

## SMLOUVA O UPLATNĚNÍ OVĚŘENÉ TECHNOLOGIE

zpracované v rámci plánu uplatnění výsledků výzkumného projektu č. TH03030339 uzavřená podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník, ve znění pozdějších předpisů

Smluvní strany

- 1. Česká zemědělská univerzita v Praze**  
se sídlem Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchdol  
IČO: 60460709  
DIČ: CZ60660709  
Zastoupená Ing. Jakubem Kleindienstem, kvestorem  
(dále také jen „ČZU“)
- 2. Suchopýr z.ú.**  
se sídlem Oldřichov v Hájích 5, 463 31 Oldřichov v Hájích  
IČO: 25419358  
DIČ: CZ25419358  
Zastoupená Ing. Mgr. Alenou Hlídkovou, ředitelkou,  
vedená u Krajského soudu v Ústí nad Labem, oddíl U, vložka 180  
(dále také jen „Suchopýr“)

a

- 3. ECOLAB Znojmo, spol. s r.o.**  
se sídlem Václavské náměstí 10/1, 669 02 Znojmo  
IČO: 26911957  
DIČ: CZ26911957  
Zastoupená: RNDr. Vlastimilem Martinů, jednatelem,  
vedená u Krajského soudu v Brně, oddíl C, vložka 44937  
(dále také jen „ECOLAB“)

(ČZU, Suchopýr a ECOLAB společně dále jen také „*poskytovatelé ověřené technologie*“ nebo též „*smluvní strany*“)

Smluvní strany se dohodly, že ČZU a Suchopýr jsou zároveň také uživateli ověřené technologie ve smyslu této smlouvy (ČZU a Suchopýr společně dále také jen „*uživatelé ověřené technologie*“).

### Článek 1 Předmět smlouvy

Předmětem této smlouvy je uplatnění ověřené technologie zpracované v rámci řešení výzkumného projektu TAČR č. TH03030339 „*Metody umělé reprodukce břízy ojcovské a postupy směřující k zachování její populace na území České republiky*“ s názvem **Technologie množení a pěstování výsadbyschopných rostlin z reprodukčního materiálu jedinců břízy s fenotypovým projevem břízy ojcovské** (dále jen „ověřená technologie“).

## Článek 2

### Autorství, cíl uplatnění a předpokládané ekonomické přínosy ověřené technologie

2.1 Autoři ověřené technologie: XXXXX

Zástupce autorského týmu: XXXXX

Byla navržena a ověřena technologie (Ztech): **Technologie množení a pěstování výsadbyschopných rostlin z reprodukčního materiálu jedinců břízy s fenotypovým projevem břízy ojcovské.**

2.2 Cílem ověřené technologie je ověřit způsoby reprodukce jedinců bříz s fenotypovým projevem břízy ojcovské, kteří se vyskytují na lokalitě Volyně u Výsluní.

2.3 Ekonomický přínos ověřené technologie: hlavní přínosy projektu stojí mimo ekonomiku. Spočívají v ověření postupů propagace bříz s fenotypovým projevem břízy ojcovské, což má význam především z pohledu biodiverzity, životního prostředí a ochrany přírody. Přesto lze odhadovat ekonomické přínosy ověřené technologie v řádech desítek až stovek tisíců Kč v závislosti na zájmu o břízu ojcovskou a její uplatnění v krajině či účelových výsadbách. Bližší vymezení ekonomických přínosů je uvedeno v dokumentaci k ověřené technologii.

## Článek 3

### Rozsah uplatnění ověřené technologie

Uplatnění ověřené technologie je možné u specializovaných školek a pěstebních provozů zaměřených na pěstování vzácných a původních druhů. V první řadě bude uživatelem Suchopýr a ČZU, které technologii ověřovaly a mohou zajistit konzultace a její transfer dále. Uplatnění je možné u botanických zahrad a arboret, akademických a vědeckých institucí (vysoké školy, výzkumné ústavy), u organizací, které svou činností spadají pod resorty Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zemědělství, případně u samosprávných celků (např. Ústecký kraj, resp. o Odbor životního prostředí a zemědělství Krajského úřadu Ústeckého kraje, který zaštiťuje management přírodní památky Lokalita břízy ojcovské u Volyně).

## Článek 4

### Úprava vlastnických práv k ověřené technologii

4.1 Poskytovatelé ověřené technologie jsou oprávněni nakládat s ověřenou technologií uvedenou v čl. 1 této smlouvy.

4.2 Uživatelé ověřené technologie jsou oprávněni užívat tuto ověřenou technologii k dosažení cíle uvedeného v odst. 2.2 této smlouvy po dobu účinnosti smlouvy.

4.3 Poskytovatelé ověřené technologie prohlašují, že zpracovaná ověřená technologie nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

4.4 Poskytovatelé ověřené technologie upozorňují, že zpracovaná ověřená technologie, vyvinutá v rámci řešení výzkumného projektu, je smluvně přístupná všem potenciálním uživatelům.

4.5 Uživatelé ověřené technologie se zavazují informovat případné zájemce o původu této ověřené technologie.

4.6 Uživatelé ověřené technologie nejsou oprávněni poskytnout ověřenou technologii třetí osobě bez předchozího písemného souhlasu poskytovatelů ověřené technologie třetím osobám.

4.7 Uživatelé ověřené technologie jsou povinni postupovat při nakládání s ověřenou technologií v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

4.8 Uživatelé ověřené technologie berou na vědomí a souhlasí, že poskytovatelé ověřené technologie ani autorský tým nenesou odpovědnost za dosažené výsledky užitím ověřené technologie na základě této smlouvy. Uživatelé ověřené technologie nesou odpovědnost za jakoukoli škodu, která užitím ověřené technologie jim či jakékoli třetí osobě vznikne, a nejsou oprávněni ji vymáhat po poskytovatelích ověřené technologie ani po členech autorského týmu.

## **Článek 5**

### **Ochrana informací**

5.1 Ověřená technologie tvoří až do okamžiku jejího uveřejnění poskytovateli ověřené technologie obchodní tajemství poskytovatelů ověřené technologie podle platné právní úpravy a uživatelé ověřené technologie se zavazují obsah tohoto obchodního tajemství nevyzradit žádné třetí osobě bez předchozího písemného souhlasu poskytovatelů ověřené technologie.

5.2 Dále se smluvní strany zavazují zachovávat mlčenlivost o veškerých důvěrných informacích, které získaly v souvislosti s jednáním o uzavření této smlouvy, s uzavřením této smlouvy a následně v souvislosti s plněním uzavřené smlouvy. Důvěrnými informacemi jsou zejména informace o obchodních, výrobních, technických a organizačních záležitostech ostatních smluvních stran, dále technické informace, odborné informace a podnikatelsky využitelné znalosti a dovednosti, jež jsou utajované, významné a identifikovatelné v příslušné formě a jsou předmětem obchodního tajemství některé ze smluvních stran. Uživatelé ověřené technologie se zavazují zachovávat mlčenlivost o těchto skutečnostech i po ukončení platnosti této smlouvy.

5.3 V případě porušení předchozích odstavců tohoto článku uživateli ověřené technologie je kterýkoli z uživatelů ověřené technologie povinen uhradit poskytovatelům ověřené technologie smluvní pokutu ve výši 1.000,- Kč za každé takovéto porušení. Úhradou smluvní pokuty zůstává nedotčeno právo poskytovatelů ověřené technologie na náhradu škody v plné výši.

## **Článek 6**

### **Závěrečná ustanovení**

6.1 Tato smlouva se uzavírá na dobu neurčitou s tříměsíční výpovědní dobou. Výpovědní doba začíná běžet od prvního dne měsíce následujícího po doručení písemné výpovědi všem smluvním stranám.

6.2 Tato smlouva je v souladu s ustanoveními smlouvy číslo 2017TH03030339 – Smlouva o poskytnutí podpory na řešení programového projektu č. TH03030339.

6.3 Jakékoliv změny a doplnění této smlouvy mohou být provedeny pouze na základě písemné dohody smluvních stran. Takové dohody musí mít podobu datovaných, číslovaných a všemi smluvními stranami podepsaných dodatků smlouvy, není-li v této smlouvě stanoveno jinak.

6.4 Závazky, práva a povinnosti vyplývající z této smlouvy přecházejí na eventuální právní nástupce smluvních stran.

6.5 Tato smlouva nabývá platnosti dnem podpisu všech smluvních stran a účinnosti v souladu se zákonem č. 340/2015 Sb., o zvláštních podmínkách účinnosti některých smluv, uveřejňování těchto smluv a o registru smluv (zákon o registru smluv), ve znění pozdějších předpisů.

6.6 Tato smlouva se vyhotovuje v pěti stejnopisech, z nichž každý má platnost originálu. Suchopýr a ECOLAB obdrží po jednom stejnopise a ČZU obdrží dva stejnopisy. Jeden stejnopis obdrží poskytovatel institucionální podpory na řešení výzkumného projektu, v jehož rámci byla ověřená technologie zpracována.

6.7 Tato smlouva je uzavírána jako bezúplatná.

6.8 Protokol o ověřené technologii a uplatnění výsledku a technická dokumentace k ověřené technologii jsou nedílnou součástí této smlouvy.

6.9 Poskytovatelé ověřené technologie dodají údaje o ověřené technologii a uplatnění výsledku pro evidenci v RIV.

6.11 Uživatelé ověřené technologie bezvýhradně souhlasí se zveřejněním plného znění smlouvy tak, aby tato smlouva mohla být předmětem poskytnuté informace ve smyslu zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů. Uživatelé ověřené technologie rovněž souhlasí se zveřejněním plného znění smlouvy dle zákona č. 340/2015 Sb., o zvláštních podmínkách účinnosti některých smluv, uveřejňování těchto smluv a o registru smluv (zákon o registru smluv), ve znění pozdějších předpisů.

6.12 Smluvní strany prohlašují, že si smlouvu před jejím podpisem přečetly a s jejím obsahem bez výhrad souhlasí. Smlouva je vyjádřením jejich pravé, skutečné, svobodné a vážné vůle. Na důkaz pravosti a pravdivosti těchto prohlášení připojují oprávnění zástupci smluvních stran své vlastnoruční podpisy.

*Za autorský tým*

V Praze dne:

.....

doc. Ing. Ivan Kuneš, Ph.D.

zástupce autorského týmu

*Podpisy smluvních stran:*

Za ČZU

V Praze dne:

.....

Ing. Jakub Kleindienst, kvestor

Za Suchopýr

V Oldřichově v Hájích dne:

.....

Ing. Mgr. Alena Hlídková, ředitelka

Za ECOLAB

Ve Znojmě dne:

.....

RNDr. Vlastimil Martinů, jednatel

# Protokol o ověření technologie

## Název ověřované technologie:

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

## Autoři ověřované technologie:

XXXXX

XXXXX

XXXXX

XXXXX

XXXXX

## Předmět ověrování:

Technologie vegetativního množení rostlin s fenotypovým projevem břízy ojcovské, zvláště pomocí in vitro metod a roubováním.

## Ověřující pracoviště:

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha - Suchdol,

Šlechtitelská stanice Truba 839, 281 63 Kostelec nad Černými lesy,

Suchopýr z.ú., Oldřichov v Hájích 5, 463 31 Oldřichov v Hájích

ECOLAB Znojmo, spol. s r.o., Václavské náměstí 10/1, 669 02 Znojmo

## Termín ověrování:

Březen 2020 odběr materiálu na indukci in vitro technologie množení a roubování

Duben 2020: roubování

Duben – červen 2020: množení v podmínkách in vitro

Březen 2021: opakovaný odběr materiálu na indukci in vitro technologie množení a roubování

Duben 2021: roubování

Duben – listopad 2021: množení v podmínkách in vitro

Listopad 2021: převod do ex vitro podmínek

Listopad 2021: hodnocení růstu dřevin

## Technická dokumentace:

Technická dokumentace tvoří přílohu tohoto dokumentu

## Závěrečné konstatování:

Bylo prokázáno, že technologie roubováním a in vitro množením pomocí mikropropagace je použitelná pro množení bříz s fenotypovým projevem břízy ojcovské za účelem záchrany genofondu vybraných jedinců. Technologie využívá nových poznatků o metodice in vitro pěstování břízy, zvláště navození optimálních podmínek pro pěstování rostlinných částí v živných médiích s různou koncentrací fytohormonů za účelem získání celistvé životaschopné rostliny. Na základě těchto poznatků bylo navrženo metodické zvládnutí množení vybraných stromů v in vitro podmínkách a pomocí roubování. Ověření množení in vitro, roubování a dopěstování rostlin bylo provedeno v zázemí šlechtitelské stanice Truba u Kostelce nad Černými lesy a v zázemí společnosti Suchopýr s využitím některých preparátů poskytnutých společnostmi Ecoloab. Bylo mimo jiné vysledováno, že odebraní jedinci bříz reagují na pěstební podmínky odlišně a také ujímavost v rámci metodických kroků je dle jednotlivých jedinců bříz rozdílná. Avšak navrženým přístupem je možné dosáhnout uspokojivých výsledků v rámci množení a růstu bříz získaných z reprodukčního materiálu odebraného na jedincích s fenotypovým projevem břízy ojcovské.

Technologie množení břízy ojcovské pomocí vegetativních metod množení byla navržena a ověřena v rámci řešení projektu č. p. TH03030339: Metody umělé reprodukce břízy ojcovské a postupy směřující k zachování její populace na území České republiky, finančně podpořeném Technologickou agenturou ČR.

Za autorský tým FLD ČZU:  Ing. Jan Vítámvás, Ph.D. V Praze, dne:  doc. Ing. Ivan Kuneš, Ph.D. V Praze, dne:  Ing. Martin Baláš, Ph.D. V Praze, dne:	(podpisy)
Za autorský tým Suchopýr o.p.s.: Ing. Alena Hlídková  V Oldřichově v Hájích, dne:	(podpis)
Za autorský tým ECOLAB Znojmo, spol. s r.o.: RNDr. Vlastimil Martinů  Ve Znojmě, dne:	(podpis)

# Technická dokumentace k ověřené technologii

Zpracování v rámci řešení projektu TAČR TH03030339

**„Metody umělé reprodukce břízy ojcovské a postupy směřující k zachování její populace na území České republiky“**

Název ověřené technologie: **Vegetativní množení rostlin s fenotypovým projevem břízy ojcovské (*Betula oycoviensis* Besser)**

**Praha 2021**



## **Poděkování:**

Ověřená technologie je dílčím výstupem projektu ČR (TAČR TH03030339) „Metody umělé reprodukce břízy ojcovské a postupy směřující k zachování její populace na území České republiky“ vzniklá s finanční podporou Technologickou agenturou ČR.

## **Kolektiv autorů:**

XXXXX

XXXXX

XXXXX

XXXXX

XXXXX

## **Poskytovatelé výsledku:**

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha - Suchdol

Suchopýr z.ú., Oldřichov v Hájích 5, 463 31 Oldřichov v Hájích

ECOLAB Znojmo, spol. s r.o., Václavské náměstí 10/1, 669 02 Znojmo

## Obsah

Úvod .....	4
Metodika a výsledky z ověřování vegetativního množení břízy ojcovské .....	6
Standardizovaný metodický postup <i>in vitro</i> množení .....	6
Zakládání primárních kultur <i>in vitro</i> .....	6
Kultivační podmínky multiplikace.....	6
Zakořeňování a aklimatizace .....	6
Výsadba na venkovní plochy .....	8
Standardizovaný metodický postup roubování.....	8
Ověřování a výsledky <i>in vitro</i> množení v roce 2020 a 2021 .....	8
Ověření a výsledky roubování v roce 2020 a 2021.....	11
Ekonomické přínosy využití výsledku .....	11
Význam, přínosy a uplatnění technologie vegetativního množení břízy ojcovské s využitím <i>in vitro</i> metod a roubováním.....	13
Publikace, které předcházely vydání ověřené technologie.....	13
Použitá literatura.....	14

## Úvod

Bříza ojcovská (*Betula oycoviensis* Besser) je v Evropě vzácně se vyskytujícím taxonem, jehož ostrůvkovitý výskyt je uváděný 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 podle některých pramenů ([www.pladias.org](http://www.pladias.org)) zaznamenán výskyt břízy 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 přírodní památkou.

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, Linda et al. 2020), 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 zcela 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 rozličně (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 a *in vitro* mikropropagací. Řízkování se při testování v rámci našich výzkumných aktivit neosvědčilo. Nulová ujímavost byla zaznamenána u jarních i zimních řízků (Vítamvás et al. 2020).

Roubování i *in vitro* množení mají 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 těžko předvídatelná míra kompatibility různých kombinací podnoží a roubů (Nelson 1968). Andrews a Marquez (1993) uvádějí potenciální faktory, které mohou přispět k neslučitelnosti podnože a roubu. Jsou jimi 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 technika, která může přispět k zachování geneticky hodnotných jedinců této břízy. Omezením techniky roubování je nutnost mít k dispozici větší množství podnoží a především roubů, časová náročnost a nízká úspěšnost ujímání roubů, která může dosahovat jen 30 % (Vítamvás et al. 2020). Je třeba rovněž uvést, že rouby jedinců s fenotypovým projevem břízy ojcovské jsou značně křehké. Navíc živé větvičky jsou často přítomny společně

s větvičkami suchými, takže se v období sběru roubů (konec zimy a předjaří) jen problematicky odlišují, což dále snižuje úspěšnost roubování.

Mikropropagace, zvláště organogeneze, představuje vhodnou *in vitro* technologii pro zachování ohrožených genotypů břízy ojcovské a to i pro rychlé namnožení klonového sadebního materiálu. S výhodou se používají *in vitro* metody zejména u rostlin starých, 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 Výsluní (foto: Martin Baláš)

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

# Metodika a výsledky z ověřování vegetativního množení břízy ojcovské

## Standardizovaný metodický postup *in vitro* množení

### Zakládání primárních kultur *in vitro*

Odebírání rostlinného materiálu (větvíček, roubů) pro založení kultury probíhá v únoru až březnu před vyrašením pupenů v množství cca 20–30 pupenů na jednoho jedince. Rouby s pupeny se vloží do označeného mikrotenového sáčku a při převozu se uloží v chladu (nachlazená taška, přenosná lednice, polystyrenová krabice s namraženými chladicími boxy oddělenými tak, aby nebyly v přímém kontaktu s rouby). 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 rostlinného materiálu 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% HgCl<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> (Danish Agar, Carl Roth), s koncentrací fytohormonu 6-benzylaminopurinu (BAP) 1 mg.l<sup>-1</sup>, sacharózy 30 g.l<sup>-1</sup>. 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<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (zářivky cool white 36 W, Philips). Indukce růstu pupenů trvá přibližně 4–6 týdnů.

### Kultivační podmínky multiplikace

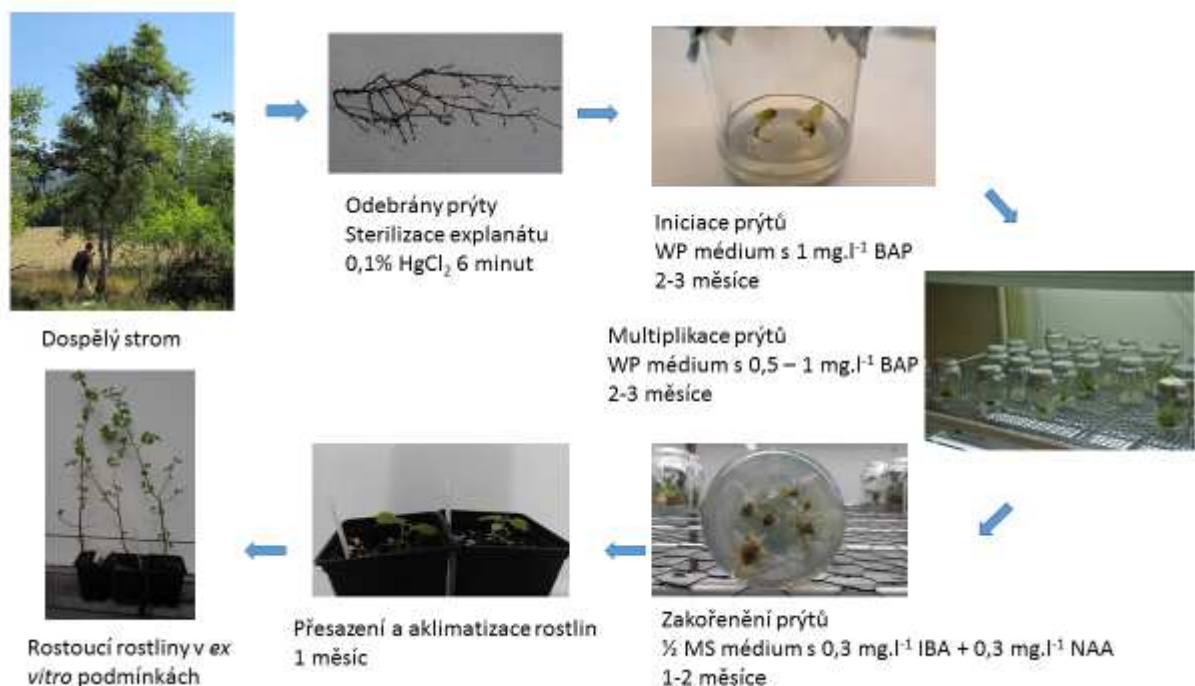
Po vyrašení pupenů na nodálním segmentu (primárním explantátu) jsou explantáty přeneseny a pěstovány na multiplikačním WP médiu s koncentrací BAP 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, sacharózy 30 g.l<sup>-1</sup>, agaru 8 g.l<sup>-1</sup> (Danish agar, Carl Roth), pH je upraveno na hodnotu 5,7–5,8 pomocí roztoku KOH 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 16/8 hodin (světlo/tma) s osvětlením o intenzitě 35 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (zářivky cool white 36 W, Philips). Průběžně je nutné sledovat zdravotní stav kultur a výskyt kontaminací (nevhodně se vyvíjející kultury se odstraní).

### 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<sup>-1</sup> v kombinaci s kyselinou 1-naftyloctovou (NAA) 0,3 mg.l<sup>-1</sup>, sacharózy 15 g.l<sup>-1</sup>, agaru 8 g.l<sup>-1</sup> (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  $24 \pm 1$  °C), při světelném režimu 16/8hodin (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 připraveným jako roztok 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  $24 \pm 1$  °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 3–4 týdnů snižuje na cca 60% relativní vzdušnou vlhkost. Preventivně se aplikuje fungicidní přípravek (např. 1% Previcur Energy (propamocarb 530 g l<sup>-1</sup>, fosetyl-Al 310 g l<sup>-1</sup>, Bayer Garden, Germany) jednou za dva týdny. Po aklimatizaci se rostliny přenášejí do skleníku nebo na venkovní stíněnou plochu (dle ročního období).



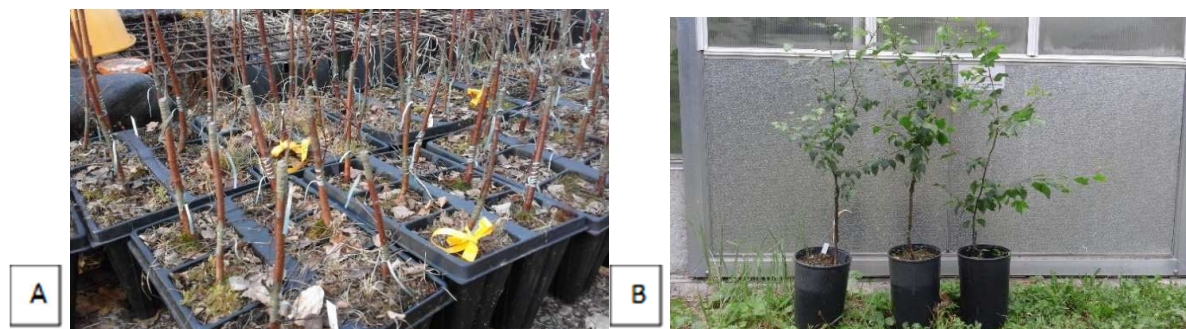
Obr. 2. Schéma *in vitro* mikropropagace břízy ojcovské (fotografie ve schématu M. Baláš, J. Vítamvás)

## 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.

## Standardizovaný metodický postup roubování

Roubování je vhodné provádět na přelomu března a dubna na částečně narašené podnože břízy bělokoré (rašení probíhá ve vyhřívaném 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 v polovině 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. A) Čerstvě naroubované podnože. B) Rostoucí roubovanci v druhé vegetační sezóně od naroubování (foto: Jan Vítámvás)

## Ověřování a výsledky *in vitro* množení v roce 2020 a 2021

K iniciaci a množení bylo použito médium WP s přidavkem 1 mg/l BAP, kdy na tomto médiu prorůstaly s větší nebo menší úspěšností explantáty (nodální segmenty) ze všech stromů odebraných na lokalitě Výsluní u Volyně (Tab. 1). Nejlépe prorůstaly na tomto médiu nodální segmenty ze stromů č. VOL-05 a

VOL-32 v roce 2020 a u VOL-16 a VOL-32 v roce 2021. První náznaky pučení a prorůstání pupenů na nodálních segmentech byly patrné po 2–3 týdnech od počátku kultivace na médiích.

V průběhu kultivace docházelo u některých jedinců k poklesu aktivity růstu. V roce 2020 došlo k závadě na klimatizaci a kultury na základě vysoké teploty v kultivační místnosti odumřely. Do konce července 2021, kdy byla nově zavedena kultura v březnu 2021, zůstaly v kultuře růst velmi dobře stromy č. VOL-16 a VOL-32 (podobně jako v roce 2020).

Tab. 1. Úspěšnost prorůstání pupenů na iniciačním médiu WP s 1,0 mg.l<sup>-1</sup>BAP v roce 2020 a 2021

Strom č.	Úspěšnost iniciace pupenů [%] v roce 2020	Úspěšnost iniciace pupenů [%] v roce 2021
VOL - 03	50	
VOL - 05	70	
VOL - 14		35
VOL - 15	60	
VOL - 16	55	45
VOL - 18	45	
VOL - 25	30	
VOL - 26	35	
VOL - 30	40	
VOL - 31		40
VOL - 32	70	55
VOL - 37	50	
VOL - 35		30
VOL - 66	40	

Při multiplikaci v roce 2020 a 2021 z iniciovaných pupenů na médiích WP s 1 mg/l BAP docházelo během každých 2 měsíců k vytváření a růstu nových prýtů (1–3 kusů/explantát), s délkami prýtů od 10–13 mm. Rostliny byly během kultivace zelené, docházelo k menší tvorbě kalusu na bázi prýtů. Kořeny se nevytvářely (Tab. 2).



Tab. 2. Růst prýtů na médiu WP s koncentrací BAP 1 mg/l po 8 týdnech kultivace in vitro v roce 2020 a 2021

Označení média	Rok založení kultury	Strom č.	Délkový přírůst počátečních prýtů [mm]	Počet nově vytvořených prýtů na explantát	Délky nově vyrostlých prýtů [mm]
			(mean±S.E)	(mean±S.E)	(mean±S.E)
WPM	2020	VOL-16	5,51±3,51	2,72±1,81	12,32±4,66
		VOL-32	8,34±3,74	3,25±2,27	13,22±4,35
		VOL-37	4,75±3,42	1,25±0,75	10,42±3,11
WPM	2021	VOL-16	4,32±2,93	2,39±1,86	11,67±3,81
		VOL-32	6,58±3,74	2,64±1,42	13,42±4,14

Vzrostlé, dostatečně dlouhé (min 2–3 cm, po cca 4–5 měsících kultivace) prýty z fáze multiplikace byly použity k zakořeňování prýtů na ½ MS médiu obohaceného auxiny IBA 0,3 mg/l s NAA 0,3 mg/l. Po 4 týdnech kultivace zakořeňovalo průměrně 80–90 % prýtů z fáze multiplikace. Kořeny byly průměrně do 1 cm délky a v počtu 5–7 kusů na explantát.

Tab. 3. Tvorba kořenů po 4 týdnech kultivace na médiu ½ MS s 0,3 mg/l IBA a 0,3 mg/l NAA v roce 2021

Označení média	Rok kultivace	Strom č.	Počet kořenů na explantát	Délky kořenů [cm]	Procento zakořeněných prýtů [%]
			(mean±S.E)	(mean±S.E)	
½ MS	2021	VOL-16	4,15±2,35	0,73±0,42	87,5
		VOL-32	5,35±3,17	0,82±0,57	85

Po fázi zakořeňování v médiích bylo přistoupeno k fázi přesazení do ex vitro podmínek a aklimatizace. Pro převod byly použity všechny prýty, které zakořenily. Zakořeněné prýty byly vkládány do substrátu dle metodiky a aklimatizovány po dobu 4-6 týdnů. Následně byl zhodnocen stav rostlin po aklimatizaci, kdy bylo shledáno, že přežívání je úspěšné ve více jak 80 % (VOL-16 80 %, VOL-32 90 %) v roce 2021. Všechny rostliny rostly bez abnormalit a vytvářely nové listy a prýty.

V rámci jednoho vegetačního roku je možné zajistit sadební materiál z *in vitro* množení pro budoucí výsadbu. Za vegetační rok je možné dosáhnout v *in vitro* podmínkách z jednoho nasazeného a indukovaného pupenu (příp. nodálního segmentu) přibližně 10–20 jedinců dle koeficientu multiplikace. V dalších letech, po zavedení do kultury, je možné získávat větší množství rozmnoženého materiálu, a to až teoreticky 500–550 ks mladých sazenic/odebraný strom za kalendářní rok z iniciovaného nodálního segmentu.

## Ověření a výsledky roubování v roce 2020 a 2021

Rouby břízy ojcovské (přehled dle Tab 1.), které byly umístěny na podnož břízy bělokoré ve dvou místech dle metodiky, se ujímaly dle č. stromů rozdílně. Nejlépe se uchytily rouby u jedince VOL-16, kdy na konci vegetační sezóny 2020 bylo vyhodnoceno celkem 50 % roubovanců jako úspěšně rostoucích. Úspěšnost 33 % byla u stromů č. VOL-06, 15, 18, 37 a 8 % u stromu Vol-25. Rouby na podnožích výše zmíněných stromů rostly během vegetační sezóny 2020 bez abnormalit a vytvořily nový asimilační aparát a nové prýty. U ostatních roubovanců nebyl shledán na konci vegetačního období 2020 žádný ujmutý roub. Přezimování 2020/2021 bylo úspěšné a všechny naroubované stromy přežily.

V roce 2021 byly odebrány nové rouby (dle Tab 1.) a opět byly umístěny na podnož břízy bělokoré ve dvou místech dle metodiky. Nejlépe se uchytily rouby u stromu č. VOL-32, kdy na konci vegetační sezóny 2021 bylo vyhodnoceno celkem 33 % roubovanců jako úspěšně rostoucích, dále 16 % úspěšnost u stromů č. VOL-14, 16, 31, a 8 % u stromu VOL-35.

Roční produkce roubovanců je omezena na množství odebraného materiálu, kde únosná míra je kolem 10–15 roubů na strom. Pokud se započítá míra ujmoutí, lze získat přibližně každý rok nově 3–5 nových naroubovaných jedinců z odebraného mateřského stromu.

## Ekonomické přínosy využití výsledku

V rámci posuzování ekonomického hodnocení zabývajících se zachováním taxonu břízy ojcovské je spíše kladen důraz na celospolečenské přínosy v oblasti zachování genetických zdrojů a biodiverzity.

Náklady na množení *in vitro* technologií závisejí na tom, zda je technologie k dispozici, nebo by se musela pořídit, jelikož v případě množení pomocí *in vitro* kultur jsou významné pořizovací náklady na vybavení pro 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 (cenové relace k roku 2020), 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% úspěšnosti 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 ceny zvýšena, a to na minimálně na 330,- Kč/ks.

Celkový ekonomický přínos bude záviset na poptávce po sadebním materiálu břízy ojcovské, ale za určitých předpokladů by mohl dosahovat řádu desítek až stovek tisíců Kč.

Výše uvedené ekonomické kalkulace jsou ale skutečně jen rámcovým odhadem. **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 v zahraničí.**

### **Možná rizika**

Z výzkumu taxonomického postavení břízy ojcovské (Linda et al. 2020), který byl rovněž realizován v rámci řešení projektu TAČR TH03030339, vyplývá, že na břízu ojcovskou nelze nahlížet jako na samostatný druh, jak se k ní dříve přistupovalo. Pravděpodobně se jedná o nižší taxonomickou jednotku, která spadá pod okruh břízy bělokoré. Tyto nové poznatky, byť jsou z pohledu pochopení taxonomie bříz významné, mohou částečně negativně ovlivnit zájem o pěstování a kultivaci břízy ojcovské, a tedy i možné ekonomické přínosy. To protože vnímání důležitosti organismů z pohledu ochrany přírody, ale i dalšího využití, je často postaveno na druzích (např. vyhl. č. 395/1992 Sb.), které představují klíčovou taxonomickou jednotku. Nicméně, jak uvádí (Mallet 2007), měli bychom se naučit chránit a udržovat biodiverzitu ve všech úrovních hierarchie života, nikoliv jen na úrovni druhů.

## Význam, přínosy a uplatnění technologie vegetativního množení břízy ojcovské s využitím *in vitro* metod a roubováním

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. I když se velmi pravděpodobně nejedná o samostatný druh, je žádoucí nalézt důvod odlišného morfologického projevu břízy ojcovské a k tomu je potřeba udržet její stávající populaci. Pro záchranu břízy ojcovské se ukazuje jako vhodná metoda *in vitro* – organogeneze, případně roubování.

Vegetativní rozmnožování břízy ojcovské s využitím technologie *in vitro* a roubováním má mnoho přínosů:

- Zaručení genetické identity množných jedinců, jelikož se jedná o vegetativní rozmnožování.
- Zajištění zachování hodnotných genotypů břízy ojcovské; namnožený materiál lze použít na podporu udržení populace na přirozených stanovištích, případně pro komerční využití (zvláště pro okrasné zahradnictví).
- Úspěšné ověření moderního způsobu množení *in vitro* na rostlinném materiálu, který nebyl doposud touto technikou pěstován.
- Zjištění nových experimentálních výsledků pro výzkum i praxi v oblasti vegetativního množení ohrožených taxonů bříz.
- 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.

Technologie vegetativního množení rostlin s fenotypovým projevem břízy ojcovské (*Betula oycoviensis* Besser), která byla ověřena v rámci řešení projektu Technologické agentury ČR, č. p. TH03030339, Metody umělé reprodukce břízy ojcovské a postupy směřující k zachování její populace na území České republiky, je přístupná všem uživatelům prostřednictvím publikací. Technologie je především určena školkařským a zahradnickým podnikům, které se zabývají množением dřevin s technologickým zázemím pro roubování nebo *in vitro* množení. Uplatněním nového technologického postupu je možné inovovat poznatky o množení břízy ojcovské, popř. jiných druhů v zahradnických podnicích. Vlastnická a uživatelská práva k ověřené technologii jsou upravena ve Smlouvě o uplatnění ověřené technologie.

## Publikace, které předcházely vydání ověřené technologie

LINDA R., KUNEŠ I. and BALÁŠ M. (2020). Genetic and morphometric variability between populations of *Betula oycoviensis* from Poland and Czechia: A revised view of the taxonomic treatment of the Ojców birch. *Plos One* 15, (12): e0243310. doi:10.1371/journal.pone.0243310

- VÍTÁMVAS J., KUNES I., VIEHMANNNOVA I., LINDA R. and BALAS M. (2020). Conservation of *Betula oycoviensis*, an endangered rare taxon, using vegetative propagation methods. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 13, (2): 107-113. doi:10.3832/ifor3243-013
- BALÁŠ M., KUNEŠ I., GALLO J. and RAŠÁKOVÁ N. (2016). Review on *Betula oycoviensis* and foliar morphometry of the species in Volyne, Czech Republic. *Dendrobiology* 76: 117–125. doi:10.12657/denbio.076.011
- KUNEŠ I., LINDA R., FÉR T., KARLÍK P., BALÁŠ M., EŠNEROVÁ J., VÍTÁMVÁS J., BÍLÝ J. and URFUS T. (2019). Is *Betula carpatica* genetically distinctive? A morphometric, cytometric and molecular study of birches in the Bohemian Massif with a focus on Carpathian birch. *Plos One* 14, (10): e0224387. doi:10.1371/journal.pone.0224387

## Použitá literatura

- Andrews, P.K., Marquez, C.S. (1993). Graft incompatibility. *Hort. Rev.* 15: 183–231.
- Baláš M., Kuneš I., Gallo J., Rašáková, N. (2016). Review on *Betula oycoviensis* and foliar morphometry of the species in Volyne, Czech Republic. *Dendrobiology* 76: 117–125. doi:10.12657/denbio.076.011
- 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.
- Hartmann, H.T. and Kester, D.E. (1975). *Plant Propagation, Principles and Practices*. 3<sup>th</sup> ed. Prentice- Hall, Englewood Cliffs, NJ, 662 s.
- Kaplan, Z. (2019). *Klíč ke květeně České republiky*. Academia, Praha, 1172 s.
- 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.
- Linda R., Kuneš I., Baláš, M. (2020). Genetic and morphometric variability between populations of *Betula oycoviensis* from Poland and Czechia: A revised view of the taxonomic treatment of the Ojców birch. *Plos One* 15, (12): e0243310. doi:10.1371/journal.pone.0243310
- 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.
- Mallet J. (2007). Subspecies, Semispecies, Superspecies. Elsevier. 5 p. doi:10.1016/B0-12-226865-2/00261-3
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revise 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.
- 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 ojcowska (*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.
- 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