (Rutaceae). *Seed Science and Technology*, 34: 561–571. DOI: 10.15258/sst.2006.34.3.03
- IKUTA A., NAKAMURA T., URABE H. 1998. Indolopyridoquinazoline, furoquinoline and canthinone type alkaloids from *Phellodendron amurense* callus tissues. *Phytochemistry*, 48: 285–291. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)01130-8
- MALÁ J., MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., KARADY M., NOVÁK O., MIKULÍK J., HAUSEROVÁ E., GREPLOVÁ J., 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*, 28: 341–348. DOI: 10.1007/s00344-009-9099-2
- MIRANSARI M., SMITH D. L. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 110–121. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.005
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15: 473–497.
- MURVANIDZE N., AMEYE M., GEELLEN D., WERBROUCK S.P.O. 2022. A calmodulin antagonist protects in vitro raspberries against disturbed photosynthesis caused by constant light and cytokinin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 148: 73–80. DOI: 10.1007/s11240-021-02165-5
- POLANSKÝ B. 1934. Lesnické pěstování dřevin cizokrajných se zřetelem na poměry v ČSR. 1.–2. díl. Praha, Ministerstvo zemědělství republiky Československé: 148 s., 150 s. (2 sv.)
- WANG H.M., CHEN Y.J., YU H.D., ZU Y.G. 2011. Adventitious shoot regeneration from in vitro stem explants of *Phellodendron amurense*. *African Journal of Biotechnology* 10, 14024–14028. DOI: 10.5897/AJB11.1569.
- YANG J., ZHOU C., ZHAO B., JIN C., ZHANG T., LI C. 2011. Rapid direct adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from mature seed explants of *Phellodendron amurense* Rupr. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5 (18): 4560–4565.

INDUCTION AND MULTIPLICATION OF AMUR CORK TREE (*PHELLODENDRON AMURENSE* RUPR.) BY *IN VITRO* ORGANOGENESIS

SUMMARY

Phellodendron amurense Rupr. (Amur cork tree) is a deciduous tree belonging to the Rutaceae family, distributed in the Far East (Russia, Khabarovsk, Primorsko, Amur region), China, Japan and Korea. In the Czech Republic, the occurrence of cork tree has been observed since 1911 (POLANSKÝ 1934). *P. amurense* is commonly used as an anti-inflammatory, antipyretic, cholagogue, and antibacterial medicine, and it is also a potential source of industrial cork. Because of its value of medicine and timber, *P. amurense* is considered to be an endangered species. Cork seeds have the water-permeable coat, which plays a mechanical role in preventing radicle protrusion into intact seeds. CHIEN et al. (2006) tested different methods of increasing seed dormancy and germination, including temperature changes, cold stratification or application of gibberellic acid. As the most appropriate way to overcome dormancy, the authors suggested mechanical disruption of seed coat or incubation of seeds in liquid nitrogen, which caused cracks in the seed coat. Although this tree is conventionally propagated by seeds, the germination rate is quite low. *In vitro* micropropagation can solve these problems by producing large quantities of uniform plants from select plant species. Currently, a large number of micropropagation procedures has been developed for various forest tree species, however, each species must be approached separately and the growth conditions must always be adapted to the requirements of the given tree species. The purpose of our study was to find the most suitable methods of *in vitro* organogenesis of the *P. amurense* from seeds, with an emphasis on the phase of induction and multiplication.

The seeds were stirred in a weak NaClO solution, resulting in 100% sterilization success. Seed germination was tested on three types of nutrient media with different concentrations of phytohormones (Tab. 1). Even after 12 weeks of incubation, there was no germination of the seed without mechanical disturbance of the seed coat. For seeds activated by mechanical scarification, MSI3 with the highest concentration of cytokinins was chosen as the most suitable induction medium (germination percentage 40%). On the contrary, on the medium without the addition of phytohormones, the success rate of germination was minimal (6.7%). Approximately 10% of all tested seeds germinated, but the plant did not grow beyond the cotyledons (Fig. 1) and died after a few weeks. Successfully germinated plants were subsequently transplanted on the multiplication medium with the composition shown in Table 2. The multiplication medium MSM4 with the highest concentration of cytokinins caused chlorosis and poor growth (Fig. 3, plant on the left). After transplanting to MSM3, the plants showed vital growth, the newly grown apical parts demonstrated no chlorosis (Fig. 3, plant in the middle). On the MSM3 medium, the plants multiplied very well (multiplication rate 95%) and formed about five new shoots on average. However, for cork tree multiplication we recommend the use of MSM2 or MSM1 media with the lowest cytokinin concentration (Fig. 4), because of negative effect of high concentrations of BAP on rooting and iron metabolism.

Zasláno/Received: 22. 09. 2023

Přijato do tisku/Accepted: 19. 10. 2023