

Spolupráca v *ex situ* konzervácii chránených druhov drevín medzi Slovenskom a Taiwanom: identifikácia najefektívnejšej cesty propagácie

Cooperation between Slovakia and Taiwan in *ex situ* conservation of protected woody plant species: identification of the most efficient way of propagation

PETER FERUS¹, DOMINIKA KOŠÚTOVÁ¹, ADRIÁN ORAVEC¹, JANA KONÔPKOVÁ¹, PETER HOŤKA¹, HUAN-YU LIN², TSUNG-YU HUNG², MIN-CHUN LIAO², SU-WEI FAN² & GENE-SHENG TUNG²

¹Arborétum Mlyňany, Ústav ekológie lesa SAV v. v. i., Vieska nad Žitavou 178, 95152 Slepčany, Slovensko, peter.ferus@savba.sk

²Department of Forestry and Natural Resources, National Ilan University, Shennong Rd. 1, Yilan City, 260 Yilan County, Taiwan (R.O.C.)

³Botanical Garden Division, Taiwan Forestry Research Institute, San-Yuan St. 67, 100 Taipei, Taiwan (R.O.C.)

Abstract: Efficiency of different propagation ways (seeds, stem cuttings, *in vitro* technique) in 6 protected woody plant species were tested in the framework of a bilateral project between Slovakia and Taiwan. *Crataegus lindmanii*, one of the species from the Slovak Red list (EN), exhibited deep seed dormancy (still no results). Germination of *Rhododendron tomentosum* (EN) seeds was ca. 60% and the highest cuttings rooting efficiency was found for autumnal harvest, in Klassman TS Steckmedium substrate, without rooting stimulator (Rhizopon AA) application (57%). *In vitro* propagation was less successful (the highest culture initiation rate was of 37%). Germination of *Rosa arvensis* (VU) achenes was also low (2%) and the best results in the rooting of cuttings were obtained for autumnal harvest, with addition of the stimulator (25%). The highest *in vitro* culture initiation success was around 60% (but the stem morphogenesis was slow). The Taiwanese species – *Citrus taiwanica* (CR), *Erythrina variegata* (EN) and *Polyanthia liukiensis* (CR) showed extraordinary high seed germinability (90–100%) and *Erythrina variegata* also cuttings rooting efficiency (95%). These results are discussed with regard to propagation way duration/costs and regenerant fitness.

Key words: classical propagation methods, *ex situ* conservation, *in vitro* technology, protected woody plant species.

Úvod

Odhaduje sa, že súčasná miera vymierania druhov je 100 až 1000-krát vyššia ako ich prirodzená strata (Chivian & Bernstein 2010). Preto je – viac ako kedykoľvek predtým – namieste zväčšenie úsilia o ich záchranu. Na začiatku je nevyhnutné vymedzenie predmetu ochrany. Zoznam ohrozených, vzácnych, zraniteľných alebo pre spoločnosť inak významných rastlín bol na Slovensku definovaný Ministerstvom životného prostredia SR vo všeobecne záväznej

vyhláske č. 24/2003. Okrem neho existuje Červený zoznam, ktorý zaraďuje rastlinné druhy do kategórií na základe ich ohrozenia a zraniteľnosti. Posledné, piate vydanie Červeného zoznamu výtrusných a kvitnúcich rastlín Slovenska zahŕňa 1 218 taxónov (Eliáš jun. et al. 2015). Na Taiwane upravuje nakladanie s chránenými druhmi Zákon o ochrane divo žijúcich organizmov (The Wildlife Conservation Act) z roku 2009 obsahujúci Zoznam chránených druhov a GIS Databázu prírodných zdrojov s ekologickým vymedzením. Navyše, na báze kritérií Medzinárodnej únie pre ochranu prírody (IUNC) vznikol Červený zoznam ohrozených rastlín na Taiwane s 5 188 druhmi (Editorial Committee of the Red List of Taiwan Plants 2017).

Na Slovensku sa ochranárske úsilie sústreďí predovšetkým na komplexnú *in situ* konzerváciu druhov. V nedávnej minulosti sa však objavilo aj niekoľko príkladov *ex situ* ochrany rastlín. Zaujímavý experiment realizovala asi pred 30 rokmi Botanická záhrada v spolupráci s Katedrou botaniky Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre. Jeho výsledkom mal byť umelý biotop mokrade zahŕňajúci vzácné druhy *Carex echinata*, *Carex flava*, *Carex lepidocarpa*, *Eriophorum angustifolium*, *Tephrosieris crispa* a i., ohrozené výstavbou vodnej nádrže Turček (<https://bz.uniag.sk/sk/veda-a-vyskum/>). Ambíciou vytvoriť zbierku chránených druhov drevín ako súčasť vznikajúceho Oddelenia pôvodnej slovenskej dendroflóry malo v tomto období aj Arborétum Mlyňany (Tomaško 1995). V rokoch 2007 – 2013 riešila Štátna ochrana prírody (ŠOP) projekt záchrany dvoch kriticky ohrozených xerothermných druhov – *Alkanna tinctoria* a *Colchicum arenarium*, financovaný z európskeho Operačného programu Životné prostredie (Mútnanová & Ulrych 2010). Dlhodobú aktivitu v oblasti *ex situ* ochrany vzácných tatranských druhov flóry pozorujeme v Múzeu Tatranského národného parku (<https://www.tanap.sk/botanicka-zahrada-expozicia-tatranskej-prirody-etp/>). Naši projektoví partneri z Taiwanu však v tejto oblasti oplývajú bohatými skúsenosťami. Ochrannárske aktivity realizujú nielen v botanických inštitúciách, ale aj komunitách pôvodných obyvateľov, farmárov, či na školách. Spolupracujú s množstvom štátnych, regionálnych a mimovládnych organizácií a angažujú početných dobrovoľníkov (Tung et al. 2020, Chao et al. 2023).

Relatívne zriedkavé využitie *ex situ* prístupu v ochrane flóry Slovenska spolu s bohatými skúsenosťami v tejto oblasti na strane nášho dlhoročného taiwanského partnera nás viedlo k návrhu bilaterálneho projektu APVV SK-TW-21-0003 „Integrovaný prístup botanických záhrad a ‘občianskej vedy’ pre záchrany ohrozených druhov rastlín“. Jeho cieľom bolo v prvej fáze zhodnotiť efektivitu dostupných množiteľských prístupov (semenami, stonkovými

rezkami a *in vitro* technológiami) troch slovenských chránených druhov drevín – *Crataegus lindmanii* Hrabětová (EN), *Rhododendron tomentosum* Harmaja (EN) a *Rosa arvensis* Huds. (VU) a výberu troch taiwanských druhov – *Citrus taiwanica* Tanaka & Shimada (CR), *Erythrina variegata* L. (EN) a *Polyalthia liukiuensis* Hatus. (CR).

Materiál a metodika

Slovenská strana

Odber množiteľského materiálu

Vzhľadom k nízkemu počtu známych jedincov hlohu Lindmanovho (*Crataegus lindmanii* Hrabětová) na Slovensku bol zber plodov spojený s overením literárnych dát (Baranec 1986, Štogaňák 1993, Klíč 2009) o jeho rozšírení (kľúčový determinatívny znak je morfológia plodu). Napriek prieskumu viacerých lokalít s potenciálnym výskytom v Pieninskom národnom parku, resp. Levočských vrchoch, boli 6. 10. a 21. 11. 2022 pozberané plody spolu len z troch jedincov. Pokusy o množenie hlohov vegetatívnym spôsobom popisuje Walter (2011) ako zbytočné, preto sme odber rezkov/explantátov do *in vitro* kultúry nerealizovali. Vychádzajúc z menovanej príručky množiteľa okrasných drevín sme rododendron plstnatý (*Rhododendron tomentosum* Harmaja) rezkovali (aj pre účely *in vitro* kultivácie) na Klinskom rašelinisku (CHKO Horná Orava) začiatkom leta (7. 7. 2022) a na rašelinisku Medzi bormi (TANAP) na jeseň (13. 10. 2022). V tomto termíne sme pozberali aj jeho plody. Rezky ruže roľnej (*Rosa arvensis* Huds.) do klasickej aj *in vitro* kultúry sme odoberali v Zoborských vrchoch (CHKO Ponitrie) tiež začiatkom leta (1. 7. 2022) a na jeseň (14. 11. 2022). V očakávaní lepšej klíčivosti sme plody obrali polozrelé dňa 27. 9. 2022. Rezky, explantáty a plody pochádzali aspoň z 3 jedincov.

Založenie klasickej kultúr

Rezky rododendronu plstnatého vylomené z materského kra sme zavinuli do navlhčenej papierovej utierky a v plastovom vrecku umiestnili do prenosnej chladničky. V laboratórnych podmienkach sme ich bezodkladne, buď s ošetrením spodnej časti rezu (zapichnutie do hĺbky 1 cm a mierne oklepanie) alebo bez ošetrenia, práškovým stimulátorom zakoreňovania Rhizopon AA (s 1 % obsahom kyseliny 3-indolylnaslovej, Rhizopon, Holandsko), napichali jednotlivito do štvorhranných plastových nádob (strana 6 cm), naplnených litovskou rašelinou Klasmann Baltica, resp. substrátom Klasmann TS Steckmedium (Klasmann-Deilmann GmbH, Nemecko). Nádobu sme po 4 ks zľahka uzavreli do priehľadných plastových vreciek a umiestnili do kultivačnej komory s umelým osvetlením Osram L36W/840 Lumilux® Cool White s intenzitou $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a fotoperiódou 16/8 (letný odber), resp. 12/12 h (jesenný odber), s teplotou 28/23 °C, resp. 22/17 °C a relatívnu vlhkosť 50/60 % resp. 60/70 %. Na každý variant pripadalo 6 – 8 nádob. Substrát v nádobách sa udržoval v primerane vlhkom stave. Pri ruži roľnej sme postupovali podobne, rozdiel bol len v príprave rezkov (strihanie na segmenty s 2 uzlami) a v substráte (Substrát pre ruže, Agro CS a. s., Česká republika). Semená hlohu Lindmanovho a ruže roľnej sme po izolácii zmiešali s jemným štrkom, zmes sme navlhčili a v plastových vreckách umiestnili do chladu (4 °C) a tmy na stratifikáciu (Walter 2011). Koncom marca sme vrecká vybrali z chladničky a v tme sme nechali semená klíčiť. Po 4 týždňoch sme nevyklíčené semená vrátili na stratifikáciu do chladničky. V prípade rododendronu plstnatého sme semená stratifikovali tak, že sme tobolky v plas-

tových vreckách umiestnili na 2 týždne do chladničky. Po izolácii sme semená vysiali do 25 cm Petriho misiek vystlaných 2 mm hrubou buničinou navlhčenou destilovanou vodou (Kolmanová 1997) a preniesli do kultivačnej komory popísanej vyššie. Vyhodnotenie úspešnosti zakoreňovania rezkov sme uskutočnili po týždňoch (ruža roľná), resp. mesiacoch (rododendron plstnatý), kedy sa zastavilo odumieranie rezkov a pre vytvorený koreňový systém sa jedince už nedali zo substrátu vytiahnuť. Klíčivosť semien študovaných druhov sme vyhodnotili po mesiaci od vysiatia/predpokladaného konca procesu stratifikácie.

Založenie in vitro kultúr

Pletivové kultúry rododendronu plstnatého a ruže roľnej sme založili z apikálnych a axilárnych púčikov izolovaných z donorových rastlín. Získané výhonky sme najskôr narezali a umyli pod tečúcou vodou s pridaním detergentu za účelom odstránenia hrubších nečistôt. Následne sme v priestoroch laminárneho boxu primárne explantáty sterilizovali – najskôr ponorením na 1 min do 1 % roztoku chlórnanu sodného (NaClO), potom ponorením na 5 min do 0,3 % ľahkého aga-

Tab. 1. Kultivačné médiá pre iniciáciu primárnych kultúr rododendronu plstnatého (*Rhododendron tomentosum* Harmaja) a ruže roľnej (*Rosa arvensis* Huds.). Skratky: SH – médium Shenk & Hildebrandt (1972), WPM – woody plant medium, Lloyd & McCown (1981), S₂ – médium Standardi & Catalano (1985), MS – médium Murashige & Skoog (1962), BAP – benzylaminopurin, TDZ – thidiazuron, 2iP – N⁶-(Δ^2 -izopentenyl) adenín, NAA – kyselina naftyloctová, IAA – kyselina indolyl-3-octová.

Tab. 1. Cultivation media for initiation of *Rhododendron tomentosum* Harmaja and *Rosa arvensis* Huds. primary cultures. Abbreviations: SH – Shenk & Hildebrandt (1972) medium, WPM – woody plant medium, Lloyd & McCown (1981), S₂ – Standardi & Catalano (1985) medium, MS – Murashige & Skoog (1962) medium, BAP – benzylaminopurine, TDZ – thidiazuron, 2iP – N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenine, NAA – naphthylacetic acid, IAA – indolyl-3-acetic acid.

Druh	Médium	Variant	Rastové regulátory [µM]				
			BAP	TDZ	2iP	NAA	IAA
<i>Rhododendron tomentosum</i>	SH	RTI1	-	1.0	-	-	-
		RTI2	-	1.0	9,64	-	-
	WPM	RTI3	2,22	-	-	0,54	-
		S2	RTI4	4,44	-	-	0,54
<i>Rosa arvensis</i>	MS	RAI1	4,44	-	-	-	0,57
		RAI2	8,88	-	-	-	0,57
		RAI3	4,44	-	-	0,54	-
		RAI4	8,88	-	-	0,54	-

rového roztoku s 2,5 % koncentráciou PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, USA) a následne sme explantáty dôkladne opláchli v deionizovanej vode (3 x 5 min). Takto pripravené primárne explantáty sme opäť narezali a umiestnili na pripravené iniciačné kultivačné médiá (tab. 1). Pre iniciáciu primárnych kultúr rododendronu plstnatého sme použili modifikované SH médium (sacharóza 30 g l⁻¹, agar 6,5 g l⁻¹, Shenk & Hildebrandt 1972), modifikované WPM médium (sacharóza 30 g l⁻¹, agar 7 g l⁻¹, Lloyd & McCown 1981) a modifikované S₂ médium (sacharóza 20 g l⁻¹, agar 7 g l⁻¹, Standardi & Catalano 1985), pH médií sme upravili na hodnotu 5,2. Do všetkých variantov iniciačných médií sme pridali PPM (0,1 %). V prípade ruže roľnej sme ako iniciačné médiá použili varianty základného kultivačného média MS (sacharóza 30 g l⁻¹, agar 8 g l⁻¹, Murashige & Skoog 1962) s pridaním rastových regulátorov, pH médií sme upravili na 5,8. Na jednotlivé varianty médií pripadalo 8 (rododendron), resp. 6 (ruža) explantátov.

Nádoby s primárnymi kultúrami sme umiestnili do kultivačnej komory s kontrolovanými podmienkami – umelým osvetlením Phillips MASTER TL-D Super 80 36W/840 s intenzitou 50 μmol s⁻¹ m⁻², fotoperiodou 16/8 a teplotou 25/20 °C. Po 6 týždňoch sme vydiferencované výhonky narezali a umiestnili na multiplikačné kultivačné médiá (tab. 2). Pre multiplikáciu rododendronu plstnatého sme zvolili dva varianty modifikovaného SH média (Shenk & Hildebrandt 1972), pre multiplikáciu ruže roľnej sme použili jeden variant základného MS média (Murashige & Skoog 1962). Počet explantátov na variant média bol oproti iniciácii polovičný. Transfer kultúr na čerstvé multiplikačné médiá sme realizovali každých 8 týždňov.

Analýza rastu

Za účelom odhadu efektívnosti množiteľského prístupu sme 26. apríla 2023 vykonali pri výpeskoch rastovú analýzu. Hodnotila sa celková dĺžka stoniek (hlavná + bočné) rezkovančov, semenáčov (jesenný zber 2022) a regenerantov (letný odber 2022) rododendronu plstnatého a ruže roľnej. Priemerné hodnoty pre jednotlivé cesty množenia sme vypočítali zo všetkých dostupných jedincov. Tab. 2. Multiplikačné kultivačné médiá pre rododendron plstnatý (*Rhododendron tomentosum* Harmaja) a ružu roľnú (*Rosa arvensis* Huds.). Skratky: SH – médium Shenk & Hildebrandt (1972), MS – médium Murashige & Skoog (1962), BAP – benzylaminopurín, TDZ – thidiazuron, 2iP – N⁶-(Δ²-izopentenyl) adenín, NAA – kyselina naftyloctová, IAA – kyselina indolyl-3-octová.

Tab. 2. Tissue culture multiplication media for *Rhododendron tomentosum* Harmaja and *Rosa arvensis* Huds. cultures. Abbreviations: SH – Shenk & Hildebrandt (1972) medium, MS – Murashige & Skoog (1962) medium, BAP – benzylaminopurine, TDZ – thidiazuron, 2iP – N⁶-(Δ²-isopentenyl) adenine, NAA – naphthylacetic acid, IAA – indolyl-3-acetic acid.

Druh	Médium	Variant	Rastové regulátory [μM]				
			BAP	TDZ	2iP	NAA	IAA
<i>Rhododendron tomentosum</i>	SH	RTM1	-	1,0	-	-	-
		RTM2	-	1,0	9,64	-	-
<i>Rosa arvensis</i>	MS	RAM1	4,44	-	-	-	0,57

Stanovenie koncentrácie chlorofylov

K určeniu kondičného stavu semenačov/regenerantov ruže roľnej namnožených jednotlivými spôsobmi množenia (nažky, rezky: jesenný odber; *in vitro*: letný odber) sme použili koncentráciu chlorofylov v listoch (Lichtenthaler 1987), ktorá má vzťah k schopnosti rastliny akumulovať pôdny dusík (Vaněk & Ložek 2013). Rastliny dopestované z rezkov či semien sme do doby analýzy (18. 8. 2023) kultivovali v externých podmienkach arboréta pod tieniacou (40 %) sieťkou Bradas (Poľsko) v plastových nádobách (dĺžka hrany 11 cm) so substrátom pre ruže (Agro CS a. s., Česká republika). Regeneranty ruže z *in vitro* kultúry sme pestovali na multiplikačnom médiu v kontrolovaných podmienkach laboratória.

Segmenty expandovaných vrcholových listov sme homogenizovali za prítomnosti morského piesku, $MgCO_3$ a 100 % acetónu. Po jeho vyparení sme do homogenátu pridali 80 % acetón a zmes prefiltrovali za pomoci vákuovej pumpy. Následne sme určili absorbanciu filtrátu pri vlnových dĺžkach 663 nm (pre chlorofyl a) a 647 nm (pre chlorofyl b; Jasco V-630, Jasco Inc. Japan). Výsledky sú priemerom analýz 2 jedincov za každý spôsob množenia.

Taiwanská strana

Množenie klasickými metódami

Plody vybraných druhov – *Citrus taiwanica* Tanaka & Shimada, *Erythrina variegata* L. a *Polyalthia liukiuensis* Hatus., sme pozbierali v prirodzených podmienkach výskytu (Orchideový ostrov), resp. v zbierkach Taipejskej botanickej záhrady, v auguste 2020 – 2022. Po izolácii sme semená *Citrus taiwanica* vysiali do záhradného substrátu a kultivovali v skleníku s automatickou závlahou (2× denne) pri teplote cca. 26 °C a vlhkosti vzduchu 80 % (Vyššia škola v Lanyu, Orchideový ostrov, resp. škôlky Taipejskej botanickej záhrady). Po 2 týždňoch sa vyhodnotila ich kľúčivosť. Semená *Polyalthia liukiuensis* sa umiestnili do vlhkého machu a v prípade *Erythrina variegata* bolo nutné žiletkou narezané semená nechať imbibať po dobu 2 týždňov. Klíčence sme potom vysadili do záhradného substrátu. Inak boli podmienky kultivácie totožné s tými pre *Citrus taiwanica*. Druh *Erythrina variegata* sme množili aj rezkami. 20-centimetrové segmenty výhonkov sme odobrali na jar (vyraté), resp. v letnom období (polovyraté), napichali do piesku a kultivovali pri teplote 26 °C a vlhkosti vzduchu 90 % v skleníku s pravidelnou závlahou po dobu 30 dní. Úroveň úspešnosti zakorenenia je priemerom z oboch termínov.

Výsledky a diskusia

Úspešnosť rezkovania v letnom období bola neporovnateľne nižšia než na jeseň – či u rododendronu alebo ruže (tab. 3). Pri jesennom rezkovaní rododendronu bola dosiahnutá najvyššia úspešnosť vo variante s pôdnym substrátom Klasmann TS Steckmedium bez aplikácie stimulátora Rhizoapon AA (57 %). Použitie čistej rašeliny malo za následok mierne zníženie zakorenenia (50 %), a ďalšie zníženie úspešnosti spôsobilo použitie stimulátora (úspešnosť 38 %). Maximálny úspech pri jesennom rezkovaní ruže bol oproti rododendronu len polovičný (25 %) a bol dosiahnutý naopak po aplikácii stimulátora.

Rezkovanie v letnom období sa spája s rizikom nepriaznivého účinku sucha, ktoré v materskej rastline stimuluje tvorbu inhibítorov rastu obmedzujúcich

Tab. 3. Úspešnosť zakoreňovania rezkov (%) rododendronu plstnatého (*Rhododendron tomentosum* Harmaja) a ruže roľnej (*Rosa arvensis* Huds.) v závislosti od termínu odberu rezkov, pôdneho substrátu a aplikácie stimulantu zakoreňovania. Klíčivosť semien rododendronu bola 60 % a nažiek ruže 2 %. Skratky: R – rašelina, K – Klasmann TS Steckmedium, Rhiz – Rhizopon AA.

Tab. 3. Rooting efficiency of cuttings (%) in *Rhododendron tomentosum* Harmaja and *Rosa arvensis* Huds. as function of cuttings harvesting date, soil substrate and rooting stimulator application. *Rhododendron* and *Rosa* seed germinabilities were 60% and 2%, respectively. Abbreviations: R – peat, K – Klasmann TS Steckmedium substrate, Rhiz – Rhizopon AA stimulator.

Druh	Odber rezkov	Substrát/stimulátor					
		R -Rhiz	R +Rhiz	K -Rhiz	K +Rhiz	-Rhiz	+Rhiz
<i>Rhododendron tomentosum</i>	7. 7. 2022	0	0	0	0		
	13. 10. 2022	50	38	57	38		
<i>Rosa arvensis</i>	1. 7. 2022					17	0
	14. 11. 2022					13	25

zakoreňovanie (da Costa et al. 2013). To bol aj prípad extrémne suchého roku 2022, kedy bol počas prvého polroka takmer na celom území Slovenska zaznamenaný výrazný vlhový deficit (SHMÚ 2022). Prírodná rezervácia Klinské rašelinisko trpí navyše v minulosti vykonanými necitlivými zásahmi do hydrologického režimu na susedných pozemkoch (ŠOP SR 2023). Slabšie výsledky letného rezkovania teda nie sú prekvapením. Zaujímavý je fakt, že rododendron reagoval v jesennom rezkovaní lepšie na substrát Klasmann TS Steckmedium (s pH 5,5 –6,5) ako na rašelinu (s pH 4,0 – 4,5), ktorá je bežnou súčasťou biotopov s jeho výskytom (Šoltés et al. 2001). Reakcia pôdy v rašeliniskách však môže byť vyššia ako je reakcia výluhu čistej rašeliny. Príkladom je aj Klinské rašelinisko, kde Renčo & Murín (2012) zistili pH 4,9. Ako však vyplýva z našej predchádzajúcej štúdie (Ferus et al. 2017), podstatne významnejšia pre zakoreňovanie môže byť prítomnosť perlitu v substráte Klasmann TS Steckmedium, ktorá zabezpečuje jeho lepšie prevzdušnenie. V článku Ficko & Naeth (2021), venovanej zakoreňovaniu 7 arktických druhov krov, sa dozvedáme, že rododendron plstnatý pestovaný v substráte pozostávajúcom z rašeliny (50 %) a záhradnej zeminy (50 %), ktorý bol rezkovaný koncom júna, najlepšie zakoreňoval bez stimulantu, alebo pri použití 0,4 % IBA. Na druhej

strane, pri rezkovaní na jeseň najlepšie reagoval na 0,8 % koncentráciu IBA. Najvyššia miera zakorenenia sa však pohybovala iba na úrovni 30 %.

Pri genotypovej a fenotypovej charakterizácii belgických populácií ruže roľnej od autorov Vander Mijnsbrugge et al. (2010) bolo použité letné rezkovanie, no jeho úspešnosť nebola hodnotená.

Klíčivosť semien hlohu Lindmanovho nebolo možné analyzovať, keďže pol roka trvajúca stratifikácia sa javí ako nedostatočná. Veľmi slabé výsledky sme dosiahli aj pri klíčivosti nažiek ruže roľnej (2 %). Jackson a Blundell (1965) dospeli k 10 % klíčivosti bezprostredne po zbere nažiek. Odstránením perikarpu však narástla na 50 %, čo poukazuje aj na chemickú bázu dormancie. Naopak, rododendron plstnatý vykazoval 60% klíčivosť, ktorá je o 1/4 vyššia oproti pozorovaniam Kolmanovej (1997), zameraných na hodnotenie efektu termínu zberu semien ako aj vonkajších podmienok klíčenia.

V prípade *in vitro* rozmnožovania rododendronu plstnatého je množstvo dostupných literárnych údajov relatívne malé. Prvý ucelený protokol pre mikropropagáciu *R. tomentosum* spracovali Jesionek et al. (2016). Autori na iniciáciu primárnych kultúr použili ako primárne explantáty nodálne segmenty, axilárne púčiky a listy. My sme ako primárne explantáty zvolili apikálne a axilárne púčiky. Pre iniciáciu primárnych kultúr zvolili tri kultivačné médiá – modifikované SH (Shenk & Hildebrandt 1972), AR médium pre rododendrony (Anderson 1978) a WPM médium (Lloyd & McCown 1981). My sme pre ini-

Tab. 4. Úspešnosť iniciácie primárnych kultúr a multiplikácie pletivových kultúr rododendronu plstnatého (*Rhododendron tomentosum* Harmaja).

Tab. 4. Primary culture initiation and tissue culture multiplication success in *Rhododendron tomentosum* Harmaja.

Iniciácia		Multiplikácia	
Médium	Úspešnosť (%)	Médium	Úspešnosť (%)
RTI1	37	RTI1 → RTI1	> 90
		RTI1 → RTI2	> 75
RTI2	21	RTI2 → RTI2	> 90
		RTI2 → RTI1	> 75
RTI3	0	-	-
RTI4	0	-	-

ciáciu primárnych kultúr rododendronu plstnatého použili modifikované SH médium (Shenk & Hildebrandt 1972), modifikované WPM médium (Lloyd & McCown 1981) a modifikované S₂ médium (Standardi & Catalano 1985). Najlepšie výsledky iniciácie primárnych kultúr získali Jesionek et al. (2016) pri použití média SH (9,84 µM 2iP a 1,0 µM TDZ), s čím korešpondujú aj naše výsledky (primárne kultúry s úspešnosťou 20 – 35 % boli zistené len v prípade médií RTI1 a RTI2 (tab. 4)). U zvyšných dvoch iniciačných médií bol ich pokus o odvodenie primárnej kultúry neúspešný. V našom prípade po niekoľkých týždňoch kultivácie na iniciačných médiách došlo ku tvorbe kalusu, z ktorého boli následne diferencované nové výhonky. Rastový regulátor 2iP je často používaný pre mikropropagáciu rododendronov (Eeckhaut et al. 2010, Mao et al. 2011, Tomsone & Gertner 2003), avšak ako jediný rastový regulátor nie je v prípade rododendronu plstnatého schopný indukovať tvorbu nových výhonkov. TDZ je nevyhnutný pre indukciu výhonkov (Jesionek et al. 2016). Nami získané výsledky potvrdzujú tieto zistenia (primárne kultúry boli úspešné len na kultivačných médiách s obsahom TDZ (RTI1) alebo TDZ + 2iP (RTI2)). Na diferenciáciu nových výhonkov a ich následnú elongáciu sme opäť použili varianty SH média, už bez pridania PPM. Pri oboch variantoch sme dosiahli pomerne vysoké % úspešnosti multiplikácie > 90 % resp. > 75 %.

V uplynulých rokoch boli vytvorené protokoly pre *in vitro* rozmnožovanie rôznych druhov či kultivarov ruží. Mikropropagácia s využitím odlišných častí rastlín ako aj pochopenie špecifických požiadaviek na rôznych úrovniach mikropropagácie boli dôkladne popísané napríklad v práci Pati et al. (2006). Short et al. (1981) použili pre iniciáciu primárnych kultúr *R. arvensis* a *R. cooperi*

Tab. 5. Úspešnosť iniciácie primárnych kultúr a multiplikácie pletivových kultúr ruže roľnej (*Rosa arvensis* Huds.).

Tab. 5. Primary culture initiation and tissue culture multiplication success in *Rosa arvensis* Huds.

Iniciácia		Multiplikácia	
Médium	Úspešnosť [%]	Médium	Úspešnosť [%]
RI1	60	RI1 → RM1	83
RI2	40	RI2 → RM1	50
RI3	28	RI3 → RM1	0
RI4	57	RI4 → RM1	50

axilárne púčiky. V našom prípade boli použité na iniciáciu kultúry *R. arvensis* axilárne, ako aj apikálne púčiky. Najvhodnejším a zároveň najčastejšie používaným kultivačným médiom pre mikropropagáciu ruží je MS médium (Pati et al. 2006). My sme pre iniciáciu primárnych kultúr aj pre multiplikáciu využili tiež rôzne varianty MS média. Sacharóza (30 g l^{-1}) je najčastejším zdrojom uhlíka a energie (Pati et al. 2006) – pri našej práci sme tieto odporúčania dodržali. Kim et al. (2003) uvádzajú, že proliferácia výhonkov v podmienkach *in vitro* je významne ovplyvnená zastúpením cytokinínov ako hlavných rastových regulátorov, hoci nižšie koncentrácie auxínov alebo kyseliny gibberelovej sú tiež dôležité. Cytokinín benzylaminopurín (BAP) je najefektívnejším rastovým regulátorom pre proliferáciu výhonkov (Vijaya et al. 1991, Pati et al. 2005). Za najvyhovujúcejšiu koncentráciu BAP pre úspešnú iniciáciu primárnych kultúr a multiplikáciu rôznych druhov či kultivarov ruží považujú viacerí autori $8.88 \mu\text{M}$ (Ma et al. 1996, Attia et al. 2012, Afrin et al. 2022). My sme najvyššiu úspešnosť iniciácie primárnych kultúr (cca. 60 %, tab. 5) dosiahli pri použití médií RI1 ($4.44 \mu\text{M}$ BAP + $0.57 \mu\text{M}$ IAA) a RI4 ($8.88 \mu\text{M}$ BAP + $0.54 \mu\text{M}$ NAA). Na produkciu mnohonásobných výhonkov vo fáze multiplikácie dobre pôsobí prídavok auxínov. Viacerí autori (Vijaya et al. 1991, Pati et al. 2005) uvádzajú, že NAA je v tomto kontexte efektívnejší ako IAA resp. IBA. Naše predbežné výsledky sú však v rozpore s týmto tvrdením, nakoľko najlepšiu úroveň multiplikácie sme dosiahli po pridaní IAA do multiplikačného média (RM1).

In vitro prístup v porovnaní s klasickými prístupmi množenia (tab. 6) sa však v prípade rododendronu a ruže javí ako časovo a materiálne náročný, keďže za takmer 300 dní kultivácie boli dosiahnuté relatívne malé prírastky biomasy (zo zhluku kalusových buniek rododendronu sa vyformovalo asi 60 jemných výhonkov o priemernej dĺžke 2,1 cm, resp. 0,8 cm dlhý výhonok ruže). Na druhej strane je u rododendronu relatívne zdĺhavý, no celkom efektívny proces zakoreňovania jesenných rezkov, ktorého výsledkom sú pomerne silné rastliny (12 cm), a potom vysoko účinná produkcia jemných semenáčikov (0,9 cm), ktoré vyžadujú opatrnú manipuláciu a viacnásobné presádzanie, kým dobehnú rezkovance. Pri ruži môžeme pre dormanciu semien čakať na semenáče niekoľko rokov, no účinnosť rezkovania je napriek rýchlosti tvorby a životaschopnosti produkovaných rastlín (dĺžka stoniek cca 2 m) dosť nízka. Z hľadiska rýchlosti produkcie silného rastlinného materiálu je teda vhodnejšie rezkovanie, no z hľadiska tvorby depozitu rastlín geneticky blízkych pôvodnej populácii je určite vyhovujúcejšia generatívne cesta množenia. Pri hlohu je

Tab. 6. Hodnotenie efektívnosti množiteľského postupu z hľadiska rastu produkovaného rastlinného materiálu. Rezky rododendronu plstnatého (*Rhododendron tomentosum* Harmaja) a ruže roľnej (*Rosa arvensis* Huds.) boli odobraté na jeseň, materiál na *in vitro* kultiváciu začiatkom leta 2022. Skratky: CDS – celková dĺžka stonky, DK – dĺžka kultivácie.

Table 6. Evaluation of the efficiency of the propagation method in terms of the growth of the plant material produced. *Rhododendron tomentosum* Harmaja and *Rosa arvensis* Huds. cuttings for classical propagation treatments were harvested in autumn and plant material for *in vitro* cultivation in early summer 2022. Abbreviations: CDS – total stem length, DK – cultivation duration (days).

Druh	Rezky		<i>In vitro</i>		Semená	
	CDS (cm)	DK (dni)	CDS (cm)	DK (dni)	CDS (cm)	DK (dni)
<i>Crataegus lindmanii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Rhododendron tomentosum</i>	12	194	126	292	0.9	194
<i>Rosa arvensis</i>	198	162	0.8	298	3.5	210

možný iba tento spôsob množenia a produkcia semenáčov trvá pre dormanciu semien spravidla viac rokov.

Hodnotenie kondície vyprodukovaných rastlín ruže roľnej (tab. 7) ukázalo najvyšší obsah chlorofylov v semenáčoch (3,28 mg g⁻¹ ČH). O niečo nižšiu koncentráciu sme stanovili v listoch rezkovanco. Pravdepodobne ide o mierne vyčerpanie dusíka v substráte (Vaněk & Ložek 2013) spôsobené ich rýchlym rastom (tab. 6). Listy *in vitro* regenerantov výrazne zaostávali za nimi, čo môže súvisieť s viditeľne slabou morfogenezou ruže pri kultivácii v týchto podmien-

Tab. 7. Koncentrácia chlorofylov v listoch ruže roľnej (*Rosa arvensis* Huds.) ako funkcia cesty propagácie.

Table 7. Leaf chlorophyll concentration in *Rosa arvensis* Huds. influenced by the propagation method.

Parameter	Cesta množenia		
	Rezky	Semená	<i>In vitro</i>
Chlorofyl a+b (mg.g ⁻¹ ČH)	2,84	3,28	2,08

Tab. 8. Klíčivosť semien, resp. úspešnosť rezkovania (%) taiwanského výberu druhov.

Table 8. Seed germinability or cutting rooting success (%) in the selection of Taiwanese species.

Druh	Cesta množenia	
	Semená	Rezky
<i>Citrus taiwanica</i>	92	-
<i>Erythrina variegata</i>	100	95
<i>Polyalthia liukiensis</i>	86	-

kach (tab. 6). Aj tieto výsledky podporujú naše predchádzajúce závery o výhodnosti rezkovania, resp. generatívneho množenia ruží.

Pokusy taiwanských kolegov s množením miestnych chránených druhov drevín (tab. 8) ukázali relatívne vysokú úroveň klíčivosti semien, ako aj úspešnosť rezkovania druhu *Erythrina variegata* (90 – 100 %). Propagácia semenami predstavuje teda dostatočne efektívny a v dvoch prípadoch jediný spôsob, ako zabezpečiť tvorbu dostatočne veľkého rastlinného depozitu v rámci *ex situ* konzervácie chránených druhov. Ide o originálne dáta, ktoré zatiaľ nie je možné porovnať s inými výsledkami.

Podakovanie

Táto práca vznikla s podporou medzinárodného vedeckého projektu APVV SK-TW-21-0003 „Integrovaný prístup botanických záhrad a občianskej vedy pre záchranu ohrozených druhov rastlín“.

Literatúra

- Afrin, S., Rahman, M. A., Khalekuzzaman, M., Hasan, M. M., Fahim, A. H. F. & Alam M. S. 2022. Study on *in vitro* micropropagation of *Rosa* sp. Bangladesh J. Agric. 47(1): 66–74.
- Anderson, W. C. 1978. Tissue culture propagation of rhododendrons. In Vitro 14: 334.
- Attia, O. A., El Dessoky, S. D. & El-Tarras, A. E. (2012) *In vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose plant. Afr. J. Biotechnol. 11(48): 10888–10893.
- Baranec, T. 1986. Biosystematické štúdium rodu *Crataegus* L. na Slovensku. Acta Dendrologica, Veda, Bratislava. 102 pp.
- Chao, C.-L., Tung, G.-S., Wu, S.-H. & Lee, J.-W. 2023. The reintroduction of threatened plants within and beyond protected areas: A public-private partnership perspective. International Conservation Conference, Taipei, Taiwan.
- Chivian, E. & Bernstein, A. 2010. How our health depends on biodiversity. Boston, Center for health and the global environment. 24 pp.

- da Costa, C., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M. et al. 2013. When stress and development do hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Front. Plant Sci.* 4: 133.
- Eeckhaut, T., Janssens, K., De Keyser, E. & De Rick, J. 2010. Micropropagation of rhododendron. In: Jain, S. M., Ochatt, S. J. (eds) *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Methods in molecular biology*, vol. 589. Humana Press, New York. p. 141–152.
- Editorial Committee of the Red List of Taiwan Plants 2017. *The Red List of Vascular Plants of Taiwan*. Endemic Species Research Institute, Forestry Bureau, Council of Agriculture, Executive Yuan and Taiwan Society of Plant Systematics.
- Eliáš, P. jun., Dítě, D., Kliment, J., Hrivnák, R. & Feráková, V. 2015. Red list of ferns and flowering plants of Slovakia. 5th edition (October 2014). *Biologia (Bratislava)* 70: 218–228.
- Ferus, P., Konôpková, J., Bošiaková, D. & Hořka, P. 2017. Effective rhododendron propagation through stem cuttings. *J. Appl. Hortic.* 19: 226–229.
- Ficko, S. A. & Naeth, M. A. 2021. Root development on cuttings of seven arctic shrub species for revegetation. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 53: 237–251.
- Jackson, G. A. D. & Blundell, J. B. 1965. Germination of *Rosa arvensis*. *Nature* 205: 518–519.
- Jesionek, A., Kokotkiewitz, A., Włodarska, P. et al. 2016. *In vitro* propagation of *Rhododendron tomentosum* – an endangered essential oil bearing plant from peatland. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 58: 97–111.
- Kim, C. J. U., Jee, S. O. & Chung, J. D. 2003. *In vitro* micropropagation of *Rosa* hybrid L. *J. Plant Biotechnol.* 5: 115–119.
- Klč, V. 2009. Chorológia a populačná biológia rodu *Crataegus* L. v rôznych ekologických podmienkach východného Slovenska. Dizertačná práca, msc., depon. in SPU Nitra, Nitra.
- Kolmanová, A. 1997. Autekologie rojovníku bahenného. In: Baranec, T. (ed.) *Flóra a vegetácia rašelinísk: zborník referátov z vedeckej konferencie, Orava, 8. – 10. septembra 1997*. p. 35–42.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Meth. Enzymol.* 148: 350–382.
- Lloyd, G., McCown, B. H. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators Society* 30: 421–427.
- Ma, Y., Byrne, D. H. & Chen, J. 1996. Propagation of rose species *in vitro*. *In Vitro – Plant* 32: 103–108.
- Mao, A. A., Kaliamoorthy, S., Ranyaphi, R. A. et al. 2011. *In vitro* micropropagation of three rare, endangered, and endemic *Rhododendron* species of Northeast India. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 47: 674–681.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Mútnanová, M. & Ulrych, L. 2010. *Alkanna tinctoria*. Štátna ochrana prírody, Banská Bystrica. 10 pp.
- Pati, P. K., Sharma, M., Sood, A. & Ahuja, P. S. 2005. Micropropagation of *Rosa damascena* and *R. bourboniana* in liquid cultures. In: Hvoslef Eide, A. K., Preil, W. (eds) *Liquid systems for in vitro mass propagation of plants*. Kluwer Academic Publishers. p. 373–385.
- Pati, P. K., Rath, S. P. Sharma, M., Sood, A. & Ahuja, P.S. 2006. *In vitro* propagation of rose – a review. *Biotechnol. Adv.* 24: 94–114.
- Renčo, M. & Murín, J. 2012. New species of soil free-living and plant parasitic nematodes (Nematoda) for the fauna of Slovakia from the Horná Orava PLA. *Folia Faun. Slov.* 17: 187–190.

- SHMÚ 2022. Monitoring pôdneho sucha. <https://www.intersucho.sk>, cit. 17. 10. 2023.
- Shenk, R. U. & Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199–204.
- Short, K. C., Price, L. & Roberts, A. V. 1981. Micropropagation of roses. In Harkness, J. (ed.). *The Rose Annual*. United Kingdom, RNRS. p. 134–138.
- Standardi, A. & Catalano, F. 1985. Tissue culture propagation of kiwifruit. *Comb. Proc. – Int. Plant Propag. Soc.* 34: 236–243.
- Šoltés, R., Hájek, M. & Valachovič, M. 2001. *Oxycocco-Sphagnetea* Br.-Bl. et R.Tx. ex Westhoff et al. 1946. In: Valachovič, M. (ed.) *Rastlinné spoločenstvá Slovenska. 3. Vegetácia mokradí*. Veda, Bratislava. p. 276–298.
- Štofaňák, M. 1993. Štúdium rozšírenia a lokálnych populácií taxónov *Crataegus* L. v Levočských vrchoch. Diplomová práca, msc., depon. in VŠP, Nitra.
- ŠOP SR 2023. Obnova rašelinísk v Karpatoch - Klinské rašelinisko. <https://www.sopsr.sk/web/?cl=30314>, cit. 17. 10. 2023.
- Tomaško, I. 1995. Introdukcia a reprodukcia ohrozených dendrotaxónov domácej flóry v Arboréte Mlyňany. In: Labanc, J. (ed.) *Výsledky botanických záhrad a arborét pri záchrane domácej flóry a II. dendrologické dni. Zborník referátov seminára pri príležitosti 30. výročia založenia Arboréta Borová hora*. Technická univerzita vo Zvolene, Zvolen. p. 77–85.
- Tomson, S. & Gertner, D. 2003. *In vitro* shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhododendron*. *Biol. Plant.* 46: 463–465.
- Tung, G.-S. 2020. International exchange program of threatened plant conservation strategy and botanical garden management, funded by the National Science and Technology Council. Taiwan Forestry Research Institute.
- Vander Mijnsbrugge, K., De Cock, K., Cox, K. et al. 2010. Conservation measures for *Rosa arvensis* Huds. in Flanders (Belgium) based on congruent genetic and phenotypic population differentiation. *Conserv. Genet.* 11: 2243–2253.
- Vaněk, V. & Ložek, O. 2013. *Výživa poľných a záhradných plodín*. Nitra, Profi Press. 175 pp.
- Vijaya, N., Satyanarayana, G., Prakash, J. & Pierik, R. L. M. 1991. Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of rose. *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.* 12: 209–214.
- Walter, V. 2011. *Rozmnožovaní okrasných stromů a keřů*. Brázda, Praha. 312 pp.

Došlo 17. 10. 2023

Prijaté 14.11. 2023