

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta lesnická a dřevařská
Katedra ekologie lesa

Vegetativní rozmnožování břízy karelské (*Betula
pendula* var. *carelica* Merkl.)

Bakalářská práce

Autor: Alexandra Musilova

Vedoucí práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Praha 2019

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Alexandra Musilova

Lesnictví

Název práce

Vegetativní rozmnožování břízy karelské (*Betula pendula* var. *carelica* Merkl.)

Název anglicky

Vegetative propagation of curly birch (*Betula pendula* var. *carelica* Merkl.)

Cíle práce

Vypracování literární rešerše – množení bříz pomocí vegetativních metod – klasickými i in vitro metodami, zejména s přihlédnutím k možnostem množení břízy karelské.
Z literárních zdrojů vytvořit metodiku množení vybraných bříz a pokusit se založit kulturu břízy karelské.

Metodika

Získání literárních zdrojů pro vypracování literární rešerše vegetativnímu pěstování bříz.

Návrh metodiky množení bříz pomocí in vitro metod.

Převod rostlinných částí (pupenů, maldých prýtů) z dospělých stromů do in vitro kultury.

Sledování přežívání rostlinných pletiv v in vitro kultuře.

Doporučený rozsah práce

35-45 stran

Klíčová slova

in vitro množení, mikropropagace, řízkování, roubování, streilizace

Doporučené zdroje informací

- Ewald D., Naujoks G., Piegert H. (2000). Performance and wood quality of in vitro propagated hybrid curly birch (*Betula pendula* x *Betula pendula* var. *carelica* Sok.) clones. *Silvae Genetica*, 49(2): 98-101.
- Iliev I., Scaltsoyiannes A., Tsaksira M., Gajdosova A. (2010). Micropropagation of *Betula pendula* Roth. cultivars by adventitious shoot induction from leaf callus. *Acta Horticulturae*, 885: 161-174.
- Magnusson V.A., Castillo C.M., Dai W. (2010). Micropropagation of two elite birch species through shoot proliferation and regeneration. *Acta Horticulturae*, 812: 223-230.
- Ryynänen L., Aronen T. (2007). Phenotypic expression of leaf variegation in two *Betula pendula* Roth genotypes following micropropagation, cryopreservation and grafting. *Propagation of Ornamental Plants* 7(1): 23-28.
- Sæbø A., Skjeseth G., Appelgren M. (1995). Light quality of the in vitro stage affects the subsequent rooting and field performance of *Betula pendula* (roth). *Scandinavian Journal of Forest Research*, 10(1-4): 155-160.
- Yang C. (2017). Research progress on genetic improvement of *Betula platyphylla* Suk. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 4(4): 391-401 .
-

Předběžný termín obhajoby

2017/18 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie lesa

Elektronicky schváleno dne 29. 11. 2018

prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 2. 2019

prof. Ing. Marek Turčáni, PhD.

Děkan

V Praze dne 01. 04. 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma vegetativní rozmnožování břízy karelské (*Betula pendula* var. *carelica* Merkl.) vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědoma, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 20. dubna 2019

Alexandra Musilova

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Janu Vítámvásovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při vypracování této bakalářské práce.

Alexandra Musilova

Abstract

This thesis deals with an issue of vegetative reproduction of genus *Betula* with a focus on reproduction of *Betula pendula* var. *carelica* Merkl. using micropropagation *in vitro* methods. First we describe a possible procedure of reproduction. On this procedure we made an experiment to create cultures of *Betula pendula* var. *carelica* Merkl.. During these experiments we watched the effect of sterilization on contamination and degree of mortality over time. For creating a culture we use buds. For sterilization we use mercuric chloride ($HgCl_2$) in concentration 0.05%. We use MS and WPM mediums without hormone and with hormone BAP in concentration $1\text{ mg} \cdot l^{-1}$ as a cultivation medium.

Key words

in vitro propagation, micropropagation, cutting, grafting, sterilization

Abstrakt

Tato práce se zabývá problematikou vegetativního rozmnožování rodu *Betula* se zaměřením na množení *Betula pendula* var. *carelica* Merkl. metodami mikropropagace *in vitro*. Nejdříve je popsána možná metodika množení, na jejíž základě je dále proveden pokus o založení kultury. Při tomto pokusu byl sledován vliv sterilizace na kontaminaci a stupeň mortality v průběhu času. Pro založení kultury byly použity pupeny. Pro sterilizaci byl použit chlorid rtuťnatý ($HgCl_2$) v koncentraci 0.05%. Jako kultivační média byla použita MS a WPM média bez přidání hormonu a s přidáním hormonu BAP v koncentraci $1mg \cdot l^{-1}$.

Klíčová slova

in vitro množení, mikropropagace, řízkování, roubování, sterilizace

Obsah

Seznam obrázků	8
Seznam tabulek	9
Seznam použitých zkratk	10
1 Úvod	9
2 Charakteristika rodu <i>Betula</i>	11
2.1 Popis rodu <i>Betula</i>	11
2.2 Popis druhu <i>Betula pendula</i> Roth var. <i>carelica</i> Merkl.	12
3 Vegetativní rozmnožování	19
3.1 Mikropropagace <i>in vitro</i>	20
4 Metodika	26
4.1 Příprava živného média	26
4.2 Založení kultury břízy karelské	27
5 Výsledky	30
6 Diskuse	33
7 Závěr	35
Literatura	36

Seznam obrázků

1	Vlevo textura dřeva břízy bělokoré, vpravo textura dřeva břízy karelské (Obsledovaniye populyacii karelskoy berezy..., 2005) . . .	13
2	Keřovitá bříza karelská (Prekrasnyye mutanty, 2014)	14
3	Nízká bříza karelská (Zhivoy les, 2014)	15
4	Vysoká bříza karelská (Bereza karelskaya, 2015)	16
5	Areál výskytu břízy karelské (Vetchinnikova, 2004)	18
6	Kultura břízy karelské po pěti měsících od zavedení (foto autora)	32
7	Namnožené explantáty z jednoho klonu po šesti měsících od zavedení(foto autora)	32

Seznam tabulek

1	Složení MS a WPM medií	29
2	Počet prorůstajících pupenů v čase a na konkrétním médiu	30
3	Počet prorůstajících pupenů v čase a na konkrétním médiu	31

Seznam použitých zkratk

BAP – 6-benzylaminopuryn

MS – Murashige and Skoog medium (Murashige a Skoog, 1962)

IBA – β -indolylmásečná kyselina

NAA – kyselina naftyloctová

pH - záporný dekadický logaritmus

WPM – wood plant medium (Lloyd, McCown 1980)

KOH - hydroxid draselný

1 Úvod

Bříza je jedním z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších druhů lesních dřevin v Evropě, Asii a Severní Americe. Zalesňování Evropy po době ledové započalo břízami. Tato dřevina se řadí k pionýrským dřevinám a je vysazovaná v lesích jako rekultivační rostlina. Bříza karelská je zvláštní formou břízy bělokoré (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.), jejíž charakteristickým znakem je vysoce dekorativní vzorovaná textura dřeva. Kvůli jedinečnosti je tato bříza na světovém trhu vysoce ceněna a na rozdíl od jiných dřevin se prodává na kilogramy a ne na metry krychlové (Vetchinnikova a kol. , 2012).

V posledních desetiletích se problém zachování a obnovy genofondu vzácných a ohrožených druhů rostlin výrazně zvýšil. Mezi nimi zvláštní místo patří bříze karelské. Rozlišujeme dva způsoby množení rostlin – generativní a vegetativní. Při generativním způsobu množení břízy karelské v semenném potomstvu budou vždy přítomny jak obyčejné formy břízy bělokoré, tak formy s požadovanou texturou dřeva. Pravděpodobnost vzniku jedinců se vzorovaným dřevem může se lišit v závislosti na tom, odkud byla semena použita. Ze samostatně stojícího stromu tato pravděpodobnost činí – 2 - 3%, ze stromu rostoucího na plantáži – do 25%, při řízeném opylování může dosáhnout až 80 - 90%. Podle zkušenosti, semena břízy karelské rychle ztrácejí klíčivost, proto musí být použita čerstvá nebo ihned příští jaro po sklizni (Karpova A. , 2013).

Dalším způsobem rozmnožování je vegetativní rozmnožování. Výhodou tohoto způsobu rozmnožování je možnost vypěstovat klon, který zachovává genetickou informaci původního jedince. Mezi vegetativní způsoby rozmnožování patří řízkování, roubování a vysoce efektivní způsob množení rostlin prostřednictvím explantátových kultur v laboratorních podmínkách (*in vitro*). Explantáty se pěstují ve zkumavkách společně s kultivačním médiem, které obsahuje organické látky, soli, vitaminy a případně i růstové látky. K nejčastěji používaným metodám *in*

vitro množení rostlin patří somatická embryogeneze a organogeneze. Díky těmto metodám je nám umožněno geneticky zlepšovat vlastnosti lesních dřevin jako je například odolnost k nemocem. Také nám umožňují produkovat velké množství rostlin z explantátů v krátkém časovém období (Ahuja , 2013).

Cílem této práce je popsat vegetativní metody množení bříz, zejména s přihlédnutím k možnostem množení břízy karelské. Následně vytvořit metodiku množení vybraných bříz a pokusit se založit kulturu břízy karelské.

2 Charakteristika rodu *Betula*

2.1 Popis rodu *Betula*

Rod *Betula* patří do čeledi *Betulaceae* (břízovité), řádu *Fagales* (bukotvaré). Jedná se o opadavé stromy a keře různého vzrůstu mírného až subpolárního pásu severní polokoule. Listy břízy jsou střídavé, většinou vejčité, s palisty. Mladé listy jsou lepkavé. Jednodomé stromy kvetou v době rašení listů. Květy se zakládají už na podzim v převislých jehnědách. Samčí jehnědy jsou umístěny na loňských větévkách, samičí na letošních. Při zralosti se plodenství rozpadají a uvolňují dvoukřídlé nažky, které jsou unášeny větrem na velké vzdálenosti. (Spohn, 2013). Do tohoto rodu patří asi 90 druhů (přesný počet dosud nebyl stanoven) (Karpova A., 2013).

Na území České Republiky zastoupení bříz dosahuje 4,2% (NIL, 2015). Na tomto území byl zaznamenán výskyt sedmi druhů, ale pouze tři z nich mají lesnický význam: bříza bělokorá (*Betula pendula*), bříza pýřitá (*Betula pubescens*) a bříza karpatská (*Betula carpatica*). Největší zastoupení má bříza bělokorá, která je stálou příměsí lesů po celém území, chybí pouze v klečovém vegetačním stupni, kde je nahrazená břízou pýřitou a karpatskou (Buriánek a kol., 2014).

V Evropě se vyskytují i další druhy rodu *Betula*. Jeden z nich je například *Betula pendula* var. *carelica* Merkl.. Tento druh se vyskytuje převážně v severní a východní části Evropy a je známý svoji vzácnou texturou dřeva.

2.2 Popis druhu *Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.

Nádherná textura dřeva (viz obrázek 1) a neobvyklá struktura kmenu přitahovala pozornost mnoha vědců. Bříza karelská je snadno rozpoznatelná díky charakteristickým znakům jako je boulovitost kmenu (viz obrázek 4), větví a často i mladých letorostů. Na kmenech mladých stromů je kůra hladká, ale značně silnější než u normální břízy bělokoré, a to převážně v místech pod kterými se ve dřevě tvoří charakteristická tmavší kresba. Na kmenech starších stromů se tvoří hrubá borka. Díky malým listům a jejich průhlednosti je v březovém porostu vždy dostatek světla. Tvar koruny závisí na stanovišti na kterém bříza roste. V mladém věku bývá tvar koruny oválný. Postupem času, jak strom roste, se koruna zakulacuje a vznikají převisající větve (Karpova A. , 2013).

Odlišné vlastnosti břízy karelské byly dlouho považovány za zvláštní chorobu neznámého původu. Až v roce 1857 byla popsána K. Merklinem a byla označena jako varieta břízy bělokoré a dostala latinský název *carelica*. Boulovité útvary se s věkem stromů zvětšují. V některých případech se rozprostírají téměř po celém povrchu kmene. Podle přítomnosti některých charakteristických znaků a jejich rozměrů, lze do značné míry určit vzhled a kvalitu dřeva daného stromu (Vet-chinnikova, 2004).



Obrázek 1: Vlevo textura dřeva břízy bělokoré, vpravo textura dřeva břízy karelské (Obsledovaniye populyacii karelskoy berezy..., 2005)

Břízu karelskou můžeme na základě vzhledu rozlišit na tři typy (Karpova A., 2013) :

- Keřovitá bříza karelská
- Nízká bříza karelská
- Vysoká bříza karelská

Keřovitá bříza karelská (viz obrázek 2)

Prvním typem je keřovitá bříza karelská, která dosahuje maximální výšky tři metry. Stromy tohoto typu nemají jasně vyjádřený hlavní kmen. Během růstu se totiž kmen rozděluje do velkého počtu bočních větví, nebo místo hlavního kmene, vyrůstají stejně silné výhonky, které rostou buď vertikálně nebo pod určitým sklonem. V obou těchto případech dochází k nadměrnému rozvoji v kořenové části kmene. Tento typ břízy karelské se dále liší v tom, že její výhonky nejsou zakončeny jedním pupenem, ale dvěma až třemi, popřípadě několika, blíže umístěnými pupeny. V průběhu vývoje se díky tomu tvoří rozvětvení výhonku. Tento typ břízy karelské není vhodný jako zdroj dřeva, a proto se používá pouze k dekorativním účelům. Ve volné přírodě se moc nevyskytuje.



Obrázek 2: Keřovitá bříza karelská (Prekrasnyye mutanty, 2014)

Nízká bříza karelská (viz obrázek 3)

Druhým typem je nízká bříza karelská. Od břízy bělokoré stejného věku, pěstované za stejných podmínek, se nízká bříza karelská liší tvarem koruny a celkovou výškou, která nepřesahuje 10 - 15 metrů. Koruna se liší tvarem a strukturou. Nízká bříza karelská má zaoblenou, širokou a hustě listnatou korunu. Hlavní osa kmene je nahrazena několika stejně vyvinutými větvemi. Tento typ břízy karelské je z pohledu těžby dřeva významnější než keřovitá bříza karelská.



Obrázek 3: Nízká bříza karelská (Zhivoy les, 2014)

Vysoká bříza karelská (viz obrázek 4)

Třetím typem je vysoká bříza karelská. Tento typ je charakteristický výškou kolem 25 metrů, což je podobná výška jako u břízy bělokoré, malým počtem větví a pravidelnou sbíhavostí kmene. Z kvalitních vysokých bříz karelských je často možné získat cenné čtyř až pěti metrové kulatiny.



Obrázek 4: Vysoká bříza karelská (Bereza karelskaya, 2015)

Podmínky pro růst břízy karelské jsou podobné jako podmínky pro růst břízy bělokoré. Z toho důvodu se oblasti jejich výskytu často shodují. Nejčastější výskyt břízy karelské je v lesních porostech tvořených borovicemi (*Pinus sylvestris*) a smrkou (*Picea abies*). Bříze karelské se dobře daří na mírně svažitéch, dobře odvodněných svazích a na kopcích. Bříza karelská není náročná na půdu, a proto roste na půdách různého minerálního složení, s výjimkou půd nadměrně vlhkých a podzolových. Nejlépe roste na hlinitých a písčítých půdách. Na rozdíl od břízy bělokoré, která tvoří stejnorodý lesní porost, roste zpravidla bříza karelská v malých shlucích. Bříze karelské se také daří na plantážích společně s osikou (*Populus tremula*), olší (*Alnus glutinosa*) a třešněmi (*Prunus*), méně často s jehličnatými stromy. Nejčastěji roste bříza karelská s olší šedou (*Alnus incana* ssp. *incana*) (Karpova A., 2013).

Areál výskytu

Kolem roku 1950 byl doložen výskyt břízy karelské ve skandinávských zemích, v Rusku, v Bělorusku, v České republice, na Slovensku, v Německu, v Polsku a v baltských zemích. V současné době se oblast výskytu břízy karelské výrazně snížila z důvodů velké poptávky po jejím dřevě. Nyní roste bříza karelská v severní a střední Evropě a v Rusku. Severní hranice prochází Švédskem, Finskem a Karelskou republikou v Rusku. Západní hranice prochází Norskem, jižní hranice Slovenskem a východní regionem Kostroma v Rusku. Počátkem XXI století nejpočetnější výskyt břízy karelské byl zjištěn na území Běloruska (až 40 tisíc stromů) a Ruska (přibližně 3 tisíce stromů v přirozených porostech a 35 - 40 tisíc stromů na plantážích v Karelské republice) (Karpova A., 2013).



Obrázek 5: Areál výskytu břízy karelské (Vetchinnikova, 2004)

Taková to roztroušená oblast výskytu břízy karelské v Rusku a dalších evropských zemích, stejně jako to, že její areál leží, v oblastech dřívější ledovcové aktivity, poukazuje na to, že tato dřevina je reliktního původu. Což je potvrzeno mnoha archeologickými vykopávkami a řadou literárních pramenů (Karpova A., 2013).

3 Vegetativní rozmnožování

Při vegetativním množení vzniká jedinec, který je genetický shodný s mateřskou rostlinou. K těmto metodám množení se můžou použít nadzemní části rostliny (výhony, pupeny, listy) nebo podzemní části (kousky kořenů). Při množení lesních dřevin se dají použít klasické metody vegetativního množení takové jako například řízkování, očkování, roubování nebo hřížení (Kuznetsova, 2000).

V přirozených podmínkách se bříza karelská může vegetativně rozmnožovat pomocí nových letorostů, které se tvoří z nahodilých pupenů na kořenovém krčku, nebo pomocí hřížení.

Zkušeností s rozmnožováním břízy pomocí roubování ukázali, že nejlepší výsledku lze dosáhnout při použití materiálu z mladých stromů. Průměrná úspěšnost zakořenění pohybuje v rozmezí od 1,6 do 40 % (Vetchinnikova, 2005).

Pomocí vegetativních metod množení můžeme zlepšit genetické vlastnosti pěstovaných dřevin a získat odrůdy, které jsou vysoce produktivní a odolné vůči nemocem (Chalupa, 1990).

Na základě zkušenosti, bylo zjištěno, že faktory, které omezují vegetativní rozmnožování břízy bělokoré, jsou věk, genotyp dárcovské rostliny a fyziologické stadium, ve kterém byly části rostliny odebrané. Ukázalo se však, že faktory, které brání hromadnému klonování zralých a obtížně se množících stromů mohou být eliminovány mikropropagací. (Iliev a kol., 2008).

3.1 Mikropropagace *in vitro*

Mikropropagace je další možností vegetativní reprodukce. Jde o biotechnologický postup *in vitro*, výhodou kterého je možnost namnožit velký počet identických jedinců v relativně krátké době (Novotný a kol., 2008). Rostliny nebo jejich části se pěstují v umělých podmínkách a nazývají se explantáty nebo explantátové kultury. Většinou se používají kultivační nádoby ze skla, proto se tyto metodě říká *in vitro* – ve skle. Základem metody klonální mikropropagace *in vitro* je schopnost somatických buněk vyšších rostlin vytvořit kompletního jedince. Tato vlastnost se nazývá totipotence. To znamená, že každá buňka obsahuje všechny genetické informace nezbytné pro růst a vývoj celého organismu. Z čehož vyplývá, že odebraná část rostliny je schopna vlivem působení určitých hormonů a při vhodných kultivačních podmínkách vyprodukovat velké množství nových jedinců. Schopnost regenerace orgánu ze somatických buněk je však u většiny lesních dřevin výrazně nižší než u bylinných rostlin. Kromě toho je důležité si uvědomit, že ne každá část stromu vykazuje totipotenci v *in vitro* kultuře. To do značné míry závisí na genotypu organismu, jeho věku a stavu izolovaného explantátu (Vetchníkova a kol., 2005).

Na území České republiky první mikropropagace proběhla začátkem 70. let. Ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.. Byly mikropropagovány smrk (*Picea abies*) a douglaska (*Pseudotsuga menziesii*) (Máchová a kol., 2012).

Mikropropagace může být provedena buď organogenezí nebo somatickou embryogenezí.

Organogeneze

Nejúspěšnější metoda, která se osvědčila při klonovém množení listnatých dřevin, je organogeneze. Hlavním faktorem, zajišťujícím úspěšnou organogenezi je zajištění vhodných kultivačních podmínek, a to například světla, teploty, složení kultivačního média, zejména koncentrace hormonů. Dalšími faktory jsou stáří a fyziologický stav dárcovského jedince (Novotný a kol., 2008). Při organogenezi dochází k regeneraci prýtu v médiu obohaceném cytokininem a k regeneraci kořenu v médiu obohaceném auxinem (Ahuja, 2013). Pokud koncentrace cytokininu a auxinu je stejná, dochází ke tvorbě kalusu.

Somatická embryogeneze

Mikropropagace pomocí somatické embryogenezi je proces, při kterém v kultivačních nádobách na médiu ze somatických rostlinných buněk vznikají embrya, které se vyvíjejí a diferencují v rostlinu (Ahuja, 2013). Rozlišujeme dvě části somatické embryogeneze: indukci a expresi. Ve fázi indukce získávají somatické buňky vlastnosti embrya, což zahrnuje celkovou změnu buněčné struktury, metabolismu a fyziologie. Ve fázi exprese se buňky diferencují do somatických embryí (Jiménez, 2005).

Technologie somatické embryogenezi je stále ve vývojové fázi a některé její základní problémy vyžadují další výzkum. Kromě obtíží s tvořením somatických embryí, u některých dřevin dochází k problémům s dozráváním a vývojem životaschopných somatických sazenic. Po vyřešení těchto problémů by měla být technologie somatické embryogeneze k dispozici pro masové klonování dřevin. Mikropropagace prostřednictvím somatické embryogeneze má několik výrazných výhod. Somatická embrya mohou být pěstována v tekutém médiu, z tohoto důvodu by mělo být možné zvýšit produkci embryí v bioreaktorech. Další výhodou je to, že somatická embrya mohou být zapouzdřena, aby se vytvořilo „syntetické semeno“, které může být skladováno nebo pěstováno jako osivo (Ahuja, 2013).

Proces mikropropagace *in vitro* se skládá z několika následujících po sobě kroků. První krok je výběr explantátů a jeho zavedení do kultury. V tomto kroku je důležité získat kulturu bez infekce a docílit jeho přežití v živném médiu. Další krok je zvýšení počtu explantátu tedy reprodukce. Hlavními faktory ovlivňující reprodukci jsou: původ rostliny, její odrůda, fyziologický stav explantátu a podmínky kultivace. Důležitým krokem v této fázi je indukce kořenu. Posledním krokem je zakořenění a adaptace rostlin na nesterilní podmínky. Velmi důležité je stanovení podmínek pěstování a optimální doby výsadby rostlin. Rostliny by měli být nejprve vysázeny ve skleníku a poté v otevřeném terénu (Vetchinnikova, 2005).

Jednotlivé kroky budou více popsány níže.

Založení kultury

Pro založení kultury se mohou použít například výhony, pupeny, listy nebo i kousky kořenů z donorového stromu. Výhodou mikropropagace *in vitro* je to, že množství odebíraného materiálu je minimální a donorový strom zůstává nepoškozen.

Růst a vývoj explantátové kultury ovlivňuje hned několik podmínek. Jde především o médium ve kterém se kultura pěstuje. Dalšími velmi důležitými podmínkami jsou teplota, intenzita světla a fotoperioda. Nejčastěji používanou teplotou při kultivaci bříz je teplota v rozmezí 20 - 24°C při fotoperiodě 16/8 h. (světlo/tma) (Máchová a kol., 2012; Girgžde, 2017; Vetchinnikova a kol., 2005).

Živná média

Při mikropropagaci bříz se nejčastěji používají média MS (Murashige, Skoog 1962) a WPM (Lloyd, McCown 1980) (viz. tabulky 1 a 2). Důležitou složkou živného média jsou makroelementy (dusík, fosfor, síra, vápník, draslík a hořčík), mikroelementy (železo, mangan, měď, zinek, bór a molybden) a organické látky (sacharóza). Sacharóza je nejlepším zdrojem uhlíku při koncentraci od 2 do 5%. Pro růst a vývoj rostliny jsou také velmi důležité vitamíny B a inositol. Média mohou být jak tekutá, tak i ztužená. Pro ztužování se může použít třeba agar, který se přidává v koncentraci 6 – 8 g na 1 litr roztoku. Ztužená konzistence média napomáhá udržet rostlinu na povrchu a brání tomu, aby explantát se zcela ponořil do kapaliny a zahynul z důvodu nedostatku kyslíku. Hodnota pH média se nejčastěji doporučuje v rozmezí 5,6 – 5,8 (Vetchinnikova, 2005).

Sterilizace

Je známo, že pěstování stromů v podmínkách *in vitro* je složitější a obtížnější, než pěstování bylinných rostlin. Jedním z důvodů je to, že všechny části organu jsou silně infikované mikroorganismy. Před pasáží kultury na živné médium, musí být explantát povrchově vysterilizován dezinfekčním roztokem. Je ale třeba si uvědomit to, že živé tkáně rostoucí části rostliny jsou velmi citlivé na účinky sterilizačních prostředků. Proto je velmi důležitá kvalita použitého sterilizačního roztoku, jeho koncentrace a doba aplikace, která se volí pro každý druh tkáně individuálně. Například, podle literatury, ke sterilizaci výhonků břízy, 2-3 cm dlouhých, lze použít 0,1% roztok chloridu rtuťnatého ($HgCl_2$) s aplikační dobou 10 - 15 minut, po jehož aplikaci je nutné výhonky třikrát propláchnout destilovanou vodou. (Chalupa, 1981) Další způsoby sterilizace jsou pomocí alkoholu, roztoku chloraminu, roztoku chlornanu sodného a další. Z důvodů takové rozmanitosti antiseptik, bylo provedeno testování nejúčinnějšího způsobu sterilizace březových explantátů (Vetchinnikova, 2005). Celkem se testovalo 25 možností a nejúčinnějšími se ukázaly - 0,1% roztok chloridu rtuťnatého ($HgCl_2$) (s aplikací

po dobu 3 minut), 5% roztok chlornanu vápenatého ($Ca(ClO_2)$) (s aplikací po dobu 3 minut) a 70% roztok ethanolu (od 1 do 3 minut, v závislosti na typu explantátu).

Multiplikace

Výzkumy prokázaly úspěšnost různých metodik s odlišným složením kultivačních médií a jiným obsahem růstových regulátorů. Například podle výzkumu Häggmana (Häggman a kol., 2007) se ukázalo jako úspěšné pro druh *Betula pendula* použití media WPM s přidáním $2\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP v kombinaci s NAA $\text{ug} \cdot \text{l}^{-1}$. Podle Chalupy (Chalupa, 1987) bylo úspěšné médium WPM s nižším obsahem BAP ($0,5 - 1 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Podle výzkumů Máchové a kol. (Máchová a kol., 2012) se prokázalo jako úspěšné médium WPM s obsahem BAP $0,2 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a IBA $0,1 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a nižším obsahem glutamínu $10\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Vetchinnikova u druhu *Betula pendula* var. *carelica* Merkl. zkoumala úspěšnost rozmnožování na MS médiu s různými koncentracemi BAP, sacharózy a inositolu. Při trojnásobně zvýšené koncentraci BAP se prokázalo, že toto překročení optimální hodnoty vede k opačnému efektu, jehož důsledkem je zpomalený růst explantátu (Vetchinnikova, 2005).

Zakořeňování

Při organogenezi dochází k regeneraci prýtu v médiu obohaceném cytokininy a k regeneraci kořenu v médiu obohaceném auxiny (Ahuja, 2013). Pro navození rhizogeneze u břízy trpasličí (*Betula nana*) Máchová a kol. (Máchová a kol., 2012) použily médium WPM s obsahem $0,5 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ IBA a úspěšnost zakořeňování dosáhla 100%. Také se experimentálně osvědčilo médium MS s obsahem IBA v koncentraci $0,5 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ při rhizogenezi rostlin *Taxus baccata* L. (Novotný a kol., 2008)

Aklimatizace a převod do *ex vitro* podmínek

Po úspěšné rhizogenezi rostlinky se musí aklimatizovat na skleníkové a polní podmínky. Přejít mezi prostředím *in vitro*, kde je relativní vlhkost je téměř 100%, do prostředí *ex vitro* s relativní vlhkostí přibližně 50% je pro přežití rostlin kritické. Proto je nutné postupně snižovat vlhkost ze 100% na polní podmínky. Nejčastěji aklimatizace probíhá v klimatizované místnosti s relativní vlhkostí 90% a po 14 dnech rostliny jsou přenesené do skleníku, kde je relativní vzdušná vlhkost přibližně 70%. (Novotný a kol., 2008; Máchová a kol., 2012) Další problém je ten, že *in vitro* rostliny jsou závislé na médiu pro zásobování cukry a jinými živinami. Jejich listy nejsou příliš fotosynteticky aktivní a jakmile rostliny budou přenesené do *ex vitro* podmínek, musí se geny pro fotosyntézu okamžitě zapnout, aby rostliny přežily. Je proto důležité mít určitý počet listů a dobrý kořenový systém před přenosem rostlin z *in vitro* podmínek do *ex vitro*. (Ahuja, 2013) Zpočátku se používá zalévací směs. Například Máchová a kolektiv (Máchová a kol., 2012) při mikropropagaci břízy trpasličí přesazovali rostliny do agroperlitu a jedenkrát denně je zalévaly základním roztokem MS, který byl naředěný destilovanou vodou v koncentraci 1 : 10. Po dvou týdnech rostliny byli přesazené do směsi zeminy, rašeliny a perlitu (2 : 1 : 1) a přenesené do skleníku. Po vypěstování ve skleníku sazenic schopných výsadby a rozvoji kvalitního kořenového systému se rostliny přesazují na venkovní záhony (Ahuja, 2013).

4 Metodika

4.1 Příprava živného média

Živné médium MS bylo připraveno z předem namíchaných roztoků (viz tabulka 1a) a to následujícím způsobem. Nejprve byly v první kádince postupně smíchány roztoky požadovaného množství s destilovanou vodou. Poté byl přidán myo-inositol a sacharóza. Následně bylo za stálého míchání upraveno pH na 5,7 pomocí KOH. Ve druhé kádince bylo smícháno požadované množství agarů a destilované vody. Do třetí kádinky bylo přidáno pouze požadované množství destilované vody. Následně byly všechny tři kádinky umístěny do mikrovlnné trouby na přibližně pět minut dokud nezačal agar vřít, aby došlo k rozpuštění agarů. Poté byl obsah všech tří kádinek smíchán dohromady a rozlit do Erlenmeyerových baněk po cca 30 ml do každé. Baňky byly následně uzavřeny hliníkovou fólií, popsány a vloženy do autoclavu na režim 121°C a tlak 1,06 $kg \cdot cm^{-1}$.

Živné médium WPM bylo připraveno podobným způsobem z předem namíchaných roztoků podle tabulky (tabulka 1b).

Do živných médií je možné přimíchat růstový regulátor, v našem případě byly použita média bez přidání hormonů a s přidáním 6-benzylaminopurinu (BAP) v koncentraci 1 $mg \cdot l^{-1}$, který byl přidán do roztoku před úpravou pH.

4.2 Založení kultury břízy karelské

Biologický materiál pro založení kultury břízy karelské byl odebrán z větví dvou stromů z lokality Truba u Kostelce nad Černými Lesy. Stromy byly vypěstovány Erichem Václavem jako roubovanci v roce 1962.

Byly provedeny tři různé odběry pupenů.

Odběr č. 1 pro zavedení kultury

Odběr byl proveden 5.4. a z každého stromu bylo odebráno po deseti pupenech. Pupeny jednoho stromu byly označeny jako KL a pupeny z druhého stromu jako KP. Poté byly v laboratorním prostředí odstraněny vnější šupiny pupenů. Následně byly pupeny opláchnuty destilovanou vodou s kapkou Tweenu 20. Dalším krokem byla sterilizace pupenů pomocí chloridu rtuťnatého ($HgCl_2$) naředěného na koncentraci 0.05%. Sterilizace probíhala po dobu 4 minut. Po sterilizaci následovala pasáž na živné médium MS bez přidání hormonů, která probíhala ve flow-boxu.

Odběr č. 2 pro zavedení kultury

Odběr byl proveden 26.4. a z každého stromu bylo odebráno po sedmi pupenech. A po odstranění vnějších šupin, byla provedená sterilizace pomocí chloridu rtuťnatého ($HgCl_2$) naředěného na koncentraci 0.05%. Tentokrát, z důvodů velkého množství kontaminace kultur z 1 pokusu zavádění kultur, byla doba sterilizace prodloužená na 5 minut. Po sterilizaci následovala pasáž po třech pupenech z obou stromů na živné médium MS bez hormonů a zbylé pupeny na živné médium MS s přidáním růstového regulátoru BAP. Pasáž probíhala ve flow-boxu. Každé dva týdny byl explantát přenesen na čerstvé médium stejného složení.

Odběr č. 3 pro zavedení kultury

Odběr byl proveden 10.5.. Při třetím pokusu byl použit stejný způsob sterilizace, jako ve druhém pokusu. Z každého stromu bylo odebráno po osmi pupenech. Dva z každého stromu byly umístěné na živné médium MS bez hormonů, dva na živné médium MS s přidáním růstového regulátoru BAP, dva na živné médium WPM bez hormonů a dva na živné médium s přidáním růstového regulátoru BAP. Každé dva týdny byl explantát přenesen na čerstvé médium stejného složení.

Tabulka 1: Složení MS a WPM medií

(a) MS médium		(b) WPM médium.	
Sloučenina	MS médium mg.l ⁻¹	Sloučenina	WPM médium mg.l ⁻¹
KNO ₃	1900	NH ₄ NO ₃	400
NH ₄ NO ₃	1650	CaCl ₂ · 2H ₂ O	96
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	556
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	K ₂ SO ₄	990
KH ₂ PO ₄	170	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3	KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3
H ₃ BO ₃	6,2	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
KI	0,8	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,02	Thiamine HCl	1,0
Thiamine HCl	1,0	Nicotinic acid	0,5
Nicotinic acid	0,5	Pyridoxine HCl	0,5
Pyridoxine HCl	0,5	Myo-Inositol	100
Myo-Inositol	100	Sacharóza	30 000
Sacharóza	30 000	Agar	8 000
Agar	8 000		

5 Výsledky

Při založení kultury byl sledován vliv sterilizace na kontaminaci a stupeň mortality explantátů v průběhu času.

Odběr č. 1. Výsledky sterilizace a iniciace tvorby prýtů

Sterilizace pupenů, odebraných 5.4., byla neúspěšná. Ukázalo se, že sterilizace chlornanem rtuťnatým ($HgCl_2$) po dobu čtyř minut je zcela nedostatečná. Množství kontaminace po dvou týdnech bylo téměř 100%.

Odběr č. 2. Výsledky sterilizace a iniciace tvorby prýtů

Sterilizace pupenů, odebraných 26.4., byla úspěšná. Po čtrnácti dnech nebyla zjištěna žádná kontaminace, ale zbyli pouze tři životaschopní jedinci. Po dvou měsících zbyly pouze dva klony ze stejného stromu. V průběhu mikropropagace docházelo k sekundárním kontaminacím jak je vidět z tabulky 2. V tomto sázení se nejvíce prokázalo použití média MS s přidáním růstového regulátoru BAP. Po dalších čtyřech měsících se podařilo z jednoho klonu reprodukovat devět jedinců.

Tabulka 2: Počet prorůstajících pupenů v čase a na konkrétním médiu

Klon	26.IV	10.V	22.V	07.VI	21.VI	02.VII	20.VII	02.VIII	24.VIII	05.X
KP 2 MS	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KP 2 MS+BAP	4	1	1	3	2	4	3	4	5	9
KL 2 MS	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
KL 2 MS+BAP	4	1	1	2	0	0	0	0	0	0

Odběr č. 3. Výsledky sterilizace a iniciace tvorby prýtů

Úspěšnost sterilizace pupenů, odebraných 10.5., byla 56%, ale po pěti měsících se podařilo vypěstovat pouze tři klony. V tomto sázení se ukázalo, že explantáty nejlépe rostly v mediích s přidáním růstového regulátoru BAP, kdy vykazovaly větší počet prýtů a větší vzrůst. Výsledky třetího sázení jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Počet prorůstajících pupenů v čase a na konkrétním médiu

Klon	10.V	22.V	07.VI	21.VI	02.VII	20.VII	02.VIII	24.VIII	05.X
KP 3 MS	2	2	0	0	0	0	0	0	0
KP 3 MS+BAP	2	0	0	0	0	0	0	0	0
KP 3 WPM	2	0	0	0	0	0	0	0	0
KP3 WPM+BAP	2	2	1	0	0	0	0	0	0
KL 3 MS	2	2	1	0	0	0	0	0	0
KL 3 MS+BAP	2	1	1	2	3	1	0	0	0
KL 3 WPM	2	2	0	0	0	0	0	0	0
KL 3 WPM+BAP	2	2	3	2	4	3	2	1	3



Obrázek 6: Kultura břízy karelské po pěti měsících od zavedení (foto autora)



Obrázek 7: Namnožené explantáty z jednoho klonu po šesti měsících od zavedení(foto autora)

6 Diskuse

Bylo již vypracováno mnoho metodik zabývajících se problematikou mikropropagace rodu *Betula*. Tyto metodiky však nejsou jednotné. Tento fakt je způsoben tím, že úspěšná mikropropagace není závislá pouze na kultivačních podmínkách, ale také i na dalších faktorech, kterými jsou například: doba sběru materiálu z dárcovského stromu, jeho stáří a fyziologická stav, způsob sterilizace a preparace explantátů (Máchová a kol., 2012) .

Výchozím materiálem pro založení kultury rodu *Betula* lze použít pupeny, části listů a výhonů. Výhodou tohoto způsobu rozmnožování je to, že množství odebraného materiálu je minimální a dárcovský strom zůstává nepoškozen.

Pro založení kultury byly v této práci použity pupeny, odebrané ze dvou stromů v dubnu a květnu. Celkový počet odebraných pupenů činil 25 kusů. V jiných pracích se používá pro založení kultury průměrně 30 pupenů (Novotný a kol., 2008 - Máchová a kol., 2012).

Při sterilizaci pupenů břízy karelské se ukázalo, že chlorid rtuťnatý v koncentraci 0,05% je neúčinný při aplikační době 4 minuty, ale jako dostačující při aplikaci 5 minut. Vetchinnikova experimentální metodou prokázala jako nejúčinnější způsob sterilizace pupenů břízy karelské použití chloridu rtuťnatého v koncentraci 0,1% s aplikací po dobu 3 minut. (Vetchinnikova, 2008).

Pro iniciaci organogeneze byly v této práci použita média MS a WPM s přidáním a bez přidání růstového regulátoru BAP v koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V této práci nebylo statisticky prokázáno které médium je vhodnější pro iniciaci organogeneze, ale bylo prokázáno, že rostliny lépe rostly v médiích do kterých byl přidán růstový hormon BAP. Podle Häggmana (Häggman a kol., 2007) se ukázalo jako úspěšné pro druh *Betula pendula* použití média WPM s přidáním $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP

v kombinaci s NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Vetchinnikova u druhu *Betula pendula* var. *carelica* Merkl. zkoumala úspěšnost rozmnožování na MS médiu s různými koncentracemi BAP, sacharózy a inositolu. Při trojnásobně zvýšené koncentraci BAP se prokázalo, že toto překročení optimální hodnoty vede k opačnému efektu, jehož důsledkem je zpomalený růst explantátu. Živné médium, které obsahovalo menší koncentraci inositolu, se prokázalo jako neúčinné u explantátů, které byli odebrané z nekříženého dárcovského stromu břízy karelské, ale současně prokázalo nejlepší výsledky růstu a vývoje u explantátů získaných z kříženého dárcovského stromu (Vetchinnikova, 2005).

Z toho vyplývá, že růst kultury v in vitro podmínkách nezávisí jen na složení živného média, ale do značné míry na původů klonů.

7 Závěr

Pokud chceme zachovat genofond břízy karelské je nezbytné použití vegetativních metod rozmnožování. Tyto metody nám zaručují vypěstování identického jedince, což při generativním množení není vždy zaručené. Nejlepší a nejrychlejší metoda je mikropropagace *in vitro*.

Z tohoto důvodu jsme se v této práci zabývali problémem vegetativního rozmnožování rodu *Betula* a pokoušeli jsme se o založení kultury břízy karelské (*Betula pendula* var. *carelica* Merkl.) metodou *in vitro*.

Pro založení kultury byly použity pupeny ze dvou stromů starých 57 let z lokality Truba u Kostelce nad Černými lesy. K jejich sterilizaci byl použit chlorid rtuťnatý (HgCl_2) v koncentraci 0,05%. Z výsledků pokusů o zavedení kultury bylo zjištěno, že optimální doba aplikace je 5 minut.

Mezi kultivačními médii WPM a MS nebyly zjištěny velké rozdíly, ale bylo zřejmé, že přidáním růstového regulátoru BAP byla zvýšena schopnost růstu a vývoje explantátů.

Metoda mikropropagace *in vitro* se jeví jako velmi vhodná ke množení břízy karelské a zachování jejího genofondu. Z tohoto důvodu by byl vhodný další výzkum dané problematiky a testování různých koncentrací růstových hormonů a vyzkoušení různých kultivačních podmínek.

Literatura

- [1] *Prekrasnyye mutanty* [online]. 2014. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <http://www.vokrugsveta.ru/article/196433/>.
- [2] *Zhivoy les* [online]. 2014. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <http://zivoyles.ru/articles/poroda-nomera/bereza/>.
- [3] *Obsledovaniye populyacii karelskoy berezy...* [online]. 2005. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <http://kizhi.karelia.ru/>.
- [4] *Bereza karelskaya* [online]. 2015. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://bumans.ru/porody/bereza-karelskaya/>.
- [5] AHUJA, M. R. *Micropropagation of Woody Plants*. Forestry Sciences. Springer Netherlands, 2013. ISBN 9789401581165.
- [6] BURIÁNEK, V. – NOVOTNÝ, P. – FRÝDL, J. *Metodická příručka k určování domácích druhů bříz: certifikovaná metodika*. Strnady : Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, 2014. ISBN 978-80-7417-081-2.
- [7] CHALUPA, V. Vegetativní rozmnožování dubu (*Quercus robur*) buku (*Fagus sylvatica*) a lípy (*Tilia cordata*) řízkami a explantátovými kulturami. *Lesnictví*. 1990, , 36, s. 589–598.
- [8] CHALUPA, V. In vitro propagation of birch (*Betula verrucosa* EHRH). *Biologia Plantarum*. 1981, 23, 6, s. 472–474.
- [9] CHALUPA, V. European hardwoods. In *Cell and tissue culture in forestry*. Springer, 1987. s. 224–246.
- [10] GIRGŽDE, E. – SAMSONE, I. Effect of cytokinins on shoot proliferation of silver birch (*Betula pendula*) in tissue culture. *Environmental and Experimental Biology*. 01 2017, 15, s. 1–5. doi: 10.22364/eeb.15.01.
- [11] HÄGGMAN, H. – SUTELA, S. – WELANDER, M. Micropropagation of *Betula pendula* Roth including genetically modified material. In *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, 2007. s. 153–162.

- [12] ILIEV, I. – SCALTSOYIANNES, A. – TSAKTSIRA, M. – GAJDOSOVA, A. Micropropagation of *Betula pendula* Roth cultivars by adventitious shoot induction from leaf callus. In *I International Symposium on Woody Ornamentals of the Temperate Zone 885*, s. 161–173, 2008.
- [13] JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*. 2005, 47, 2-3, s. 91–110.
- [14] KARPOVA, E. – A., K. *Karelskaya bereza*. *Lesprominform* [online]. 2013. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://lesprominform.ru/jarticles.html?id=3276>.
- [15] KUZNETSOVA, L. D. Issledovaniye vozdeystviya lazernogo izluchaniya na razvitiye cherenkov drevesnyh rasteniy. *Lesnoy vestnik/Forestry bulletin*. 2000, , 2, s. 140–141.
- [16] MÁCHOVÁ, P. – CVRČKOVÁ, H. – MALÁ, J. Mikropropagace břízy trpasličí. *Zprávy lesnického výzkumu*. 2012, 57, 3, s. 202–206.
- [17] NIL. *O lesích. Zastoupení skupin dřevin v ČR* [online]. 2015. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <http://www.czechforest.cz/informace-o-lesich>.
- [18] NOVOTNÝ, P. – CVRČKOVÁ, H. – MÁCHOVÁ, P. – MALÁ, J. Množení tisů červeného (*taxus baccata* l.) in vitro jako možný příspěvek k záchraně a reprodukci genetických zdrojů této dřeviny v ČR. *Zprávy lesnického výzkumu*. 2008, 53, 2, s. 110–115.
- [19] SPOHN, M. – SPOHN, R. *Stromy Evropy*. Ševčík a Beta-Dobrovský, 2013. ISBN 978-80-7291-227-8.
- [20] VETCHINNIKOVA, L. V. Karelskaya bereza: areal, raznoobrazie, ohrana i perspektivy vosproizvodstva. *Trudy Karelskogo nauchnogo centra Rossiyskoy akademii nauk*. 2004, , 6, s. 3–16.
- [21] VETCHINNIKOVA, L. V. – TITOV, A. F. *Karelian Birch and Other Rare Representatives of the Genus Betula L.* Moscow: Nauka, 2005. ISBN 5-02-033684-X.

- [22] VETCHINNIKOVA, L. V. – VETCHINNIKOVA, T. Y. – USTINOVA, A. V. Klonalnoye mikrorazmnozheniye karelskoy berezy v Karelii. *Resources and Technology*. 2005, 5, s. 17–22.
- [23] VETCHINNIKOVA, L. V. – TITOV, A. F. – TOPCHIEVA, L. V. – RENDAKOV, N. L. Otsenka geneticheskogo raznoobraziya populyatsiy karelskoy berezy v Karelii s pomoschy mikrosatellitnyh markerov. *Ekologicheskaya genetika*. 2012, 10, 1, s. 34–37.