

Vegetativní množení rostlin s fenotypovým projevem břízy ojcovské (*Betula oycoviensis* Besser)

Certifikovaná metodika



Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

doc. Ing. Ivan Kuneš, Ph.D.

Ing. Marin Baláš, Ph.D.

Praha 2020

Vegetativní množení rostlin s fenotypovým projevem břízy ojcovské (*Betula oycoviensis* Besser)

Abstract

Ojcow birch (*Betula oycoviensis* Besser) is a rare Central European tree taxon, whose micro-populations are found only in several localities. To maintain the *B. oycoviensis* gene pool, this manual views potential for micropropagation and propagation by grafting. Plant material for vegetative propagation was collected in the Czech Republic. *In vitro* culture was established from axillary buds surfaces sterilized with 0.1% HgCl₂ and cultivated on woody plant (WP) medium supplemented with 1 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP). The shoots were rooted on half-strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.3 mg l⁻¹ concentrations of α-naphthylacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA). The rooted plants were transferred *ex vitro*. Grafting was carried out in spring using *Betula pendula* as rootstock. The winter scions with no shoots were placed on the rootstock at two heights on the side (side-veener graft) or on the top (top rind grafting). Those protocols for *in vitro* propagation and grafting can be employed for effective mass propagation of *B. oycoviensis*, although these processes show genotype-dependent responses.

Keywords: *Betula oycoviensis*; conservation; grafting, *in vitro* micropropagation; organogenesis, rooting

Oponenti:

Ing. Dušan Kacálek, Ph.D., Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti

Ing. Miroslav Válek, Ústav pro hospodářskou úpravu lesů

Adresa autorů:

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D., vitamvas@fld.czu.cz

doc. Ing. Ivan Kuneš, Ph.D., kunes@fld.czu.cz

Ing. Marin Baláš, Ph.D., balas@fld.czu.cz

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Kamýcká 129

165 00 Praha 6 – Suchdol

Obsah

| | |
|--|----|
| Obsah..... | 4 |
| 1 Cíl metodiky | 5 |
| 2 Vlastní popis metodiky..... | 5 |
| 2.1 Úvod..... | 5 |
| 2.2 Standardizovaný metodický postup mikropropagace..... | 7 |
| 2.2.1 Zakládání primárních kultur | 7 |
| 2.2.2 Kultivační podmínky multiplikace | 7 |
| 2.2.3 Zakořeňování a aklimatizace | 7 |
| 2.2.4 Výsadba na venkovní plochy | 8 |
| 2.3 Standardizovaný metodický postup roubování..... | 9 |
| 3 Srovnání novosti postupů | 9 |
| 4 Popis uplatnění metodiky | 10 |
| 5 Ekonomické aspekty | 11 |
| 6 Dedikace..... | 12 |
| 7 Seznam použité související literatury | 12 |
| 8 Seznam publikací, které předcházely metodice | 14 |
| 9 Summary | 14 |

1 Cíl metodiky

- Představit postupy vegetativní reprodukce jedinců s fenotypovým projevem břízy ojcovské, který bude umožňovat vytváření klonů pomocí *in vitro* mikropropagace a dále prostřednictvím roubování.
- Přispět k záchraně populace břízy ojcovské v jediné potvrzené lokalitě jejího výskytu v České republice.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvod

Bříza ojcovská (*Betula oycoviensis* Besser) je v Evropě vzácně se vyskytujícím taxonem, jehož ostrůvkovitý výskyt je uváděn v Polsku, na Ukrajině, v Rusku, Dánsku, Rumunsku, jižním Švédsku a České republice (Korczyk 1967, Krzaczek a Krzaczek 1968; Staszkiwicz a Wójcicki 1992; Staszkiwicz 2013, Buriánek et al. 2014, Baláš et al. 2016). U nás byl výskyt břízy ojcovské podle některých pramenů (www.pladias.org) zaznamenán na Křivoklátsku (byť odkaz na publikaci Kolbek et al. 2003 je v databázi Pladias chybný), Třeboňsku a dvou lokalitách v Krušných horách. Potvrzen byl ale přitom pouze na lokalitě v blízkosti Volyně u Výsluní v Krušných horách, kde je území výskytu tohoto taxonu kvůli ochraně břízy ojcovské vyhlášeno jako přírodní památka.

Právě přírodní památka *Lokalita břízy ojcovské u Volyně* byla zvolena pro odběr materiálu k množení. Přirozená obnova populace břízy ojcovské na území přírodní památky vážně a stav většiny stromů není dobrý. Jen nízké procento jedinců z potomstva břízy ojcovské nese fenotypový projev tohoto taxonu, který se považoval za hybridní druh (Kubát et al. 2002, Kříž 2003), nicméně novější taxonomická literatura jej považuje za jednotku nižší taxonomické úrovně (Kaplan et al. 2019), což je i z našeho pohledu blíže k realitě. I když taxonomické postavení populací a jedinců břízy ojcovské na území České republiky ani v Evropě není zatím vyjasněno, je důležité její současnou populaci u nás i jinde zachovat. Má to význam z pohledu potřeby udržet genetickou rozmanitost a rovněž dořešit taxonomické postavení této břízy uváděné v naší klíčové taxonomické literatuře (Kubát et al. 2002, Kříž 2003, Kaplan et al. 2019). Právě v takových případech, jako je snaha o udržení ohrožených populací, je na místě integrovat přístupy zachování *ex situ* (Pritchard et al. 2014).

Pro namnožení stávajících genových zdrojů břízy ojcovské lze využít možnosti vegetativní reprodukce roubováním, řízkováním a také *in vitro* mikropropagací.

Každá z uvedených metod má svá opodstatnění, zvláště s přihlédnutím k náročnosti provedení, zázemí pro pěstování a finanční aspekty.

Roubování je způsob rozmnožování náročnější na manuální zručnost. Snášlivost a schopnost srůstu roubu a podnože může být v rámci rodu velmi rozdílná. Nevýhodou u této techniky může být případná kompatibilita či nekompatibilita mnoha různých kombinací podnoží a roubu u široké škály druhů, rodů a čeledí (Nelson 1968). Andrews a Marquez (1993) uvádějí potenciální faktory, které mohou přispět k neslučitelnosti podnože a roubu: reakce na zranění, regulátory růstu a toxiny. Kromě nekompatibility štěpu a podnože může být selhání

srůstu také způsobeno anatomickým nesouladem, špatným zpracováním, podmínkami prostředí a nemocemi (Hartmann et al. 2002). Při zvládnutí techniky roubování, je možné dosáhnout dílčích úspěchů a při absenci *in vitro* laboratoře je to jedna z mála prověřených technik, která může přispět k zachování geneticky hodnotných jedinců této břízy. Omezením je nutnost mít k dispozici větší množství podnoží a roubů. Zejména při potřebě získat větší množství roubovanců je zásadním faktorem také pracnost a časová náročnost, a to vzhledem k nižší úspěšnosti ujmoutí roubů (dle našich zkušeností zpravidla kolem 30 % – Vítámvás et al. 2020). Řízkování jakožto dosti používaná metoda pro namnožení klonového materiálu se v případě záchrany starých stromů bříz nehodí, jelikož úspěšnost je nulová, a to jak z odběru jarních tak letních řízků (Vítamvas et al. 2020).

Mikropropagace, zvláště organogeneze, představuje vhodnou *in vitro* technologii pro zachování ohrožených genotypů břízy ojcovské, a to i pro rychlé namnožení klonového sadebního materiálu. Oproti klasickému řízkování se *in vitro* metody s výhodou používají zejména u starých jedinců, kdy pomocí vlivu látek v živném médiu lze lépe kontrolovat a stimulovat vytváření nových prýtů a kořenů (De Diego et al. 2010; Sota a Kongjika 2014). Dále se s výhodou dá *in vitro* metoda využít v případech, kdy je nutné získat klonový materiál z jednotlivých stromů, např. při nedostatečném množství biomasy pro odběr řízků a roubů anebo při úplném selhání vegetativní reprodukce roubováním nebo řízkováním.



Obr. 1. Bříza ojcovská na stanovišti Volyně u Výsluní (foto: M. Baláš)

Během posledních desetiletí byly vypracovány postupy mikropropagace u velké části hospodářských a okrasných dřevin. Ovšem i přes tyto publikované metodiky je nutné pro každého jedince nebo skupinu jedinců zajistit vhodné kultivační podmínky (živná média s přísadkami rostlinných regulátorů růstu, teplota, osvit), aby došlo k optimálnímu růstu. Pro úspěšnost organogeneze je nutné zahrnout i takové faktory, jako je fyziologické stáří

množeného jedince, doba odběru rostlinného materiálu, příprava a povrchová sterilizace explantátů a nasazení na živná média. Při využití *in vitro* postupů reprodukce břízy ojcovské lze vybrané jedince namnožit a převést do výsadby schopného stavu. Sadební materiál pak může sloužit k vnášení do lokalit přirozeného výskytu nebo k zakládání klonových archivů.

2.2 Standardizovaný metodický postup mikropropagace

2.2.1 Zakládání primárních kultur

Odebírání rostlinného materiálu (větvíček, roubů) pro založení kultury probíhá v únoru až březnu před vyrašením pupenů v množství cca 20–30 pupenů od jedince. Rouby s pupeny se vloží do označeného mikrotenového sáčku a při převozu se uloží v chladu (nachlazená taška, přenosná lednice, polystyrenová krabice). Do doby zpracování se pupeny uchovávají v chladničce při teplotě 3–5 °C, přičemž je doporučeno zpracovat odebraný materiál co nejdříve, nejdéle do jednoho týdne po odběru. Zkrácením uskladnění na nezbytné minimum se snižuje riziko zvýšené kontaminace a poškození rostlinného materiálu. Při zpracování pupenů se z jednotlivých pupenů odstraní vnější šupiny, nařežou se nodální segmenty o délce 2–3 cm s 1–2 pupeny a umístí se do 0,1% HgCl₂ na 6 minut a poté se třikrát promyjí sterilní destilovanou vodou. Ve sterilním prostředí laminárních boxů se vysterilizované nodální segmenty s pupeny umístí na indukční živné WP médium (Lloyd a McCown 1980) ve sklenicích (objem 230 ml s 30–35 ml živného média) zpevněné agarem 8 g.l⁻¹ (Danish Agar, Carl Roth), s koncentrací fytohormonu 6-benzylaminopurinu (BAP) 1 mg.l⁻¹, sacharózy 30 g.l⁻¹. Reakce média (pH) se upravuje na hodnotu 5,7–5,8 pomocí roztoku KOH nebo HCl. Médium se následně sterilizuje autoklávováním při teplotě 121 °C a tlaku 118 kPa po dobu 30 minut. Kultivace probíhá v klimatizovaných podmínkách při teplotě 24±1 °C, při režimu světlo/tma 16/8 hodin. Intenzita osvětlení odpovídá 35 μmol.m⁻².s⁻¹ (zářivky cool white, 36 W, Philips). Indukce růstu pupenů trvá přibližně 4–6 týdnů.

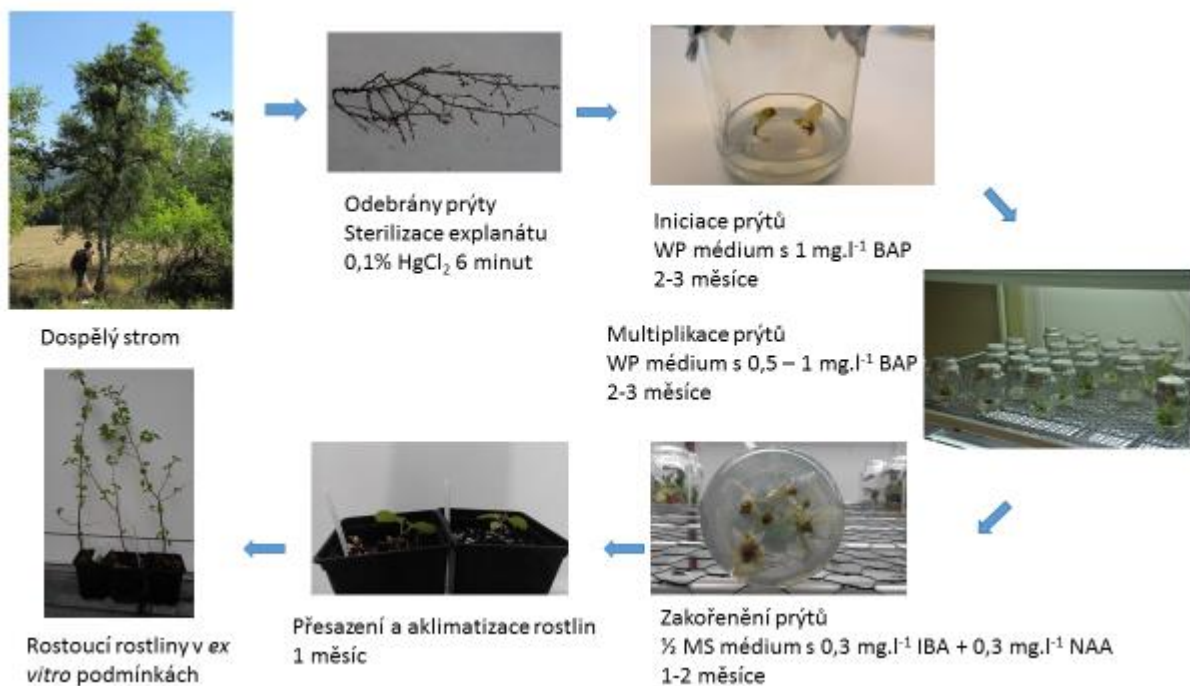
2.2.2 Kultivační podmínky multiplikace

Po vyrašení pupenů na nodálním segmentu (primárním explantátu) jsou explantáty přeneseny a pěstovány na multiplikačním WP médiu s koncentrací BAP 0,5 nebo 1,0 mg.l⁻¹, sacharózy 30 g.l⁻¹, agaru 8 g.l⁻¹ (Danish agar, Carl Roth), pH je upraveno na hodnotu 5,7–5,8 pomocí roztoku KOH nebo HCl. Médium se sterilizuje autoklávováním při 121 °C a 118 kPa po dobu 30 minut. Pasážování na čerstvá média je třeba provádět každé 4 týdny. Kultivace probíhá v podobných podmínkách jako při indukční fázi (teplota 24±1 °C, při světelném režimu 16/8hodin (světlo/tma) s osvětlením o intenzitě 35 μmol.m⁻².s⁻¹ (zářivky cool white, 36 W, Philips). Průběžně je nutné sledovat zdravotní stav kultur a výskyt kontaminací (nevhodně se vyvíjející kultury se odstraní).

2.2.3 Zakořeňování a aklimatizace

Nově vyrostlé prýty z fáze multiplikace se přenesou na zakořeňovací média, kde se vytvoří na bazální části prýtu kořeny. Vývoj kořenů probíhá na agarovém MS médiu (Murashige a Skoog 1962) s poloviční koncentrací makro a mikroelementů, s přísadkou auxinu 3-indolylmáslé kyseliny (IBA) 0,3 mg.l⁻¹ v kombinaci s kyselinou 1-naftyloctovou (NAA) 0,3 mg.l⁻¹, sacharózy 15 g.l⁻¹, agaru 8 g.l⁻¹ (Danish agar, Carl Roth), pH je upraveno na hodnotu 5,7–5,8 pomocí roztoku KOH nebo HCl. Médium je sterilizováno autoklávováním při 121 °C a 118 kPa po 30 minut. Kultivační podmínky jsou podobné jako u fáze multiplikace (teplota 24±1 °C), při

světelném režimu 16/8 hodin (světlo/tma) s osvětlením o intenzitě $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. V závislosti na genotypu stromů se začínají kořeny objevovat po 3 až 4 týdnech od nasazení na zakořeňující média. Po 5 až 6 týdnech jsou kořínky na prýtech dostatečně dlouhé (kolem 1–2 cm) a kompletní rostliny se po vyjmutí z média a opláchnutí v slabém roztoku hypermanganu přesazují do květináčů ($7 \times 7 \times 8$ cm) se samotným perlitem (agroperlit) nebo substrátem (rašelina : písek : perlit 1 : 1 : 1) a zalévají se dle potřeby (tak aby byl substrát vlhký). Hnojení se provádí obvykle jednou týdně hnojivem Kristalon Start (N-P-K = 19-6-20 + 3 % Mg + 7.5 % S + mikroprvky B, Mo, Fe, Cu, Mn, Zn, AGRO CS) nebo je možné nahradit komerční hnojivo naředěným tekutým MS médiem bez fytohormonů a sacharózy v poměru 1 : 10 s destilovanou vodou. Aklimatizace (navyknutí rostlin z *in vitro* na *ex vitro* podmínky) probíhá v obdobných kultivačních podmínkách jako v předešlých fázích (teplota 24 ± 1 °C, při světelném režimu 16/8 hodin (světlo/tma) s osvětlením o intenzitě $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (zářivky cool white, 36 W, Philips), zprvu při cca 95% relativní vzdušné vlhkosti, která se postupně během 4 týdnů snižuje na cca 60 % relativní vzdušné vlhkosti. Preventivně se aplikuje fungicidní přípravek (např. 1% Previcur Energy® (propamocarb 530 g l⁻¹, fosetyl-Al 310 g l⁻¹ –Bayer Garden, Germany) jednou za dva týdny. Po aklimatizaci se rostliny přenášejí do skleníku nebo na venkovní stíněnou plochu (dle ročního období).



Obr. 2. Schéma *in vitro* mikropropagace břízy ojcovské (fotografie ve schématu M. Baláš, J. Vítamvás)

2.2.4 Výsadba na venkovní plochy

Rostoucí rostliny po aklimatizaci se umísťují k dopěstování na venkovní plochy a dle potřeby se přesazují do vhodných sadebních obalů, které umožní vhodný vývoj a růst kořenového systému (Nárovcová 2006). Na stanoviště, kde budou výpěstky břízy ojcovské dále růst, je možné vysazovat ve druhém nebo třetím roce po převedení do *ex vitro* podmínek, když jsou rostliny dostatečně vzrostlé.

2.3 Standardizovaný metodický postup roubování

Roubování je vhodné provádět na přelomu března a dubna na narašené podnože břízy bělokoré (rašení probíhá v teplém skleníku nebo fóliovníku). Podnož se seřízne na cca 30–40 cm tak, aby na vrcholu zůstal rostoucí tažný pupen. Zimní nenarašené rouby (10–15 cm dlouhé) se umístí na podnož v jedné nebo ve dvou výškách – na bázi roubováním do boku a na terminálu plátkováním (slabší podnož) nebo sedélkováním (silnější podnož). Úvazek rouby se provede vázací kaučukovou páskou a natře elastickým stromovým balzámem Tervanol F (turpentine, oil, 1% thiabendazole, limonene – Dr. Stähler, Schopf GmbH, Germany). Srůst podnože a rouby je možné vysledovat za 3–4 týdny. Roubovance ponecháme nejlépe ve fóliovém krytu. Jak to venkovní podmínky dovolí (většinou začátkem května), je možné roubovance přenést na venkovní plochy. Během vegetace jsou rostliny zalévány dle potřeby. Pokud se na podnoži vyskytnou nově vyrašené prýty (vlky), je nutné je odstranit. Úspěšnost přijetí rouby při roubování břízy ojcovské je cca 30 % (Vítámvás et al 2020).



Obr. 3. Roubovanci břízy ojcovské. Vlevo – čerstvě naroubované podnože. Vpravo – rostoucí roubovanci v druhé vegetační sezoně od naroubování (foto: J. Vítámvás)

3 Srovnání novosti postupů

Novost postupů spočívá ve využití metody organogeneze v *in vitro* podmínkách a roubování pro množení dospělých stromů ohrožené břízy ojcovské. Před výzkumem, realizovaným v rámci projektu TAČR TH03030339, jehož výstupem je i předkládaná metodika, u nás nebyla tato problematika podle dostupných literárních zdrojů vyřešena. Metodika se opírá o předchozí výzkum, jehož výsledky již byly publikovány (Vítámvás et al. 2020). Je popsána metoda odběru, indukce a multiplikace, zakořeňování a převod do *ex vitro* podmínek. Také je zmíněna metoda roubování břízy ojcovské.

Při řešení postupu vegetativního množení se kladl důraz na optimální složení živných médií v průběhu mikropropagace (indukce, multiplikace, zakořeňování) a na vhodné techniky roubování. Techniky vegetativního rozmnožování u bříz se používají již řadu let s většími nebo menšími úspěchy (Chalupa 1989, Särkilahti 1988, Rynnänen a Rynnänen 1986, Viherä-Aarnio a Velling 2001). Pokud se tyto techniky (zvláště mikropropagace) optimálně zvládnou pro určitý taxon, jsou získané kompletní rostliny ve vývoji a růstu podobné jako rostliny generativního původu (Chalupa 2002).

Na indukci adventivních prýtů z pupenů a multiplikaci se u bříz (*B. pendula*, *B. pubescens*) osvědčilo WPM médium (Ryynänen a Ryynänen 1986, Chalupa 1987, Särkilahti 1988, Ditmar 1991, Häggman et al. 2007) s koncentracemi BAP od 0,5 do 2 mg.l⁻¹. U pěstování břízy ojcovské se také vhodně projevil vliv WPM média a nižší přídavek BAP od 0,5 do 1 mg.l⁻¹ na růst prýtů, při vyšších koncentracích BAP již docházelo k masivnějšímu nárůstu kalusu bez pozitivního efektu tvorby nových prýtů a jejich délek. Při zakořenění prýtů bříz nedochází k větším problémům (Kauppi et al. 1999, Häggman et al. 2007, Wynne a McDonald 2002), kdy je v médiu použita nízká koncentrace kyseliny indolyl máselné (od 0,3 do 0,5 mg.l⁻¹) s účinností téměř 100 %, jak na WPM i MS médiu. Avšak u břízy ojcovské nebyla u těchto koncentrací hormonů tak dobrá úspěšnost zakořeňování (od 30 do 60 %). Většího efektu bylo dosaženo kombinací IBA a NAA v koncentraci 0,3 mg.l⁻¹, kdy se dosáhlo lepší tvorby kořenů u mikrořízků a to 78 % (Vítámvás et al. 2020).

Převod do *ex vitro* podmínek již je po většinou standardní a nevyskytly se negativní projevy růstu.

U rozmnožování roubováním bylo úspěšně využito této techniky – rouby byly umístěny na bázi podnože do boku a na terminálu podnože plátkováním (slabší podnož) a sedélkováním (silnější podnož).

Úspěšnost převedení jednotlivých stromů do *in vitro* kultur příp. při roubování je proměnlivá. Ryynänen a Ryynänen (1986) zkoušeli propagaci břízy karelské z 5 dospělých stromů, kdy se jim podařilo dopěstovat jen 2 stromy, naopak např. kolektivu Máchová et al. (2012) se podařilo do kultury převést všechny (7 ks) odebrané jedince břízy trpasličí z volné přírody.

V rámci této metodiky se podařilo do *in vitro* kultury zavést, udržet a množit 6 jedinců (z 16 odebraných). V rámci roubování bylo naroubováno 7 jedinců z 16 odebraných.

Zde je vidět jedno z možných úskalí *in vitro* kultur, kdy se u mikropropagace projevuje taxonová i klonová specifická (Welander, 1993). Podobně tomu je u roubování, kdy je úspěšnost roubování jedinců od 30 % do 80 % (Jermakov (1970)). Je nutné tedy dobře zvážit i výběr vhodné podnože pro roubování (Ranney and Whitman (1995)).

Uvedené technologické postupy mohou umožnit u břízy ojcovské úspěšně množení a pěstování jedinců, které lze využít pro reintrodukcii této břízy na zájmové plochy, doplňování do existující populace či vytváření klonových archivů pro „zálohování“ ohrožené populace břízy ojcovské.

4 Popis uplatnění metodiky

Bříza ojcovská patří v ČR k taxonům s velmi omezeným výskytem. Potvrzena je jen jedna lokalita v ČR s několika desítkami jedinců. Jedná se tedy o výjimečný taxon a je žádoucí, aby byl v ČR zachován. Pro záchranu břízy ojcovské se ukazuje jako vhodná metoda *in vitro* – organogeneze, případně roubování. Jarní ani letní řízkování se v našich experimentech neosvědčilo. Tyto technologie zaručují i genetickou identitu množných jedinců, jelikož se jedná o vegetativní rozmnožování.

Uplatnění metodiky je především v zajištění zachování hodnotných genotypů břízy ojcovské a namnožený materiál lze použít na podporu udržení populace na přirozených stanovištích, tak i pro komerční využití (zvláště pro okrasné zahradnictví). Namnožené klony břízy ojcovské jsou uchovávány na výzkumné stanici Truba při Arboretu FLD u Kostelce nad Černými lesy.

5 Ekonomické aspekty

Význam předpokládané metodiky stojí především v oblasti životního prostředí, v zachování druhové diverzity, a tedy mimo přímo peněžně vyjádřitelné ekonomické aspekty.

V rámci posuzování ekonomických aspektů u metodiky zabývající se zachováním taxonu břízy ojcovské je spíše kladen důraz na celospolečenské přínosy v oblasti zachování genetických zdrojů a biodiverzity.

Avšak metodika množení břízy ojcovské může znamenat i možnost rozšíření sortimentu nabízených dřevin a získání vyšších tržeb u uživatele výsledků výrobou sazenic břízy ojcovské pro komerční využití v rámci okrasného zahradnictví a pro rozšíření dendrologických sbírek. Technicky vzato lze technologií množení, zvláště *in vitro* technologií, produkovat několik set (až tisíc) sazenic zájmového taxonu ročně.

Náklady na množení *in vitro* technologií závisí na tom, zda je technologie k dispozici, nebo by se musela pořídit, jelikož v případě množení pomocí *in vitro* kultur jsou významné náklady na práci s tkáňovými kulturami v aseptických podmínkách (vybavení pro sterilizaci, kultivační boxy, laminární boxy, laboratorní přístroje pro přípravu roztoků), a to minimálně v základu 500 tis. Kč. Pokud budeme uvažovat, že se bříza ojcovská bude množit již v zavedené laboratoři, jsou náklady relativně nízké. Na zavedení jednoho genotypu a rok je možné počítat s částkou přibližně 1 440,- Kč (práce s materiálem na zavedení, udržení kultury (cca 20 ks prýtů na genotyp), započítání energií, odpisů a pracovního úvazku). Při 10 genotypech by to byla částka přibližně 14 400,- Kč a 30 genotypech pak 43 200,- Kč. Pokud by docházelo k množení a prodeji sazenic, lze ze zkušeností počítat, že náklady na mladou *ex vitro* převedenou a klimatizovanou rostlinu při zjištěném množitelském efektu (multiplikační koeficient 2–3) by byl přibližně 25,- Kč/ks. Zapěstovaná 1–2letá rostlina pak vychází nákladově na cca 50,- Kč/ks. V případě, že bychom pro potřeby množení zavedli a vypěstovali okolo 500 ks 2letých rostlin (poloodrostek, výška 50–70 cm) s prodejní cenou okolo 150,- Kč, byla by celková hodnota vyprodukovaných poloodrostků 75 000,- Kč, přičemž zisk by byl přibližně 50 000,-Kč.

Pro zavedení technologie roubování jsou oproti nákladům *in vitro* pěstování nižší, není nutné mít specializované vybavení. Vyšší náklady jsou na pořízení nebo vypěstování podnoží (1 podnož cca 50,- Kč), práce a ošetření místa roubování. Naroubovaná sazenice pak nákladově vychází přibližně na 61,-Kč/ks. Další údržba a pěstování po dobu 1–2 let zvedne cenu na cca 110,- Kč/ks. Zavedení 10 genotypů po alespoň 5 roubovancích by stálo cca 9 150,- Kč (přihlíží se k 30% úspěšností ujmoutí roubů), při 30 genotypech pak 27 450,- Kč. Pokud bychom vycházeli z počtu 500 ks vyprodukovaných roubovanců na rok, jsou náklady na pořízení rostoucích roubovanců cca 165 tis. Kč (počítá se s 30% úspěšností ujmoutí roubů). U

roubovanců, aby se zaplatily náklady na pěstování, by musela být prodejní cena zvýšena, a to na minimálně na 330,- Kč/ks. Výše uvedené ekonomické kalkulace jsou ale skutečně jen rámcovým odhadem. Jak již bylo zmíněno, autorský tým o ekonomické aspekty neopírá význam předkládané metodiky. Metodika by tedy neměla být prioritně posuzována podle ekonomických hledisek.

Přínosy produkce břízy ojcovské spočívají především v zachování zajímavého taxonu břízy na území České republiky a možnosti nabídnout vypěstované exempláře širokému spektru zájemců u nás i ve světě.

6 Dedikace

Vypracování metodiky bylo podporováno Technologickou agenturou ČR, č. p. TH03030339, Metody umělé reprodukce břízy ojcovské a postupy směřující k zachování její populace na území České republiky. Rostliny byly pěstovány s využitím laboratorního a školkařského zázemí výzkumné stanici Truba při Arboretu FLD u Kostelce nad Černými lesy.

7 Seznam použité související literatury

- Andrews, P.K., Marquez, C.S. (1993). Graft incompatibility. Hort. Rev. 15: 183–231.
- Badoni, A. Chauhan, J.S. (2010). *In Vitro* Sterilization Protocol for Micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini'. Academia Arena 2(4): 24–27.
- Buriánek, V., Novotný, P., Frýdl, J. (2014). Metodická příručka k určování domácích druhů bříz. Certifikovaná metodika. Lesnický průvodce 3/2014. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Strnady, 40 s.
- De Diego, N., Montalbán, I.A., Moncaleán, P. (2010). In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees. South African Journal of Botany 76(1): 158–162.
- Ditmar, O. (1991). In vitro regeneration of Curly birch, *Betula pendula* var. *carelica*. Thaiszia – Journal of Botany 1: 119–124.
- Hartmann, H.T. and Kester, D.E. (1975). Plant Propagation, Principles and Practices. 3th ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 662 s.
- Chalupa, V. (1987). European hardwoods. In: Bonga J.M., Durzan D.J. (eds.): Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Nijhoff, 224–246.
- Chalupa, V. (2002). *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. J. For. Sci., 48(12): 529–535.
- Chalupa, V. (1989). Micropropagation of mature trees of birch (*Betula pendula* Roth.) and aspen (*Populus tremula* L.). Lesnictví (Forestry) 35: 983–993.
- Jermakov, V.I. (1970): Razmnozenije berezy karelskoj metodom privivki. Les genetika i semenovodstvo, Petrozavodsk, s. 282–293.

- Kaplan, Z. (2019). Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha, 1172 s.
- Kauppi, A., Kauppi, M., Ulvinen, T. (1999). A new columnar form of *Betula pubescens* from Finland: morphological characteristics and micropropagation. *Annales Botanici Fennici* 36: 33–41.
- Korczyk, A. (1967). Rozmieszczenie geograficzne brzozy ojcowskiej (*Betula oycoviensis* Bess.). *Ochrona Przyrody* 32: 133–170.
- Krzaczek, W., Krzaczek, T. (1968). New locality of *Betula oycoviensis* Bess. in Poland. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 14: 155–156.
- Kříž, Z. (2003). *Betula* L. – bříza: Květena České republiky, část II (ed. by S Hejný & B Slavík), Academia, Praha, s. 35–46.
- Kolbek, J. et al. (2003): Vegetace Chráněné krajinné oblasti a Biosférické rezervace Křivoklátsko. 3. Společenstva lesů, křovin, pramenišť, balvanišť a acidofilních lemů. 380 s., Academia, Praha.
- Kubát, K., Hrouda, L., Chrtek, J., Kaplan, Z., Kirschner, J., Štěpánek, J. (2002). Klíč ke květeně České republiky, Academia, Praha, 928 s.
- Lloyd, G., McCown, B., (1980). Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoottip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421–427.
- Máchová, P., Malá, J., Cvrčková, H. (2012). Mikropropagace břízy trpasličí. *Zprávy lesnického výzkumu* 57: 202–206.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473–497.
- Nárovcová, J. (2006). Katalog biologicky ověřených obalů pro pěstování krytokořenného sadebního materiálu lesních dřevin. In: Jurásek A., Nárovcová J., Nárovec V. (2006): Průvodce krytokořenným sadebním materiálem lesních dřevin. *Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy*, 56 s.
- Nelson, S.H. (1968). Incompatibility survey among horticultural plants, *Intl. Plant Prop. Soc. Comb. Proc.* 18:343–393.
- Pritchard, H.W., Moat, J.F., Ferraz, J.B.S., Marks, T.R., Luís, J., Camargo, C., Nadarajan, J., Ferraz, I.D.K. (2014). Forest ecology and management innovative approaches to the preservation of forest trees. *For Ecol Manag* 333: 88–98.
- Ranney, T.G., Whitman II. E.P. (1995). Growth and survival of 'Whitespire' Japanese birch grafted on rootstocks of five species of birch. *HortScience* 30(3): 521–522.
- Ryynänen, L., Ryynänen, M. (1986). Propagation of adult curly birch succeeds with tissue culture. *Silva Fenn.* 20: 139–147.
- Särkilahti, E. (1988). Micropropagation of a mature colchicine – polyploid and irradiation – mutant of *Betula pendula* Roth. *Tree Physiol.* 4: 173–179.

- Sota, V., Kongjika, E. (2014). The effect of nutrient media in micropropagation and in vitro conservation of wild population of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.). J Microbiol Biotech Food Sci. 3 (6): 453–456.
- Staszkiwicz, J. (2013). Brzoza ojcovska (*Betula oycoviensis* Bess.) na górze Skielek w Beskidzie Wyspowym. URL <http://archive.is/LRuuR>
- Staszkiwicz, J., Wójcicki, J.J. (1992). "*Betula oycoviensis*" Besser in the environs of Kraków (S. Poland). Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidgenössische Technische Hochschule, Stiftung Rübel, in Zürich, 107: 94–97.
- Viherä-Aarnio, A., Velling, P. (2001). Micropropagated silver birches (*Betula pendula*) in the field – performance and clonal differences, Silva Fenn. 35: 385–401.
- Vítámvás, J., Kuneš, I., Viehmannová, I., Linda, R., Baláš, M. (2020). Conservation of *Betula oycoviensis*, an endangered rare taxon, using vegetative propagation methods. iForest 13: 107–113. doi: 10.3832/ifor3243-013
- Welander, M. 1993. Micropropagation of Birch. In: Ahuja, M. R. (ed.): Micropropagation of woody plants., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 223–246.
- Wynne, J., McDonald, M.S. (2002). Adventitious root formation in woody plant tissue: The influence of light and indole-3-butyric acid (IBA) on adventitious root induction in *Betula pendula*. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 38: 210–212.

8 Seznam publikací, které předcházely metodice

- Vítámvás, J., Kuneš, I., Viehmannová, I., Linda, R., Baláš, M. (2020). Conservation of *Betula oycoviensis*, an endangered rare taxon, using vegetative propagation methods. iForest 13: 107–113. doi: 10.3832/ifor3243-013
- Musilová, A. (2018). Vegetativní rozmnožování břízy karelské (*Betula pendula* var. *carelica* Merkl.). Bakalářská práce. Fakulta lesnická a dřevařská, ČZU v Praze, 38 s.
- Lovětínský, M. (2015). In vitro rozmnožování břízy ojcovské (*Betula oycoviensis* Besser). Bakalářská práce. Fakulta lesnická a dřevařská, ČZU v Praze. 41 s.

9 Summary

Vegetative propagation of plants with phenotypic traits of the birch (*Betula oycoviensis* Besser)

Micropropagation and grafting techniques were used to propagate the rare species of Ojcow birch in the Czech Republic (Obr. 1). Micropropagation was derived from dormant buds of *Betula oycoviensis*. Organogenesis induction were on WP medium (Lloyd, McCown 1980), with BAP 1.0 mg.l⁻¹, 30 g.l⁻¹ sucrose, and 8 g.l⁻¹ agar (Danish agar, Carl Roth), pH adjusted

to 5.7–5.8. After 4–6 weeks, the cultures were transferred onto the multiplication WPM medium with concentrations of phytohormones BAP 0.5 or 1.0 mg l⁻¹, 30 g l⁻¹ sucrose, and 8 g l⁻¹ of agar (Danish agar, Carl Roth), pH adjusted to 5.7–5.8. The cultures were transferred every 4 weeks. For induction of rhizogenesis was used ½ MS with the concentration of auxin IBA (0.3 mg l⁻¹) and NAA (0.3 mg l⁻¹), 15 g l⁻¹ sucrose, and 8 g l⁻¹ of agar (Danish agar, Carl Roth), pH adjusted to 5.7–5.8. Cultivation proceeded in an air-conditioned room at 24±1°C, and under cool white fluorescent light (36W Philips tubes, 35 µmol m⁻¹ s⁻¹), and 16/8 h (day/night) photoperiod. Plants with roots were transferred from rooting medium into pots (7 × 7 × 8) with agropelit (AGRO CS) or substrate (sand : peat : perlite, 1 : 1 : 1) and watered by basal concentrate (1 : 10) MS medium (Murashige, Skoog 1962) or commercial fertilization (Kristalon Start, N-P-K = 19-6-20 + 3% Mg + 7.5% S + microelements B, Mo, Fe, Cu, Mn, Zn, AGRO CS). Acclimatization proceeded in air-conditioned 24±1°C, and under cool white fluorescent light (Cool white 36 W Philips tubes, 35 µmol m⁻¹ s⁻¹), and 16/8 hrs (day/night) photoperiod. For four weeks, the plants were being acclimatized to the reduced relative air humidity successively decreasing from 95% to 60% and then transferred outdoors to the field (Obr. 2).

Grafting of *B. oycoviensis* was performed on *B. pendula* rootstocks at the beginning of March (Obr. 3-left). The terminal parts of the rootstock were removed at a height of 30–40 cm above ground, and the winter scions (10–15 cm long) with no shoots were placed on the rootstock at two positions: on the side (side-veener graft), and on the top (top rind grafting). The graft point was tied and fastened by rubber tape and coated with Tervanol F® balsam (Dr. Stähler, Schopf GmbH, Germany).

The growing plants are stored in the Truba, Arboretum FLD, Kostelec nad Černými lesy.