

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Zemědělská fakulta**

**Vegetativní množení střešníků (*Paphiopedilum* spp.) in vitro**

**bakalářská práce**

**Zdeněk Roule**

vedoucí práce

**Doc. RNDr. Hana Čížková, CSc.**

konzultant

**Mgr. Bohumil Vondruš**

České Budějovice 2009

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci na téma: Vegetativní množení střevíčníků (*Paphiopedilum* spp.) in vitro, vypracoval samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval

Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně JCU a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Českých Budějovicích, dne 15. 4. 2009

Podpis: .....

## **Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat paní RNDr Haně Čížkové , CSc za odborné vedení, konzultace a za veškerý čas, který mi věnovala. Dále bych chtěl poděkovat panu Mgr. Bohumilu Vondrušovi za uskutečnění této práce, za jeho trpělivost a nepřeborné množství informací, o které se rád podělil. Také děkuji jeho kolegům, kamarádům a fandům orchidejí za poskytnutý rostlinný materiál. Dík patří i Jitce Pomikalkové za pomoc s překladem a samozřejmě mým rodičům za jejich podporu při studiu.

## **Anotace**

Bakalářská práce představuje počáteční etapu studia množení střevíčníků (*Paphiopedilum sp.*), jehož cílem je posouzení vhodnosti různých typů médií a kultivačních podmínek pro vegetativní množení vybraných druhů rodu *Paphiopedilum* v kultuře in vitro. Tato bakalářská práce obsahuje literární přehled o druzích použitých při pokusu, popis metodiky, výsledky a diskusi čtyř předběžných pokusů.

**Klíčová slova:** TDZ, *Paphiopedilum villosum*, *Paph. niveum*, *Paph. glaucophyllum*, *Paph. charlesworthii*

## **Annotation**

This thesis represents an initial stage of a study focused on vegetative propagation of *Paphiopedilum* species in vitro. The aim of the study is to assess various types of media and cultivation conditions for the vegetative propagation of selected *Paphiopedilum* species in vitro. This work contains a review of botanical characteristics of the species used, the description of methods, the design, results and discussion of four preliminary experiments.

**Key words:** TDZ, *Paphiopedilum villosum*, *Paph. niveum*, *Paph. glaucophyllum*, *Paph. charlesworthii*

## Obsah

1.Úvod.....	7
2.Literární přehled .....	8
2.1.Rod Paphiopedilum.....	8
2.2.Popis studovaných druhů .....	10
2.3.Principy metod množení in vitro.....	17
3.Metodika .....	20
3.1.POKUS Č. I.....	20
3.2.POKUS Č. II .....	22
3.3.POKUS Č. III a IV .....	24
4.Výsledky a diskuse .....	27
4.1.POKUS Č. I.....	27
4.2.POKUS Č. II .....	29
4.3.POKUS Č. III.....	31
4.4.POKUS Č. IV.....	32
5.Souhrnná diskuse .....	34
6.Závěr .....	35
7.Literatura.....	36

# 1. Úvod

Rod střevíčník (*Paphiopedilum*) patří spolu s dalšími sedmi rody (<http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>, 2. 4. 2009) z čeledi *Orchidaceae* mezi nejpřísněji chráněné orchideje na světě. Podle Washingtonské úmluvy (CITES) se nachází v kategorii s nejpřísnějším stupněm ochrany, CITES I, která je klasifikována jako druhy ohrožené vyhynutím. Jedná se o rod obsahující okolo 66 (Cribb 1998) druhů vyskytujících se v malých nepočetných skupinách.

Díky přístupu mnoha lidí k životnímu prostředí a vidině zisku mizí přírodní stanoviště střevíčníků značnou rychlostí. V závislosti na úbytku přirozených biotopů ubývají i počty těchto skvostných rostlin. Další příčinou jejich ohrožení je jejich atraktivní vzhled, který láká mnohé pěstitele, aby je získali do svých soukromých sbírek. Ne nadarmo jsou zahrnuty v příloze CITES I. Proto jsem si vybral množení asijských střevíčníků jako téma své bakalářské práce. Mým cílem je vyvinout metodu pro efektivní namnožení těchto vzácných druhů orchidejí, a tím snížit poptávku po rostlinách z volné přírody. V případě, že by došlo k úplnému vymizení střevíčníků na původních lokalitách, mohla by tato metoda dopomoci rostliny vrátit zpět do přírody.

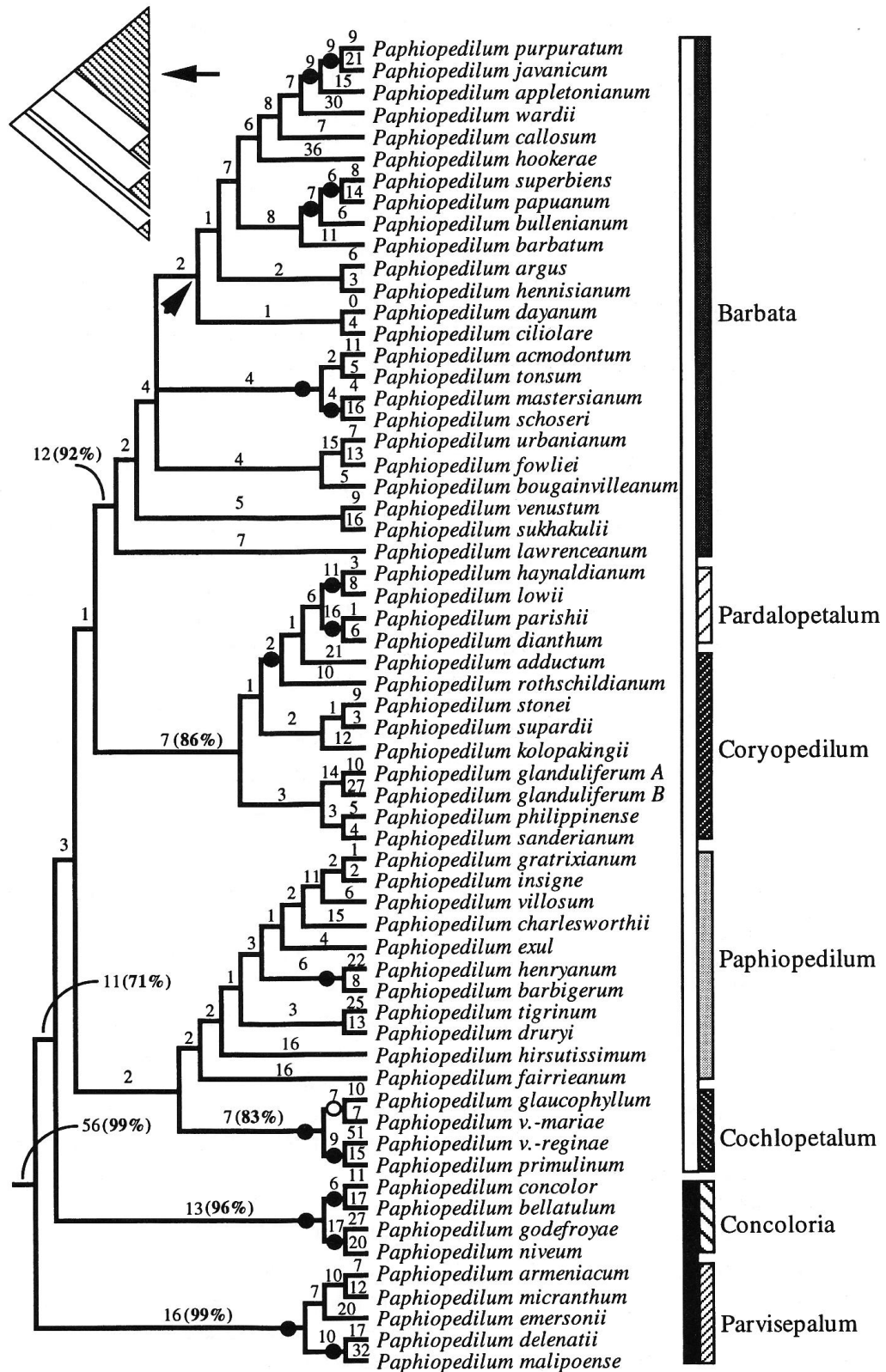
## 2. Literární přehled

### 2.1. Rod *Paphiopedilum*

Domovinou rodu *Paphiopedilum* je tropická Asie, kde se vyskytují ostrůvkovitě v nepočetných skupinách od jihozápadní Indie po Tichomořské ostrovy v nadmořských výškách 200 – 2300 m.n.m.

Dušek, Křístek (1986) uvádí, že rod *Paphiopedilum* patří do subtribu *Cypripedilinae* spolu s dalšími třemi rody orchidejí (*Phragmipedium*, *Selenipedium*, *Cypripedium*). Tuto skupinu charakterizuje především pantoflíčkovitě utvářený pysk a srostlé spodní sepaly. Od doby, kdy byl rod *Paphiopedilum* objeven a pojmenován v roce 1886 Pfitzerem, se systém tohoto rodu několikrát změnil. Dlouho uznávaný systém podle Pfitzera z roku 1903, kdy autor člení rod na 15 sekcí spadajících do tří podrodů, použili i výše zmínění autoři Dušek, Křístek (1986). Zde je vidět, jak dlouho přetrvávalo Pfitzerovo rozdělení. Nejnovější a dosud zřejmě nejpřesnější rozdělení provedl Cribb (1998), který rozděluje rod *Paphiopedilum* na sedm podrodů čítajících 61 druhů. Toto rozdělení odpovídá příbuznosti druhů na základě genetických analýz, které provedl Cox at al. (1997) (Obr.1).





Obr.1. Fylogenetické členění rodu *Paphiopedilum* na základě sekvence DNA navržené Cribbem (1998).

## 2.2. Popis studovaných druhů

Dále uvedený popis studovaných druhů (*P. niveum*, *P. villosum*, *P. glaucophyllum*, *P. charlesworthii*) je založen na údajích Cribba (1998).

### 2.2.1. *Paphiopedilum niveum* (Obr. 2)



**Obr. 2.** Kresba *Paphiopedilum niveum* (<http://www.goreorchids.com/GalleryStorage/paph-niveum.jpg>, 15.3. 2009)

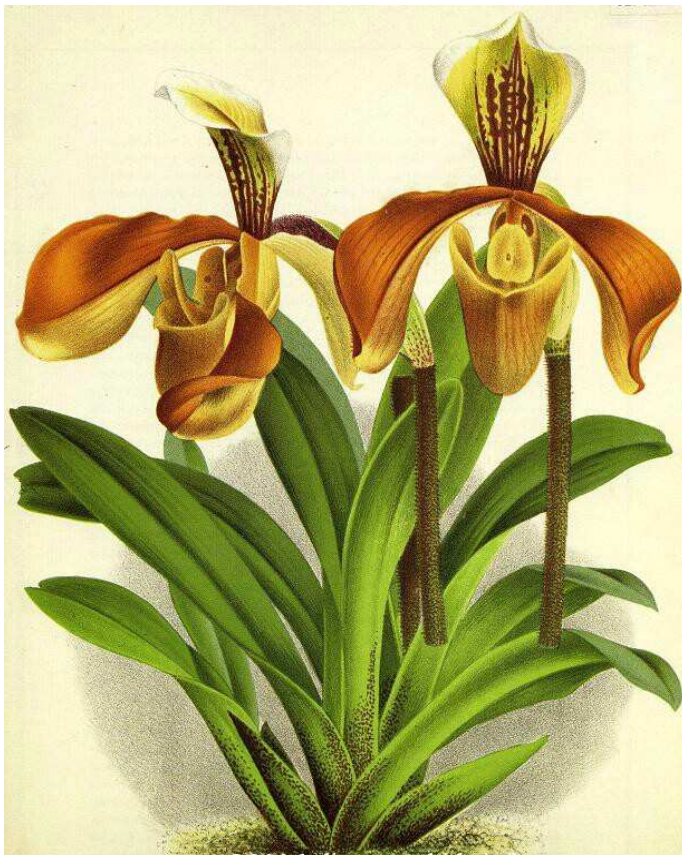
Listová růžice je složená ze 4- 6 listů. Listy jsou pásovité až úzce eliptické, ve vrcholu zaokrouhlené a nepatrně vykrojené, 8- 19 cm dlouhé, 2,3-3,6 cm široké, svrchu velmi tmavé i světle zelené a bíle skvrnitě, naspođu purpurově silně tečkované, nálevkovité na bazálních okrajích. Květenství dlouhé 6- 25 cm se skládá z 1-2 květů; květní stvol je dlouhý až 20 cm, purpurový, brzy však hustě pokryt bílými chlupy; listeny podélně složené, široce vejčité, tupé, 11- 14 mm dlouhé a 10- 12 mm široké, bílé až bledě zelené, purpurově skvrnitě. Květy

jsou bílé, velmi často purpurově tečkované směrem ke střední části květu i na přední straně pysku, který žlutne středem ke sloupku, pysk v průměru 6- 8 cm , chlupatý (pýřitý) na vnější straně a v základu petal uvnitř; semeník 4,5 cm dlouhý, zelený s tmavě purpurovým žíháním, hustě krátce ochlupený. Dorzální sepala je velmi zřídka vejčitá s tupě vykrajovanými okraji, 2,7- 4,2 cm dlouhá, 3-5 cm široká. Klenutá synsepala (větvená struktura vzniklá částečným nebo úplným srůstem dvou nebo více

sepal) je vejčitá, tupá, 2-3 cm dlouhá, 1,5-3 cm široká. Petaly jsou oválné (eliptické), zakulacené, 3,3- 4,3 cm dlouhé, 2,2- 3,9 cm široké, krátce nálevkovité na okrajích. Pysk je menší, vejčitý až elipsovité s podvinutými okraji 2,2- 3,6 cm dlouhý, 1,5- 1,8 cm široký. Sloupek je širší než delší, napříč subeliptický na vrcholu 1- 3 zubí, 6- 9 mm dlouhý, 10- 12 mm široký.  $2n = 26$ .

**Rozšíření:** Severní Malajsie, Jižní Thajsko, růst do nadmořské výšky 200 m.n. m.

### 2.2.2. *Paphiopedilum villosum* (Obr. 3)



**Obr. 3.** Kresba *Pap. Villosum*  
([http://www.slipperorchids.info/paphspecies/Lindenial1887\(03\)132\(villosum\).jpg](http://www.slipperorchids.info/paphspecies/Lindenial1887(03)132(villosum).jpg), 15.3. 2009)

*Paph. villosum* je epifytická, zřídka litofyticky (na skalách) rostoucí rostlina, často vytvářející shluky trsů. Růžice se skládá z 4-5 listů. Listy jsou podélně jazykovité, špičaté až ostré na nerovnoměrně dvojlaločném vrcholu, 14 – 42 cm dlouhé, 2,5 – 4 cm široké, na spodní straně listu světle zelené, při bázi listu fialově skvrnitě, bazální části nálevkovité. Stvol je téměř vzpřímený až obloukovitý, nese jeden květ. Stvol je 7 – 24 cm dlouhý s fialovými chlupy; listen je eliptický, tupý, 3,7 – 6,5 cm dlouhý, 3 – 3,8 cm široký,

zelený se skvrnami kaštanové barvy, lysý. Květ je 7,5 – 13,5 cm velký (napříč). Spodní sepala je zelená s bílým okrajem, lesklá, ve středu s lesklými kaštanovými oblastmi. Synsepala je světle zelená; petaly lesklé, červenohnědé se ze středu vedoucími kaštanovými pruhy. Pysk okrový, zevnitř růžový nebo do červena. Sloupek je žlutý se žlutým nebo zeleným středovým výstupkem; stopka a semeník na průřezu

trojúhelníkovitého tvaru, 3 – 6 cm dlouhý, okrově zbarvený, hustě pokrytý fialovými chlupy. Dorsální sepala je obvejčitá, subakutní, 3,8 – 7,6 cm dlouhá, 1,8 – 2,6 cm široká. Petaly jsou zakřivené, obvejčito-lopátkovité, s tupě vykrajovanými okraji, zaoblená špička, 4,7 – 8,6 cm dlouhé, 2,5 – 4,6 cm široké, hladké, nálevkovité, při bázi fialově chlupaté. Pysk zužující se ke špičce je 4 – 6,8 cm dlouhý, 3 – 3,8 cm široký, Sloupek obsrdčito-vejčitý zkrácený, 16 mm dlouhý, 14 mm široký, bradavičnatý, chlupatý, s hladkým výstupkem na středu.  $2n = 26$ .

**Rozšíření:** Severovýchodní Indie, Myanmar (Barma), Thajsko, růst v nadmořské výšce mezi 1100 – 2000 m. n. m.

### 2.2.3. *Paphiopedilum glaucophyllum* (Obr. 4)

*Paph. glaucophyllum* je litofyticky rostoucí rostlina s 1 – 3 trsy listových růžic. Každá z nich nese 4 – 6 nahloučených listů, podélně eliptických, pentlicovitě zformovaných. Listy jsou tupé nebo kulaté, 20 – 28,5 cm dlouhé, 4,5 – 5,3 cm široké,



**Obr. 4.**

Kresba *Paph. glaucophyllum* (<http://gallery.photo.net/photo/6329098-lg.jpg>, 15.3. 2009).

nálevkovité. Okraje listů jsou při bázi ojíňené, v mládí stěží viditelné. Stvol nese 20 nebo více květů; je 15 – 20 cm dlouhý, zelený, posetý fialovými skvrnami, osa květenství je přes 5 cm dlouhá; listeny eliptické, tupé, 1,5 – 1,8 cm dlouhé, zelené, nálevkovité (trychtýřovité). Květy se tvoří popořadě, nikdy se mohou otevřít

2 najednou. Květ je 8 – 8,5 cm velký; dorzální sepala bílá až krémová, ve středu žlutozelená, žilnatina výrazně kaštanová; petaly bílé, s fialovými skvrnami; pysk růžovo-fialový, posetý drobnými tmavě fialovými skvrnami, okraje světle žluté, sloupek zelený, ve vrcholové polovině výrazně fialový; stopka a semeník 4,5 – 6 cm dlouhé, krátce chlupaté, zelené, s nevýrazným nádechem do kaštanova. Dorzální sepala je vejčitá až široká, vejčitá, tupá s vroubkovaným okrajem, 2,8 – 3,3 cm dlouhá, 3 – 3,2 cm široká, chlupatá na vnější straně, krátce brvitá. Synsepala je vejčitá, tupá, 2,6 – 3,2 cm dlouhá, 1,5 – 1,8 cm široká. Petaly jsou skloněné v úhlu 10 – 20° pod horizontální rovinou, čárkovité, zašpičatělé, 4,4 – 5 cm dlouhé, 0,9 cm široké, spirálovitě stočené v apikální polovině, dlouze brvité, na bázi chlupaté. Pysk směrem k apexu není vyduť, 4 – 4,1 cm dlouhý, 2 cm široký, na bázi chlupatý. Sloupek je vejčitý, tupý, 10 – 15 mm dlouhý, 7 – 9 mm široký.  $2n = 36$ .

**Rozšíření:** Východní Jáva, rostoucí v nadmořské výšce 200 – 700 m. n. m.

#### 2.2.4. *Paphiopedilum charlesworthii* (Obr. 5)



**Obr. 5.** Kresba *Paph. Charlesworthii*  
([http://www.slipperorchids.info/paphspecies/Lindenia1894\(10\)443\(charlesworthii\).jpg](http://www.slipperorchids.info/paphspecies/Lindenia1894(10)443(charlesworthii).jpg), 15.3. 2009).

*Paph. charlesworthii* je terestricky rostoucí rostlina. Listy jsou tupě eliptické nebo lineárně-tupé, špičaté trojzubé na vrcholu, dlouhé 15 cm a 2,8 cm široké, shora zelené, na bázi fialově skvrnitě. Rostlina nese jeden květní stvol, dlouhý 8 – 15 cm, krátce chlupatý, světle zelený s mnoha kaštanovými skvrnami. Listen je obvejčitý, velmi tupý, 2,9 – 3,2 dlouhý, 1,4 – 2 cm široký, světle zelený, sytě kaštanově skvrnitý, jemně chlupatý. Květ je 8 cm velký,

dorzální sepala růžová s tmavší žilnatinou nebo občas s bílou; petaly světle žlutozelené s hnědou síťnatou žilnatinou; pysk růžovohnědý s tmavší žilnatinou. Sloupek bílý;

květní stopka a semeník je 2,8 – 3,9 cm dlouhý, světle zelený s tmavě kaštanovými skvrnami a je pokryt chloupky kaštanové barvy. Dorzální sepala je napříč eliptická až kulovitá, tupá, 4,4 – 5,7 cm dlouhá a 4,7 – 6,6 cm široká. Postranní okraje dorzální sepaly jsou ploché, nazpět ohnuté, jemně chlupaté na vnější straně. Synsepala je velmi malá, eliptická až špičatá, 3,8 – 4 cm dlouhá, 2 - 2,8 cm široká, světle žlutá, skvrnitá, se světle fialovou žilnatinou, bez jemných chlupů. Petaly se rozprostírají více či méně horizontálně, jsou nepatrně zahnuté dovnitř, jazykovité - lžicovité, tupé, 4 – 4,4 cm dlouhé a 2,6 – 2,7 cm široké, mírně chlupaté směrem k vrcholu. Pysk s širokým ústím do láčky je 3,8 – 4,3 cm dlouhý a 2,6 – 2,7 cm široký, uvnitř chlupatý. Sloupek je obvejčitý, 9 – 10 mm dlouhý, 10 mm široký, lysý, s centrálně se zvedajícím nažloutlým výstupkem.  $2n = 26$ .

**Rozšíření:** Myanmar, přiléhající Thajsko a jihozápadní Čína (Yunnan); 1200 – 1600 m. n. m.

## **2.3. Principy metod množení *in vitro***

### **2.3.1. Explantátové kultury *in vitro***

Explantátové kultury rostlin vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Jde o oddělení určité části ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny a umístění této části rostliny do sterilního prostředí, kde se kultivuje. V explantátových kulturách lze vyvolat růst a další vývoj základů orgánů, které již byly založeny na donorové rostlině. Rostlinné explantátové kultury tedy zahrnují izolaci buněk, pletiv a orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách (Novák, 1990).

### **2.3.2. Význam explantátových kultur**

Jedná se o metodu, při níž lze masově produkovat geneticky identický materiál cestou mikropropagace, a tím i rychle namnožit nově vyšlechtěné odrůdy a jiné ekonomicky či biologicky významné rostliny. Další a neméně důležité je uchovávání jednotlivých druhů i kultivarů v genetických bankách. Významné je též ozdravování rostlin a produkce bezvirózního materiálu. Z toho vyplývá produkce haploidních rostlin jako výchozího materiálu pro šlechtitelské programy jako například využití v

programech pracující s rekombinantní DNA (genové inženýrství) nebo somatická hybridizace a somaklonální variabilita.

(<http://old.mendelu.cz/~kizek/publikace/pdf/2006/>, 24. 2. 2008).

### 2.3.3. Obecné rysy médií

Kultivační médium je zdrojem energie, výživy a regulačních látek daného rostlinného explantátu. Složení kultivačního média je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v explantátových kulturách rostlin. Mezi nejčastěji používaná média patří

- MS (Murashige, Shoog, 1962)
- White (White, 1963)
- B5 (Gamborg et al., 1968)
- SH (Shenk, Hildebrant, 1968)
- Lloyd-McCown (Lloyd, McCown, 1981).

### 2.3.4. Charakteristika hlavních složek média

Média používaná pro kultivaci buněk, pletiv a orgánů obsahují obvykle následující složky:

- makroelementy
- mikroelementy
- sacharidy
- vitamíny
- aminokyseliny
- zpevňující látku
- růstové regulátory.

Mezi makroelementy řadíme dusík, fosfor, síru, draslík, vápník a hořčík. Koncentrace těchto prvků je rozdílná podle druhu použité rostliny. Mikroelementy dělíme na dva typy podle nutnosti použití, a to na nezbytné, kam patří železo, zinek, mangan, bor, měď a molybden, a na prvky, které nemusí být nezbytné. Do této skupiny řadíme kobalt, jód, sodík a chlor. Další nedílnou součástí kultivačních média jsou sacharidy, které slouží jako zdroj uhlíku a tím i energie. Běžně je používána sacharóza. Do médií se přidává z důvodu velmi omezené autotrofní výživy explantátů. Další nezbytné látky pro rostliny jsou vitamíny. Jedná se o katalyzátory mnoha metabolických procesů, jsou nezbytné pro správný růst a vývoj rostliny. Mezi nejčastěji používané vitamíny patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Další méně

používané vitamíny jsou biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin. Dostatek a správné množství vitamínů je limitujícím faktorem růstu explantátových kultur. Aminokyseliny slouží jako zdroj dusíku v organické formě, kterou rostlinné explantáty mohou přímo využít k syntéze proteinů. Dodávají se ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát), dále se často používá také L-glutamin, L-asparagin a glycin. Nedílnou součástí tuhých médií je zpevňovací látka, často se používá např. čistý jemnovločkový agar. Dají se ovšem použít i syntetické ztužovací látky jako Phytigel nebo gerlit. Růstové regulátory jsou látky buď fytohormony nebo jejich syntetické náhražky. Rostlinný hormon je organická sloučenina syntetizovaná v jedné části rostliny a translokovaná do části jiné, kde vyvolává fyziologickou reakci. Přirozené i syntetické růstové regulátory rozlišujeme na regulátory povahy stimulační (stimulátory) a povahy inhibiční (inhibitory). Stimulátory lze rozdělit do tří základních skupin: auxiny, cytokininy a gibereliny. Mezi tak zvané inhibitory patří kyselina abscisová a ethylen (Procházka at al., 1998). K běžně používaným přísadkám patří 6-benzylaminopurin (BAP), který byl do roku 1972 považován za syntetický cytokinin podporující regeneraci a buněčné dělení (Procházka at al., 1998). Horgan at al. (1972) objevil přítomnost *o*-hydroxy-benzyladeninu v listech topolu a tím dokázal přirozený původ této látky. Proto byly později souhrně nazývány *o*- a *m*-topoliny.

Kromě vitamínů, růstových regulátorů a dalších chemicky čistých složek se do médií někdy přidávají směsi látek biogenního původu, jejichž pozitivní účinek na růst explantátů je empiricky ověřen. Takovými přísadkami je např. kokosová voda nebo banánová dužina.

### **2.3.5. Obecné požadavky na přípravu médií**

Základem všech správně fungujících médií jsou kvalitní chemikálie, které by měly mít odpovídající čistotu (p.a.). Pokud pro přípravu média používáme zásobní roztoky, je nutné odebírat potřebné množství vždy čistým chemickým náčiním a nikdy nevracet přebytek zpět do láhve se zásobním roztokem. Pokud tyto zásobní roztoky nespotřebujeme, hned je umístíme do chladničky, kde po nějakou dobu vydrží v neporušeném stavu. Hotová média se po rozlití do lahví umístí do autoklávu, kde dojde při teplotě 121°C a tlaku 101,5 kPa ke sterilizaci a důkladnému propojení jednotlivých složek média (Vondruš, ústní sdělení).



### **2.3.6. Obecné požadavky na práci s rostlinným materiálem**

Pokud pracujeme se sterilní kulturou, jako je tomu v případě této práce, materiál umístíme do flow boxu, který běžel alespoň 15min před samotnou manipulací v něm (aby došlo k ustálení proudu vzduchu). Láhev s kulturou a všechny pracovní pomůcky, které do boxu vkládáme, povrchově desinfikujeme lihem. To se týká i nástrojů, které po desinfekci ještě opálíme nad kahanem. V druhém případě, kdy používaný materiál není sterilní, musíme rostlinný materiál před převodem do kultury desinfikovat řadou přípravků, při čemž může dojít k značnému poškození donoru. Desinfikujeme 10% roztokem Chloraminu B, 10% roztokem přípravku Domestos nebo 10% roztokem Sava s přídavkem smáčedla (TWEEN) na 10 min (Vondruš, ústní sdělení).

## 3. Metodika

### 3.1. POKUS Č. I

Cílem pokusu bylo ověřit, zda vybrané druhy rostlin tvoří ve vybraném druhu média protokormy při přidavku TDZ. Použil jsem jako základ médium Knudson C, které se osvědčilo pro výsevy semen daného rodu. K médiu jsem přidal směs růstových regulátorů a TDZ jako látku podněcující dediferenciaci a tvorbu protokormů. Pro porovnání jsem vytvořil dvě modifikace média: jednu s výše popsáním přívadkem regulátorů a TDZ, a druhou bez TDZ. Do obou jsem přidal agar a výsledkem bylo tuhé médium. Pro tento pokus jsem použil druhy *P. glaucophyllum*, *P. niveum*, *P. villosum*. Pokus byl zahájen 24. 2. 08 a ukončen 1. 4. 08.

#### 3.1.1. Použité médium

##### Složení média

Jako základ tuhého media jsem použil médium Knudson C, které bylo obohaceno o další složky (Tab. 1).

*Tabulka 1: Složení média použitého pro pokus č. I*

Knudson C		Přídavek	
Látka	Množství v g	Látka	Množství v mg
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1 g	Inositol	100 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g	Thiamin	3 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g	Glycin	3 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g	Adeninsulfát	10 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,025 g	TDZ	Záměrně neuvedeno
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,0075 g	BAP	0,5 mg
Sacharoza	20 g	IBA	0,1 mg
Agar	8 g	Glukoza	10 000 mg

#### 3.1.2. Příprava média

U přípravy média je třeba dodržet pořadí, v němž jsou přidávány jednotlivé složky, a je nutno provést přesné navážky u sypkých látek i odměření tekutých složek média. Jako základ celého média jsem použil 300 ml destilované vody, ve které jsem rozpustil přímou navážku sacharozy a inositolu, odměrným válcem (50 a 25ml) jsem odlil potřebné tekuté části média, zbytek jsem navážil na digitálních vahách a vše nalil a

vysypal do 800 ml kádinky. Abych docílil důkladného rozptýlení všech složek roztoku, kádinku jsem umístil do vodní lázně o teplotě přibližně 45°C.

Nedílnou součástí výroby média je úprava pH. Tu jsem měřil indikátorovými pH papírky Sigma s rozmezím 4,5 – 10 pH (stupnice po 0,5 pH). Hodnotu pH jsem pak upravoval na optimum pH=5,5 pomocí 1 M roztoku KOH nebo roztokem kyseliny citronové.

Následovalo rozpuštění 16 g velmi jemného a čistého agaru (firmy Oxoid) v 500 ml destilované vody. Roztok jsem zahříval ve vodní lázni při teplotě 98°C do rozpuštění partikulárních částí. U agaru nesmí dojít k tzv. „převaření“. Při něm totiž dochází k přerušení vodíkových můstků a agar by po vychladnutí nezuhl.

Do předem připraveného základního roztoku jsem přidal rozpuštěný agar a společně přelil do 2 l Erlenmeyerovy baňky. Dále jsem do vzniklé směsi přidal přídavek uvedený v tabulce 1, který by měl podpořit tvorbu protokormů u daných explantátů.

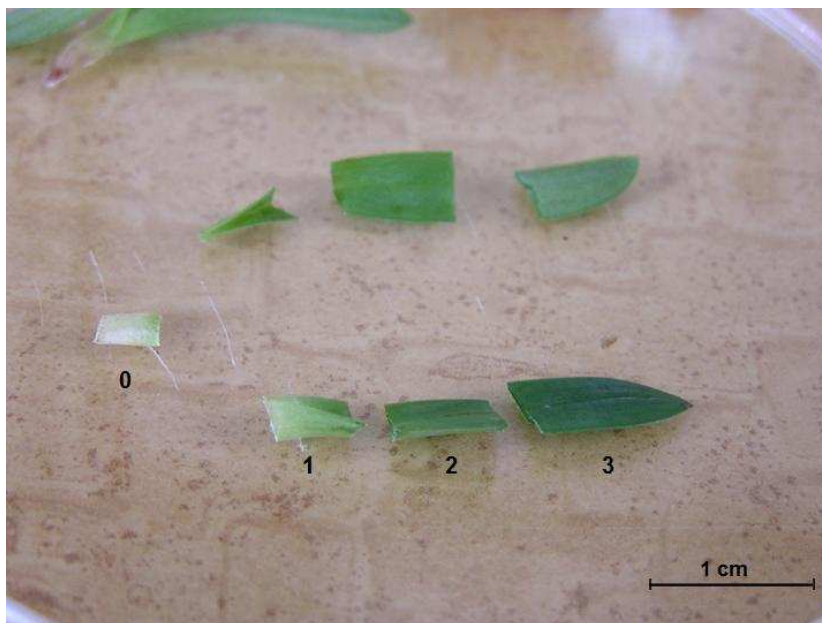
Nakonec jsem vše důkladně promíchal a připravené médium rozlil do předem saponátem umytých 100 ml infuzních lahví. Do každé jsem nalil cca 35 ml média a uzavřel pryžovými zátkami. Zátky byly opatřeny otvorem pro výměnu plynů, který byl vyplněn molitanem, aby do lahví nepronikal hmyz či jiný agresivní materiál, který by mohl znehodnotit médium. Láhve jsem nakonec zabalil do hliníkové folie.

Lahve jsem poté umístil do autoklávu, kde byly sterilizovány při teplotě 121°C a tlaku 101,5 kPa po dobu 23 min.

### **3.1.3. Příprava a umístění explantátu do média**

Přibližně 15 – 20 min před začátkem práce jsem zapnul flow box z důvodu ustálení proudu vzduchu a pracovní plochu boxu vydesinfikoval přípravkem Bacillol stop. Do boxu jsem naskládal láhve s médii a jejich povrch vydezinfikoval Bactoseptem. Nástroje jako pinzetu a skalpel jsem namočil do 70 % lihu a nad kahanem opálil. Dále jsem si na pracovní plochu připravil sterilní Petriho misky a láhve s materiálem na pokus. Jejich povrch jsem opět vydezinfikoval Bactoseptem. Z těchto sterilních lahví jsem vyndal pomocí sterilní pinzety potřebné množství donorového materiálu, lahev opět zavřel a nechal ji v boxu do doby ukončení práce.

Pokus jsem prováděl na třech druzích rodu *Paphiopedilum* o stáří cca 2 roky. Od každého druhu jsem použil 3 in-vitro napěstované donory. Donorové rostliny měly vždy



**Obr. 6.** Rozdělení a popis donorové rostliny. 0 – báze prýtu, 1 – spodní úsek listu, 2 – střední úsek listu, 3 – vrcholový úsek listu. Příklad: 1● → spodní úsek listu první rostliny

meristém a dále na spodní, střední a vrcholovou část každého listu (Obr. 6).

Rostlinu jsem vždy rozdělil do dvou médií, a to s přidavkem TDZ a bez TDZ. Část 0 jsem umístil 1x do média s TDZ a 1x do média bez přidavku TDZ. Jednotlivé části listu jsem mělce zanořil do média, láhev opět opatřil pryžovou zátkou a láhev popsal. Po každé zpracované rostlině jsem nástroje dezinfikoval, aby nedošlo k přenosu infekce do další lahve. Takto jsem zpracoval vždy 10 lahví pro každý druh média (s nebo bez TDZ). Celkem jsem připravil 60 lahví explantátových kultur, které jsem druhý den přepravil do klimaboxu, který měl nastavenou délku světelné a temné periody na 12/12 h a teplotu 25°C/23°C. Nastavení vlhkosti klimaboxu (50%) nebylo pro experiment relevantní, protože v uzavřených láhvích s explantáty je zachována 100% vzdušná vlhkost.

### 3.2. POKUS Č. II

Cílem druhého pokusu bylo otestovat vhodnost média AK, které s úspěchem využívá Mgr. Vondruš pro vegetativní množení některých dalších druhů orchidejí, jako

dva listy. Rostliny jsem zbavil kořenů a odumřelých částí pletiv. Pinzetu a skalpel jsem opět steriloval. Jednotlivé rostliny v rámci téhož druhu jsem označil grafickým symbolem (●, +, -). Rostliny jsem rozřezal na bázi prýtu obsahující

je rod *Dendrobium* nebo rod *Phalaenopsis* z listových explantátů (Vondruš, ústní sdělení). AK je modifikace média MS vytvořená panem Mgr. Vondrušem. Pro účel mého pokusu byl přidán 6-benzylaminopurin (BAP), protože podporuje regeneraci a buněčné dělení, a dále TDZ a kokosová voda ke zmírnění negativních účinků TDZ. Opět byly vytvořeny dvě varianty. Do první byly přidány všechny zmiňované látky, kdežto do druhé nebylo přidáno TDZ. Nebyl přidán agar, takže vzniklo tekuté médium, které se umístilo spolu s explantáty na třepačku. Pro pokus jsem použil stejné druhy jako v předchozím pokusu, tj. *Paph. glaucophyllum*, *Paph. niveum*, a *Paph. villosum*. Také listové explantáty jsem připravil stejným způsobem. Dále jsem použil protokormy *P. charesworthii*. Pokus zahájen 20. 5. 2008 a ukončen 16. 4. 2008

### 3.2.1. Použité médium

#### Složení média

Složení média AK je uvedeno v tabulce č. 2

Tabulka 2: Složení média AK

Látka	Množství v g/mg	Látka	Množství na 1l v g/mg/ml
<b>Makroprvky:</b>	<b>A</b>	Inositol	100 mg
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	66 g	Thiamin	2,5 mg
KNO <sub>3</sub>	76 g	Glycin	2,5 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,8 g	Adeninsulfát	10 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	17,6 g	TDZ	Záměrně neuvedeno
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g	KIN	0,2 mg
<b>Mikroprvky:</b>	<b>B</b>	NAA	0,1 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg	Kokosová voda	175 ml
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2230 mg	BAP	3 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	860 mg	Sacharoza	25 g
	<b>C</b>	Glukoza	5 g
KI	83 mg		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	25 mg		
	<b>D</b>		
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2,5 mg		
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2,5 mg		
<b>Chelatizované železo:</b>	<b>E</b>		
Na – EDTA	7,45 g		
FeSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5,57 g		

### **3.2.2. Příprava základních roztoků pro médium MS**

Z uvedených základních skupin chemikálií označených A, B, C, D, E (tab. č. 2) jsem vytvořil zásobní roztoky; navážil jsem makroprvky A a kvantitativně jsem je přesypal do 2 l Erlenmaerovy baňky, kam jsem předem odměřil 300ml destilované vody. Tento roztok jsem dobře rozmíchal a poté dolil do 2l destilovanou vodou. Tento roztok jsem přelil do 2l PET lahve, uzavřel a umístil do chladničky. Ze skupiny mikroprvků B jsem stejným způsobem vytvořil zásobní roztok s tím rozdílem, že jsem připravený roztok doléval jen do objemu 1l. Stejně tak jsem postupoval u skupin C, D a E. Všechny lahve jsem označil podle skupin jako A, B, C, D, E.

### **3.2.3. Příprava samotného média AK:**

Do připravené 2l plastové odměrky jsem odlil cca 300ml destilované vody, do které jsem následně přidával odměřené množství jednotlivých částí média. Ze zásobního roztoku A jsem pomocí odměrného válce odměřil 100 ml a vylil do plastové odměrky. Postupně jsem takto odměřil i další zásobní roztoky označené B, C, D, E. Ze zásobních roztoků B, C, D jsem pomocí 50 ml odměrného válce odměřoval 20 ml, z roztoku E jsem odpipetoval 10 ml. Dále jsem přidal navážených 50 g sacharózy a 10 g glukózy. Dále jsem navážil 200 mg inositolu, 5 mg thiaminu, 5 mg glycinu a 20 mg adeninsulfátu. Aby medium fungovalo tak, jak má, musel jsem přidat růstové hormony. Na digitální váze s přesností 0,01 g jsem navážil 2 mg BAP (6-benzylaminopurin), 0,4 mg KIN (kinetin) a 0,2 mg NAA (kys.  $\alpha$ -naftyloctová). Ke vzniklé směsi jsem přilil 350 ml vody z nezralých kokosových ořechů. Tuto směs jsem doplnil do 2l destilovanou vodou. Vše jsem důkladně promíchal a následně rozlil do dvou plastových odměrek o objemu 1 l. Do jedné z odměrek jsem přisypal předem navážené množství TDZ, označil je a pH papírkem jsem změřil pH obou vytvořených médií. Naměřené pH splňovalo požadavky pro dané médium, tj. pH 5,5. Následovalo rozlití do lahví od dětské výživy, zavíčkování a přemístění lahví do autoclavu, kde došlo při teplotě 121°C a tlaku 101,5 kPa ke sterilizaci a dorozpuštění některých látek v médiu.

## **3.3. POKUS Č. III a IV**

Cílem pokusu č. III a IV bylo ověřit, zda se zamezí nekrotizaci řezných ploch explantátů použitím kokosové vody. Veškerý listový materiál jsem řezal pod hladinou

kokosové vody, aby nedošlo k zaplnění cévních svazků vzduchem a tím k pozdější nekrotizaci řezné plochy explantátu. Použil jsem médium AK s přídatkem BAP, TDZ a kokosové vody. Pro pokus č. III jsem připravil tekuté médium, pro pokus č. IV tuhé. Protože jsem chtěl ověřit působení kokosové vody na co nejrozmanitějším materiálu, použil jsem listové explantáty z druhů *Paph. glaucophyllum* a *Paph. villosum*, dále explantáty z kořene *Paph. glaucophyllum*, celé rostliny *Paph. charlesworthii*, a v pokusu č. IV navíc protokormy *Paph. charlesworthii*. Oba tyto pokusy byly založeny 25.10.08. Pokus č. III byl ukončen 5. 12. 08 a pokus č. IV byl ukončen 10. 2. 09.

### 3.3.1. Použité médium

#### Složení média pro pokus III a IV

Složení média pro teno pokus je uvedem v tabulce č.3.

*Tabulka 3: Složení média pro pokus č. III a IV*

Látka	Množství v g/mg	Látka	Množství na 1l v g/mg/ml
<b>Makroprvky:</b>	<b>A</b>	Inositol	100 mg
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	66 g	Thiamin	2,5 mg
KNO <sub>3</sub>	76 g	Glycin	2,5 mg
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	14,8 g	Adeninsulfát	10 mg
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	17,6 g	TDZ	Záměrně neuvedeno
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g	KIN	0,2 mg
<b>Mikroprvky:</b>	<b>B</b>	NAA	0,1 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg	Kokosová voda	175 ml
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	2230 mg	BAP	3 mg
ZnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	860 mg	Sacharoza	25 g
	<b>C</b>	Glukoza	5 g
KI	83 mg		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	25 mg		
	<b>D</b>		
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	2,5 mg		
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	2,5 mg		
<b>Chelatizované železo:</b>	<b>E</b>		
Na – EDTA	7,45 g		
FeSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	5,57 g		

### 3.3.2. Příprava základních složek pro médium MS

Při přípravě média jsem použil již hotové zásobní roztoky z předchozího pokusu.

### 3.3.3. Příprava samotného média AK

Postup přípravy média a navážky chemikálií i růstových regulátorů zůstaly stejné jako v předchozím pokusu č. II jen s tím rozdílem, že pro pokus č. IV jsem použil v tabulce uvedené množství agaru.

### 3.3.4. Příprava kokosové vody a explantátu

Pro pokus jsem použil kokosovou vodu z nezralých kokosových ořechů. Pro získání kokosové vody jsou dvě možnosti. Jednou z možností je zakoupit ji v plechovce, ale tady nemáme jistotu jak čistá kokosová voda je popř. zdali není naředěná pitnou vodou. Druhý způsob jak získat opravdu kvalitní a čistou kokosovou vodu je zakoupit nezralé kokosové ořechy, kde je kokosová voda sterilní a víme, že není ničím ředěná. Pro svou práci jsem zvolil druhý způsob. Nožem jsem odsekl vrchol kokosového ořechu a jeho obsah, tj. kokosovou vodu, jsem přelil do odměrky. Poté jsem ji rozlil do lahví od dětské výživy, uzavřel víčky a láhve popsal. Spolu s připraveným médiem jsem tyto označené láhve umístil do autoklávu a vysterilizoval za stejných podmínek jako médium. Po vyautoklávování jsem láhve přenesl k flow boxu, vydezinfikoval jsem láhve s médiem i kokosovou vodou 70% lihem a umístil do flow boxu.

Provedl jsem dezinfekci flow boxu, nástrojů a připravil si láhve s rostlinným materiálem. Do jedné sterilní petriho misky jsem nalil sterilní kokosovou vodu. Ve druhé jsem si připravil sterilní rostlinný materiál, který jsem zbavil zbytků média a nekrotizovaných částí. Lihem jsem opět očistil skalpel i pinzetu a opálil je nad kahanem. Pomocí pinzety jsem přenesl donorovou rostlinu do petriho misky s kokosovou vodou pod její hladinou nařezal jednotlivé explantáty. Každý jsem okamžitě po odříznutí umístil do lahve s médiem, uzavřel a láhve popsal. Takto jsem postupoval u listových explantátů *Paph. glaucophyllum*, *Paph. villosum*, kořenových explantátů *Paph. glaucophyllum* a dále i u celých rostlinek *Paph. charlesworthii*. Pro pokus č. III, tedy pro tekutou modifikaci média, jsem použil také protokormy *Paph. charlesworthii*, které jsem odebral z původního média a omyl je v kokosové vodě a umístil do lahve s tekutým médiem.

Pokus č. III, tj. tekutá modifikace média AK, jsem umístil na třepačku do kultivační místnosti, kde byla udržována konstantní teplota 22°C. Pokus č. IV byl



umístěn do klimaboxu s předem nastavenými kultivačními hodnotami (světelná a temnostní fáze denního cyklu 12/12 h, teplota 25°C a ozáření 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. POKUS Č. I

#### 4.1.1. Průběh pokusu:

Průběh pokusu je zdokumentován v tabulkách 4 – 7. V průběhu zhruba jeden a půl měsíce trvající kultivace došlo postupně k úhynu nebo znekrotizování řezných ploch všech explantátů. Při kontrole pokusu 11. 3. 08 *Paph. villosum* reagoval negativně na TDZ, což se projevilo nejvyšší mortalitou explantátů (50%) (tab. 5). O týden později (tab. 6) *Paph. villosum* v médiu s přídávkem TDZ nepřežil ani v jediném explantátu. U ostatních dvou druhů nebyly úhyny mezi variantou s TDZ a bez TDZ příliš rozdílné.

**Tabulka 4.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 6.3. 2008.  
Legenda k symbolům: ●, +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. OK – zelené explantáty, ½ - horní část explantátu žlutá (část v médiu zelená), X – zežloutlé explantáty.

<i>Paph. villosum</i>				<i>Paph. niveum</i>				<i>Paph. glaucophyllum</i>			
S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ	
Část	stav	Část	stav	část	stav	Část	stav	část	stav	část	Stav
0●	X	1●	Ok	1●	Ok	0●	X	0●	½	1●	Ok
1●	X	2●	Ok	2●	Ok	1●	Ok	1●	Ok	2●	Ok
2●	Ok	3●	Ok	3●	Ok	2●	Ok	2●	Ok	3●	X
3●	X	0+	X	0+	Ok	3●	Ok	3●	Ok	0+	Ok
1+	Ok	1+	X	1+	Ok	1+	½	1+	Ok	1+	Ok
2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok
3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok
1-	Ok	1-	Ok	1-	Ok	1-	Ok	1-	Ok	1-	Ok
2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok
3-	X	3-	Ok	3-	Ok	3-	Ok	3-	Ok	3-	X

**Tabulka 5.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 11.3. 2008.  
 Legenda k symbolům: ●, +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. OK – zelené explantáty, ½ - horní část explantátu žlutá (část v médiu zelená), X – zežloutlé explantáty.

<i>Paph. villosum</i>				<i>Paph. niveum</i>				<i>Paph. glaucophyllum</i>			
S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ	
Část	stav	Část	Stav	část	Stav	Část	stav	část	stav	Část	Stav
0●	X	1●	Ok	1●	Ok	0●	X	0●	X	1●	Ok
1●	X	2●	Ok	2●	Ok	1●	Ok	1●	Ok	2●	X
2●	X	3●	Ok	3●	Ok	2●	Ok	2●	Ok	3●	X
3●	X	0+	X	0+	Ok	3●	Ok	3●	Ok	0+	Ok
1+	Ok	1+	X	1+	½	1+	½	1+	Ok	1+	Ok
2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok
3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok	3+	½	3+	Ok
1-	Ok	1-	Ok	1-	Ok	1-	Ok	1-	Ok	1-	½
2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok
3-	X	3-	Ok	3-	Ok	3-	Ok	3-	Ok	3-	X

**Tabulka 6.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 25.3. 2008.  
 Legenda k symbolům: ●, +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. OK – zelené explantáty, ½ - horní část explantátu žlutá (část v médiu zelená), X – zežloutlé explantáty.

<i>Paph. villosum</i>				<i>Paph. niveum</i>				<i>Paph. glaucophyllum</i>			
S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ	
Část	stav	část	Stav	část	Stav	Část	stav	část	stav	Část	Stav
0●	X	1●	Ok	1●	Ok	0●	X	0●	X	1●	Ok
1●	X	2●	Ok	2●	Ok	1●	Ok	1●	Ok	2●	X
2●	X	3●	Ok	3●	X	2●	X	2●	Ok	3●	X
3●	X	0+	X	0+	X	3●	Ok	3●	X	0+	Ok
1+	X	1+	X	1+	X	1+	X	1+	X	1+	Ok
2+	X	2+	X	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok
3+	X	3+	X	3+	Ok	3+	Ok	3+	X	3+	Ok
1-	X	1-	Ok	1-	X	1-	½	1-	Ok	1-	X
2-	X	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok	2-	Ok
3-	X	3-	X	3-	Ok	3-	Ok	3-	X	3-	X

**Tabulka 7.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 1.4. 2008. Legenda k symbolům: ●, +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. OK – zelené explantáty, ½ - horní část explantátu žlutá (část v médiu zelená), X – zežloutlé explantáty.

<i>Paph. villosum</i>				<i>Paph. niveum</i>				<i>Paph. glaucophyllum</i>			
S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ	
Část	Stav	část	Stav	část	Stav	Část	stav	část	stav	Část	Stav
0●	X	1●	X	1●	½	0●	X	0●	X	1●	X
1●	X	2●	X	2●	X	1●	X	1●	½	2●	X
2●	X	3●	X	3●	X	2●	X	2●	X	3●	X
3●	X	0+	X	0+	X	3●	X	3●	X	0+	X
1+	X	1+	X	1+	X	1+	X	1+	X	1+	X
2+	X	2+	X	2+	X	2+	X	2+	X	2+	X
3+	X	3+	X	3+	X	3+	X	3+	X	3+	X
1-	X	1-	½	1-	X	1-	X	1-	X	1-	X
2-	X	2-	X	2-	X	2-	X	2-	X	2-	X
3-	X	3-	X	3-	X	3-	X	3-	X	3-	X

#### 4.1.2. Zhodnocení pokusu:

Protože postupně odumřely veškeré explantáty ve variantách s TDZ i bez TDZ, je možné, že explantátům nevyhovovalo složení média. Proto jsem pro následující pokus č. II použil jiné složení kultivačního média. Pro další pokus jsem na doporučení Mgr. Vondruše zvolil médium AK.

## 4.2. POKUS Č. II

#### 4.2.1. Průběh pokusu:

Pokus probíhal 27 dní. Po této době musel být ukončen kvůli závadě na třepače. Průběh pokusu je zdokumentován v tabulkách č. 8. a 9. Během pokusu došlo ke zvětšení protokormů *Paph. charlesworthii* (možno vidět pod tab. 9). U *Paph. villosum* ve variantě s TDZ došlo již v prvním týdnu k nekrotizaci řezných ploch explantátů a tím k znehodnocení celého segmentu. U *Paph. niveum* a *Paph. glaucophyllum* nebyly pozorovány výrazné rozdíly v úhynu explantátů mezi jednotlivými variantami s TDZ a bez TDZ. Dále je pod tabulkou č. 8. a 9. vidět stav celých rostlinek *Paph. villosum*, *Paph. niveum*, *Paph. glaucophyllum*, ty byly umístěny v médiu s příměsí TDZ. Po týdnu kultivace byly rostliny zelené a nejevily známky nekrotizace řezné plochy ani jednotlivých listů. Při další kontrole, jak je uvedeno pod tabulkou č. 9, byla zjištěna

znekrotizovaná báze *Paph. villosum*. *Paph.niveum* bylo v pořádku a u *Paph. glaucophyllum* došlo k zasychání špiček explantátu.

**Tabulka 8.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 4.6.2008.  
Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - znekrotizovaná řezná plocha a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé

<b>Listové explantáty</b>											
<i>Paph. villosum</i>				<i>Paph. niveum</i>				<i>Paph. glaucophyllum</i>			
S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ	
Část	Stav	část	stav	část	stav	Část	stav	část	stav	Část	Stav
1+	½	1+	Ok	1+	Ok	1+	Ok	1+	Ok	1+	Ok
2+	Ok	2+	½	2+	Ok	2+	X	2+	Ok	2+	Ok
3+	½	3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok	3+	Ok
1-	½	1-	Ok	1-	X	1-	Ok	1-	½	1-	Ok
2-	½	2-	½	2-	½	2-	Ok	2-	½	2-	Ok
3-	½	3-	½	3-	Ok	3-	½	3-	Ok	3-	X
<b>Celé rostlinky</b>											
	Ok				Ok				Ok		
<b>Protokormy <i>Paph. charlesworthii</i> (10ks) v TDZ</b>											
OK											

**Tabulka 9.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 12.6.2008.  
Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - znekrotizovaná řezná plocha a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé

<i>Paph. villosum</i>				<i>Paph. niveum</i>				<i>Paph. glaucophyllum</i>			
S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ		S TDZ		Bez TDZ	
Část	Stav	část	stav	část	stav	Část	stav	část	stav	Část	Stav
1+	X	1+	½	1+	Ok	1+	X	1+	½	1+	½
2+	½	2+	X	2+	½	2+	X	2+	½	2+	½
3+	X	3+	½	3+	½	3+	X	3+	½	3+	½
1-	X	1-	½	1-	X	1-	½	1-	X	1-	½
2-	X	2-	X	2-	½	2-	Ok	2-	X	2-	½
3-	X	3-	X	3-	Ok	3-	½	3-	Ok	3-	X
<b>Celé rostlinky v TDZ</b>											
Znekrotizovaná báze					Ok			zasychání od špičky expl.			
<b>Protokormy <i>Paph. charlesworthii</i> (10ks) v TDZ</b>											
Zvětšené											

#### 4.2.2. Zhodnocení pokusu:

Přes krátké trvání pokusu bylo z výsledků zřejmé, že řezné plochy explantátů nekrotizovaly v obou variantách. Hledali jsme tedy způsob, jak eliminovat negativní vliv poškození pletiva při přípravě explantátů. Jednou z možností je řezat rostlinný materiál pod hladinou rostlinných extraktů (Burkhard, 1989). Autor uvádí, že by se

tímto způsobem mělo zabránit nasátí vzduchu do cévních svazků rostlinného explantátu a následnému nekrotizování řezné plochy daného segmentu popř. celého explantátu v důsledku neprůchodu živin a růstových regulátorů z média. Rostlinné extrakty dále obsahují nezjištěné množství látek pozitivně ovlivňující stav rostlinných explantátů. Také zmírňují negativní reakci na stres díky nespecifickému množství nativního kinetinu.

### 4.3. POKUS Č. III

#### 4.3.1. Průběh pokusu:

Průběh pokusu je zdokumentován v tabulkách č. 10 – 12. Nekrózy bazálních částí explantátů se vyskytovaly i v tomto pokusu. V Tabulkách č. 10 – 12. nejsou vidět výrazné rozdíly v nekrotizaci mezi různými typy segmentů, ani mezi studovanými druhy rodu *Paphiopedilum*. Na apikální řezné ploše střední části listu se netvořily nekrozy na rozdíl od bazální části téhož segmentu. Poslední zbylé explantáty bez nekrotizací řezných ploch jsem přepasážíval 30.11. 08. Všechny přepasážívané explantáty zkontaminovaly a následně uhynuly.

**Tabulka 10.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 2. 11. 08.  
 Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - zaschlá báze a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé, N - segment nezařazen do pokusu

<i>Paph. villosum</i>		<i>Paph. glaucophyllum</i>		<i>Paph. charlesworthii</i> rostliny	
Tekuté médium s TDZ		Tekuté médium s TDZ		Tekuté médium s TDZ	
Část	Stav	Část	Stav	rostlina	Stav
1+	X	1+	½	1●	Ok
2+	Ok	2+	X	2+	Ok
3+	Ok	3+	Ok	3-	X
1-	N	1-	N		
2-	Ok	2-	Ok		
3-	½	3-	Ok		

**Tabulka 11.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 26. 11. 08. Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - zaslá báze a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé, N - segment nezařazen do pokusu

<i>Paph. villosum</i>		<i>Paph. glaucophyllum</i>		<i>Paph. charlesworthii</i> rostliny	
Tekuté médium s TDZ		Tekuté médium s TDZ		Tekuté médium s TDZ	
Část	Stav	Část	Stav	rostlina	Stav
1+	X	1+	X	1●	Ok
2+	Ok	2+	X	2+	X
3+	X	3+	Ok	3-	X
1-	N	1-	N		
2-	Ok	2-	½		
3-	X	3-	Ok		

**Tabulka 12.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 30. 11. 08. Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - zaslá báze a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé, N - segment nezařazen do pokusu

<i>Paph. villosum</i>		<i>Paph. glaucophyllum</i>		<i>Paph. charlesworthii</i> rostliny	
Tekuté médium s TDZ		Tekuté médium s TDZ		Tekuté médium s TDZ	
Část	Stav	Část	Stav	rostlina	Stav
1+	X	1+	X	1●	Ok
2+	Ok	2+	X	2+	X
3+	X	3+	Ok	3-	x
1-	N	1-	N		
2-	Ok	2-	X		
3-	x	3-	Ok		

#### 4.3.2. Zhodnocení pokusu:

Pokus prokázal, že v použitém tekutém médiu jsou explantáty schopny přežít bez nekróz na řezných plochách nejméně 36 dní. Během této doby se však nezačaly tvořit na řezných plochách protokormy.

### 4.4. POKUS Č. IV

#### 4.4.1. Průběh pokusu:

Průběh pokusu č. IV je zaznamenán v tabulkách č. 13- 16. Z těchto tabulek je zřejmý pozitivní vliv média na *Paph. villosum*, které přežívalo nejdéle a v nejvyšším počtu do doby, než došlo k znekrotizování řezných ploch explantátu. Dále jsem použil 2 explantáty z kořene *Paph. Glaucophyllum*. Stav těchto explantátů jsem do tabulek neuvedl, protože došlo k úhynu explantátů během několika dní od začátku kultivace.

**Tabulka 13.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 1.11.08.  
 Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - zaschlá báze a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé, N - segment nezařazen do pokusu

<i>Paph. villosum</i>		<i>Paph. glaucophyllum</i>		<i>Paph. charlesworthii</i> rostliny	
Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ	
Část	Stav	Část	Stav	rostlina	Stav
1+	Ok	1+	X	1●	Ok
2+	Ok	2+	Ok	2+	Ok
3+	Ok	3+	Ok	3-	Ok
1-	N	1-	N		
2-	Ok	2-	Ok		
3-	X	3-	Ok		

**Tabulka 14.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 25.11. 08.  
 Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - zaschlá báze a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé, N - segment nezařazen do pokusu

<i>Paph. villosum</i>		<i>Paph. glaucophyllum</i>		<i>Paph. charlesworthii</i> rostliny	
Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ	
Část	Stav	Část	Stav	rostlina	Stav
1+	Ok	1+	X	1●	Ok
2+	Ok	2+	Ok	2+	X
3+	Ok	3+	X	3-	Ok
1-	N	1-	N		
2-	Ok	2-	Ok		
3-	X	3-	Ok		

**Tabulka 15.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 15.1. 09.  
 Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - zaschlá báze a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé, N - segment nezařazen do pokusu

<i>Paph. villosum</i>		<i>Paph. glaucophyllum</i>		<i>Paph. charlesworthii</i> rostliny	
Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ	
Část	Stav	Část	Stav	rostlina	Stav
1+	½	1+	X	1●	Ok
2+	½	2+	X	2+	X
3+	½	3+	X	3-	Ok
1-	N	1-	N		
2-	½	2-	Ok		
3-	X	3-	½		



**Tabulka 16.** Stav explantátových kultur úseků listů studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* k 10.2. 09.  
 Legenda k symbolům: +, - označení jednotlivých rostlin v rámci téhož druhu. ½ - zaschlá báze a zbytek explantátu zelený, X - celé odumřelé, N - segment nezařazen do pokusu

<b><i>Paph. villosum</i></b>		<b><i>Paph. glaucophyllum</i></b>		<b><i>Paph. charlesworthii</i> rostliny</b>	
Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ		Tuhé médium s TDZ	
Část	Stav	Část	Stav	rostlina	Stav
1+	½	1+	X	1●	X
2+	½	2+	X	2+	X
3+	½	3+	X	3-	X
1-	N	1-	N		
2-	X	2-	Ok		
3-	X	3-	X		

#### 4.4.2. Zhodnocení pokusu:

Při tomto pokusu se podařilo prodloužit životnost některých explantátů na dobu nejméně 108 dní. Na živých explantátech však opět došlo k nekrotizacím řezných ploch a nepodařilo se vyvolat tvorbu protokormů.

## 5. Souhrnná diskuse

Tato metoda, ale za použití jiných médií je běžně a úspěšně používána pro množení různých druhů komerčně množných druhů orchidejí, ať už se jedná o hybridy či některé botanické druhy snáze pěstovatelné v domácích podmínkách. Jedná se například o některé druhy rodu *Phalaenopsis*, *Dendrobium*, *Cattleya* atd. Pro rod *Paphiopedilum* podle dostupných informací tato metoda používána není. Pokud ano, je z komerčních důvodů utajená. Domnívám se však, že tato metoda skutečně používána není. Nean Lee (2004) uvádí ve své studii, že v roce 2002 bylo exportováno z Taiwanu 717, 97 mil. kusů orchidejí rodu *Phalaenopsis* a „pouze“ 1, 08 mil. kusů orchidejí rodu *Paphiopedilum*. Zde je vidět výrazný nepoměr mezi rodem *Phalaenopsis*, kde jsou listové explantáty zvládnuté a není problém jich vyprodukovat velké množství, a rodem *Paphiopedilum*, který je pěstitelsky náročnější, ať už jde o výsevy či jakékoli typy explantátů.

Nejsnazší způsob, jak namnožit rostliny rodu *Paphiopedilum* je metoda dělení trsu. Tato metoda je však ekonomicky neefektivní pro nedostatek matečných rostlin a také proto, že matečné rostliny nejsou schopné produkce takového množství odnoží, jakého by bylo potřeba pro uspokojení poptávky. Většina vyprodukovaných rostlin rodu *Paphiopedilum* pochází z aseptických výsevů *in vitro*. Tato, stejně jako každá jiná metoda, má svá rizika. Největším problémem je převod mladých rostlin z podmínek *in vitro* do podmínek *ex vitro*. V této fázi dochází k úhynu až 70% rostlin. Jinou možností, jak množit rod *Paphiopedilum*, jsou metody rostlinné regenerace z kalusového pletiva (Yung-Haw Lin at al., 2000), kdy se vytvoří protokormy, ze kterých se dále diferencují jednotlivé rostlinné orgány.

Na podkladě dosavadních zkušeností se ukazuje, že některé postupy je třeba dále vylepšovat. Jednou z možností, jak získat dostatečné množství protokormů, je zastavení diferenciace rostlinných orgánů z kalusového pletiva ve fázi protokormu a umístění takto získaného malého množství protokormů na množivé médium. Tím dojde k množení protokormů až do doby, než jej zastavíme přepasážením na médium, které svým složením podpoří diferenciaci protokormů na jednotlivé rostliny.

## **6. Závěr**

V práci byla testována metoda iniciace protokormů u vybraných druhů rodu *Paphiopedilum* pomocí aplikace TDZ v explantátových kulturách. Výsledky ukázaly, že metodu nelze bez dalších úprav aplikovat na rod *Paphiopedilum*. Alternativní možností je diferenciací protokormů z kalusového pletiva.

## 7. Literatura

- Singchi C., Zhanhuo T., Yibo L. (1999): Native Orchids in China in Colour. Science Press, Beijing, New York.
- Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50, 151 – 158.
- Lloyd, G.; McCown, B. (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- White P. R. (1963). The cultivation of animal and plant cell, 2nd Ed. New York: Ronald.
- Schenk R. V. & Hildenbrant A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50, 199-204.
- Cribb P. (1998): The Genus *Paphiopedilum*, Second Edition. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu and Royal Botanic Gardens, Kew.
- Novák F. J. (1990): Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin, Academia, Praha.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998): Fyziologie rostlin, Academia, Praha.
- Neen Lee (2004): APOC8 (Asia Pacific Orchid Conference): Proceedings of 8th Asia Pacific Orchid Conference.
- Yung-Haw Lin at al. (2000): Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *Journal of Plant Biotechnology* 62: 21 – 25.
- Burkhard J., (1989), Prostředek pro zvýšení účinnosti klíčení orchidejových semen, Úřad pro vynálezy a objevy, popis vynálezu 253 987.
- Horgan at al. (1972), Simple spectrophotometric estimation of ATPase and calcium activities of sarcoplasmic reticulum preparations. *Anal. Biochem.* 48: 147 – 152.

**Internetové zdroje:**

<http://old.mendelu.cz/~kizek/publikace/pdf/2006/>

www.cites.org