

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Provozně podnikatelský obor

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Ověření možností kultivace orchideje *Macodes petola* technikami *in vitro*

Vedoucí diplomové práce: Ing. Karel Suchý, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Bohumil Vondruš

Autor: Irena Attlová

České Budějovice, duben 2011

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

29. 4. 2011

Irena Attlová

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce Ing. Karlu Suchému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce.

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na ověřování metod kultivace tropické terestrické orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl technikami *in vitro*. Do prostředí *in vitro* byly kultivovány jednonodové rostlinné explantáty orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl na úrovni primokultury. Cílem diplomové práce bylo ověření citlivosti rostlinných explantátů této orchideje na různé metody povrchové sterilizace, včetně optimalizace složení vhodného sterilizačního činidla a délky jeho působení. Rostlinné explantáty orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl byly převáděny na živná agarová média. Povrchová sterilizace rostlinných explantátů byla prováděna různými desinfekčními prostředky o různých koncentracích. Nejlepších výsledků při kultivaci orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl bylo dosaženo prováděním povrchové sterilizace rostlinných explantátů v 70 % etanolu po dobu 15 sekund a následně v 2,5% roztoku desinfekčního prostředku Savo po dobu 20 minut.

Klíčová slova: *Macodes petola* (Bl.) Lindl, rostlinné explantáty, množení *in vitro*, *Orchidaceae*

Summary

This thesis is focused on verifying *in vitro* cultivation techniques in micropropagation of tropical terrestrial orchid *Macodes petola* (Bl.) Lindl. The aim of the studies was to verify the responsiveness of the node explants of *Macodes petola* (Bl.) Lindl to different surface-sterilization methods and duration of sterilization time, as well as the transport of the node explants to agar medium. Node explants of *Macodes petola* (Bl.) Lindl were surface-sterilized with different disinfectants for different sterilization time and cultivated in primordial culture. The best results were observed by using sequential surface sterilization in ethyl alcohol (70%) and disinfectant Savo (2.5%) - ethyl alcohol being used for 15 seconds and Savo for 20 minutes.

Key words: : *Macodes petola* (Bl.) Lindl, *in vitro* micropropagation, *Orchidaceae*

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	11
2.1 Vstavačovitě rostliny.....	11
2.1.1 Čeleď: Vstavačovitě (Orchidaceae)	11
2.1.2 Stáří čeledi Orchidaceae	11
2.1.3 Členění orchidejí	12
2.1.4 Znaky rostlinného těla vstavačovitých rostlin.....	15
2.1.5 Rozšíření orchidejí ve světě.....	17
2.1.6 Historie pěstování orchidejí	18
2.1.7 Využití orchidejí.....	19
2.1.8 Rozmnožování orchidejí.....	20
2.1.9 Mykorrhiza a mykotrofie u vstavačovitých rostlin.....	23
2.1.10 Ochrana orchidejí.....	25
2.2 Pěstování rostlin v kulturách <i>in vitro</i>	26
2.2.1 Kultivace rostlin v podmínkách <i>in vitro</i>	26
2.2.2 Metody kultivace rostlin v podmínkách <i>in vitro</i>	27
2.2.3 Význam používání explantátových kultur rostlin.....	29
2.2.4 Fáze mikropropagace	30
2.2.5 Sterilizace rostlinného materiálu	31
2.2.6 Složení kultivačních médií.....	32
2.3 Orchidej <i>Macodes petola</i> (Bl.) Lindl	36
3. METODIKA.....	39
3.1 Rostlinný materiál	39
3.2 Technické vybavení používané při práci	39
3.3 Pomůcky a chemikálie používané při práci	40
3.4 Sterilita prostředí a nástrojů	40
3.5 Agarové médium.....	41
3.6 Metody převodu rostlinných explantátů na agar	41

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	47
5. ZÁVĚR	55
6. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ	56

1. ÚVOD

Vstavačovitě rostliny (čeleď *Orchidaceae*) jsou jednou z nejpočetnějších skupin cévnatých rostlin na světě. V této rostlinné čeledi se nachází velmi rozmanitá škála rostlinných druhů, z nichž některé rostou v zemi, jiné uchycené na kmenech stromů, další druhy jsou vázány na biotopy tropických deštných lesů, zatímco jiné druhy orchidejí jsou schopny přežít i teploty pohybující se pod 0°C. Většina orchidejí zaujímá pozornost velkými, pestře zbarvenými květy, některé jsou okrasné svým listem. Do poslední skupiny patří i tropická orchidej *Macodes petola* (Bl.) Lindl.

Obliba orchidejí vzrůstá, a proto se jejich pěstování věnuje stále větší pozornost. Kultivace orchidejí v podmínkách *in vitro* tak významně přispívá k uspokojování potřeb spotřebitele.

Základním a velmi důležitým předpokladem pro úspěšné kultivování rostlin metodami *in vitro* je udržení sterilního prostředí v kulturách *in vitro*, k čemuž je nutné používat sterilní rostlinný materiál. Poněvadž rostliny nerostou ve sterilních podmínkách, je nutné je při zakládání kultur *in vitro* povrchově sterilizovat. Za tímto účelem se používají různé sterilizační prostředky a postupy; vždy je však nutné nalézt vhodný poměr mezi zničením mikroorganismů a zachováním životaschopnosti rostliny.

Cílem této diplomové práce je ověřit některé metody kultivace orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl technikami *in vitro*, ověřit citlivost této orchideje na různá desinfekční činidla, používaná k povrchové sterilizaci rostlinných explantátů, optimalizovat složení vhodného sterilizačního činidla a dobu jeho působení při povrchové sterilizaci rostlinných explantátů.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Vstavačovitě rostliny

2.1.1 Čeleď: Vstavačovitě (Orchidaceae)

Rostliny čeledi vstavačovitých (*Orchidaceae*) se botanicky řadí mezi krytosemenné jednoděložné rostliny. Podle NASHE a LA CROIX (2007) jsou vstavačovitě rostliny vytrvalé byliny, které mají poměrně nízké nároky na živiny. Celá čeleď vstavačovitých náleží do řádu *Orchidales* (vstavačokvěté). Mezi zástupce této čeledi žijící v přírodě v současnosti patří podle JEŽKA (2003) okolo 25 000 druhů orchidejí, podle ZOUNA (2008) je to 30 000 druhů orchidejí a NASH a LA CROIX (2007) uvádějí dokonce rozpětí 25 – 35 000 v přírodě rostoucích druhů. Kromě těchto druhů existuje rovněž značné množství rostlinných hybridů, které vznikly vzájemným křížením rostlinných druhů vstavačovitých rostlin, z nichž některé vznikají v přírodě přirozeným způsobem, zatímco jiné jsou výsledkem práce šlechtitelů. JEŽEK (2003) uvádí, že existuje kolem 25 – 30 000 kříženců orchidejí, ZOUN (2008) zmiňuje existenci 150 000 hybridních druhů orchidejí. Čeleď *Orchidaceae* se dále dělí na tyto podčeledi: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae* a *Orchidoideae* (PROCHÁZKA a VELÍSEK, 1983).

2.1.2 Stáří čeledi *Orchidaceae*

V názorech na stáří čeledi *Orchidaceae* nepanuje mezi různými autory shoda. Tato čeleď je podle některých autorů čeledí poměrně mladou, zatímco jiní autoři poukazují na to, že by *Orchidaceae* mohla být čeledí starší, než se obecně předpokládalo. Teorie obhajující fenologické mládí čeledi bývá obhajována zejména skutečností, že orchideje jsou považovány za geneticky nestabilní rostliny (JEŽEK, 2003), a také předpokladem, že epifyty (jimiž část orchidejí je) mohly vzniknout až poté, co vznikli jejich hostitelé (ERFKAMP, 2008). PROCHÁZKA (1980) uvádí, že fenologicky nižší stáří *Orchidaceae* bývá vysvětlováno též nutností adaptace rostlin této čeledi na typ opylovačů (samci některých blanokřídlých). Podle Erfkampa (2008) na vyšší stáří čeledi *Orchidaceae* poukazují především výsledky z oblasti genetiky a geobotaniky. JEŽEK (2003) uvádí, že vstavačovitě rostliny se na Zemi začaly objevovat před 70 – 80 milióny let, podle ERFKAMPA (2008) se předkové vstavačovitých vyvinuli před cca 90 milióny let.

2.1.3 Členění orchidejí

Orchideje můžeme rozdělit do několika skupin podle různých hledisek. Jedním takovým hlediskem je stanoviště, na kterém orchideje rostou. Podle stanoviště se orchideje dělí na: terestrické, epifytické, poloepifytické, saprofytické, litofytické a podzemní (NASH a LA CROIX, 2007).

Terestrické orchideje jsou ty orchideje, které rostou pevně ukotveny v půdě a z půdy také svými kořeny získávají vodu i potřebné živiny. Tento typ orchidejí se vyskytuje především v oblastech mírného klimatického pásma; podle JEŽKA (2003) se terestrické orchideje vyskytují nejen v mírném, ale i v subtropickém a tropickém pásmu. NASH a LA CROIX (2007) uvádějí, že terestrické orchideje mírného klimatického pásma se vyskytují ve střední Evropě a ve vnitrozemí Číny v hojně míře i v širokém druhovém zastoupení. Pro oblasti tohoto klimatického pásma je charakteristické střídání ročních období spojené se značnými výkyvy teplot, změnou intenzity slunečního záření a množství a četnosti srážek. Díky růstu v půdě mohou terestrické orchideje lépe překonat výkyvy v počasí a nepříznivá období díky období vegetačního klidu. Kořeny terestrických orchidejí také bývají často metamorfovány v hlízy. Stonky mohou být přeměněny v pahlízy, které fungují jako zásobárna živin a vody (ZOUN, 2008). Terestrické orchideje se často vyskytují na biotopech, které jsou pro ostatní rostliny příliš chudé (ERFKAMP, 2008). Podle ZOUNA (2008) se terestrické orchideje vyskytují v teplých i v chladných oblastech.

Růst terestrických orchidejí bývá často spojen se symbiózou rostliny s určitými druhy hub žijícími v substrátu, což má zásadní vliv na životní cyklus rostliny, zejména pak na klíčení. Tento symbiotický vztah se nazývá mykorrhiza a bude o něm více pojednáno v kapitole 2.1.9 této diplomové práce.

Dalším druhem orchidejí z hlediska stanoviště jsou orchideje epifytické. Výskyt těchto orchidejí je odlišný, než je tomu u orchidejí terestrických. Druhy epifytických orchidejí se vyskytují zejména v tropických oblastech. JEŽEK (2003) uvádí, že epifytické druhy orchidejí vyžadují pro přežití oblasti bez mrazů. Epifytický způsob života je určitou adaptací na okolní podmínky. V biotopu tropického deštného lesa získávají orchideje coby epifyty značnou výhodu, neboť rostou převážně uchyceny na větvích stromů. Podle DUŠKA a KŘÍSTKA (1986)

epifytické orchideje upřednostňují pro svůj růst některé druhy stromů (např. dubů) před jinými. Epifyty využívají větve stromů pouze jako oporu pro vlastní růst a v důsledku růstu stromu jsou vynášeny do vyšších rostlinných pater, což jim umožňuje získat stanoviště s větším množstvím světla. Nejen více světla, ale také více živin mohou rostliny získat ve vyšších patrech tropického lesa. Kořeny epifytických rostlin mohou získávat živiny ze zbytků rostlin či živočichů (ZOUN, 2008), dokonce i z ptačího trusu (NASH a LA CROIX, 2007). V těchto vzdušných kořenech také probíhá fotosyntéza (RÖLLKE, 2007). Mezi epifyty patří například některé druhy rodů *Dendrobium* a *Phalaenopsis*.

Poloepifytické orchideje je sice možné nalézt rostoucí při zemi, nerostou však přímo v půdě, jako tomu je u terestrických orchidejí, ale ve vrstvě humusu vytvořené na zemi (NASH a LA CROIX, 2007). Stejní autoři uvádějí, že poloepifytickými orchidejemi jsou například *Anoetochilus* a *Ludisia*.

Litofytické druhy orchidejí jsou označovány po dalším stanovišti, na kterém se vyskytují. Tyto druhy rostou ve skalnatých oblastech na kamenech, a to buď přímo na povrchu kamenů, nebo v místech s usazeným substrátem (ZOUN, 2008). NASH a LA CROIX (2007) uvádějí, že druhy orchidejí, které rostou litofyticky byly původně epifyty a k litofytickému způsobu života se adaptovaly sekundárně, podle ZOUNA (2008) lze mezi litofyty nalézt druhy původně epifytické i druhy původně terestrické. Životní podmínky na stanovišti výskytu litofytických orchidejí jsou spojené s omezeným množstvím živin a vody, ale také s vysokou intenzitou slunečních paprsků. I těmto podmínkám se ale litofytické orchideje dokázaly přizpůsobit – a to červenou pigmentací a tuhými listy, které rostou vzhůru (NASH a LA CROIX, 2007). Nejedná se však pouze o adaptaci morfologickou, ale též fyziologickou. Fyziologická adaptace spočívá zejména v časovém oddělení fotosyntézy a výměny plynů (ERFKAMP, 2008). Mezi zástupce litofytických druhů orchidejí patří například *Cattleya aurantiaca* či *Papilionanthe teres*. RÖLLKE (2007) řadí mezi litofyty i některé druhy orchidejí rodu *Laelia*.

Podzemní orchideje rostou pod zemí, pouze jejich květy se objevují nad povrchem země (NASH a LA CROIX, 2007). PROCHÁZKA (1980) uvádí, že některé

druhy orchidejí pod povrchem země rostou i kvetou. Druhem podzemní orchideje je například *Rhizantella gardneri* (NASH a LA CROIX, 2007).

Druhy terestrických orchidejí, které neobsahují zelené barvivo chlorofyl, se nazývají mykotrofní, někdy též označované jako saprofytické (ZOUN, 2008). Tyto orchideje mají mykorhizní vztah k určitým druhům hub, jejichž prostřednictvím přijímají výživu a energii z odumřelých částí organické hmoty. Mezi mykotrofní orchideje mírného pásma patří například *Corralorhiza trifida* (korálice trojklanná), *Epipogium aphyllum* (sklenobýl bezlistý) a *Neottia nidus - avis* (hlístník hnízdák).

Dalším kritériem členění je způsob růstu stonku, který je v zásadě dvojího typu: tzv. monopodiální a sympodiální. Stonek monopodiálních orchidejí je vývojově starší (JEŽEK, 2003) a přirůstá vždy pouze jedním směrem. Listy na něm rostoucí jsou umístěny proti sobě. Stonek u těchto orchidejí může být krátký, prodloužený či popínavý (RÖLLKE, 2007). Mezi orchideje s monopodiálním stonkem patří například orchideje rodu *Vanda* či *Phalaenopsis*. Druhá forma stonku, sympodiální, je vývojově mladší (JEŽEK, 2003). Sympodiálně rostoucí stonek bývá zcela skryt v zemi, nad povrch země vyrůstají pahlízy s listy nebo pouze listy bez pahlíz. ERFKAMP (2008) uvádí, že sympodiální forma stonku se často vyskytuje u litofytů a epifytů.

Orchideje lze dělit též z hlediska nároků na teplotu – z tohoto kritéria se orchideje dělí na chladnomilné, jež jsou schopny snést minimální teplotu 4°C, temperované, které snášejí nejnižší teplotu 10°C a teplomilné, které snášejí nejnižší teplotu 16°C, špatně snášejí teplotu pod 10°C, ale při vysoké vlhkosti dokážou snést vyšší teploty (NASH a LA CROIX, 2007). ZOUN (2008) zmiňuje skupinu orchidejí mrazuvzdorných, do které zahrnuje orchideje mírného klimatického pásma. Obecně je možné říci, že různé druhy orchidejí zvládají právě takové teploty, které jsou přirozené pro druh biotopu či nadmořskou výšku, ve kterých se rostliny vyskytují.

JEŽEK (2003) uvádí, že teplomilné orchideje se vyskytují v tropických nížinách, domovem temperovaných druhů orchidejí jsou střední horské polohy tropického pásma a chladnomilné orchideje lze najít ve vysokohorských oblastech. Mezi teplomilné druhy orchidejí patří např. většina druhů rodu *Phalaenopsis*, mezi

temperované druhy lze zařadit zástupce rodu *Vanda*. Chladnomilnými druhy orchidejí jsou např. *Laelia furfuraceae* či *Osmoglossum pulchellum*.

2.1.4 Znaky rostlinného těla vstavačovitých rostlin

Mezi orchidejemi lze nalézt zelené i nezelené druhy (PROCHÁZKA a VELÍSEK, 1983). Orchideje vykazují hlavní znaky rostlinných těl jednoděložných rostlin. Těmito znaky jsou zejména: svazčitý typ kořenů, souběžná žilnatina listů a květ souměrný pouze podle jedné osy, s třemi okvětními lístky na jednom dílu květu.

Kromě těchto obecných znaků se však u orchidejí vyskytují ještě jiné, specifitější znaky, které se všechny najednou vyskytují pouze u orchidejí - těmito znaky jsou: pylová zrna jsou slepena k sobě a vytvářejí tzv. brylky, semena jsou mikroskopicky malá a endosperm neobsahuje žádné zásobní látky, klíčení semen v přírodních podmínkách je možné pouze při výskytu symbiotických hub, květ je zrcadlově souměrný (JEŽEK, 2003). ERFKAMP (2008) uvádí ještě další znaky typické pro orchideje: květ obsahuje 3 sepaly a 2 petaly, přičemž 3. petalum je přeměněno v pysk a blizna s čnělkou jsou srostlé v tzv. sloupek.

Kořeny

Téměř všechny terestrické orchideje mají ztlustlé kořeny, oddenky či kořenové hlízy, které slouží jako zásobní orgány rostlin (ERFKAMP, 2008). JEŽEK (2003) uvádí, že na povrchu kořenů orchidejí se vyskytují speciální buňky, které umožňují kořenům přirůstání k podložce. U epifytických druhů orchidejí, které žijí převážně v oblastech chudých na živiny a vodu, se na povrchu kořenů utváří vrstva odumřelých buněk, která se nazývá velamen (ERFKAMP, 2008). Podle ZOUNA (2008) je funkcí velamenu chránit buňky uvnitř kořene před spálením od slunce a také před mechanickým poškozením. RÖLLKE (2007) uvádí, že velamen ochraňuje kořeny rostlin před vyschnutím. Velamen je na pohled stříbřitě šedý (v důsledku vyplnění odumřelých buněk molekulami vzduchu) a je schopný nasát vodu a uchovat ji, dokud není předána živým pletivům v kořenu (ERFKAMP, 2008). PROCHÁZKA (1980) uvádí, že buňky tvořící velamen jsou pórovité a vyztužené spirálkami, které dokážou zachytit vodní páry ze vzduchu. Špička kořenů epifytických orchidejí není pokryta velamenem, což umožňuje příjem vody a živin (DUŠEK a KRÍSTEK, 1986).

Stonek

Také u stonku se projevila schopnost orchidejí adaptace na podmínky prostředí vznikem metamorfóz. U rozličných druhů orchidejí se vyskytují tzv. pahlízy, jež jsou schopny uchovávat vodu a živiny, a tím je rostlině zajistit i v období, kdy jich je v okolním prostředí rostliny nedostatek. ZOUN (2008) uvádí, že v pahlízách též dochází k fotosyntéze. Jak již bylo uvedeno výše, jsou pahlízy charakteristické pro sympodiální typ stonku orchidejí. Podle DUŠKA a KŘÍSTKA (1986) u sympodiálních orchidejí vyrůstá z koncového pupene stonku tzv. letorost, na kterém pak dále dochází k vyrůstání kořenů, listů i květenství.

List

V celé čeledi vstavačovitých lze najít velmi různorodou a širokou škálu listů. Co se týče rozměru listů, objevují se druhy orchidejí, jejichž listy dosahují velkých rozměrů. Například rostliny druhu *Bulbophyllum fletcherianum* dosahují délky 0,9 - 1,8 m (NASH a LA CROIX, 2007). Oproti tomu u orchidejí se silně rozšířenou mykotrofií mohou být listy zakrnělé (např. *Epipactis purpurea*) a u nezelených heterotrofních druhů orchidejí se dokonce vyskytují pouze listy v podobě lodyžních šupin (rod *Neottia* – hnízdák) (PROCHÁZKA, 1980). Raritou mezi orchidejemi jsou např. druhy *Microcoelia exilis*, *Polyrrhiza funalis* a *Taeniophyllum obtusum*, u nichž se listy vůbec nevyskytují (JEŽEK, 2003). K obměně listů u orchidejí dochází různě – podle ZOUNA (2008) se tak děje u některých druhů každoročně, zatímco u jiných mohou listy na jedné rostlině přetrvávat až několik let.

Květ

Květ vstavačovitých rostlin se skládá z pěti trojčetných kruhů (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986). Vnější okvětní lístky jsou 3 a nazývají se sepaly, vnitřní okvětní lístky tvoří 2 petaly a 1 pysk (labellum). Barva a tvar pysku jsou velice rozmanité u různých druhů orchidejí. Hlavní funkcí pysku je přitahovat opylovače (NASH a LA CROIX, 2007). Prostřední sepal, tzv. dorzální sepalum, bývá označován jako praporec (RÖLLKE, 2007). JEŽEK (2003) uvádí, že okvětní lístky orchidejí jsou dohromady označovány jako tzv. tepaly.

PROCHÁZKA (1980) uvádí, že květy orchidejí jsou v drtivé většině oboupohlavní. Květ orchideje původně obsahoval 6 tyčinek, avšak vývojem došlo ke snížení počtu

na 1-2 (JEŽEK, 2003). Tyčinky jsou srostlé s čnělkou a bliznou v tzv. sloupek neboli collumnu (PROCHÁZKA, 1980). Blizna je na svém povrchu často lepkavá, což se projevuje ve schopnosti snadnějšího uchycení pylu na jejím povrchu (JEŽEK, 2003).

Podle ZOUNA (2008) jsou orchideje povětšinou cizosprašné, samoopylení se vyskytuje velmi zřídka (RÖLLKE, 2007). K autogamii dochází např. u druhů *Neottia nidus – avis* či *Ophrys apifera* (tořič včelonosný) (PROCHÁZKA, 1980).

Květy jsou obvykle uspořádány v květenství. Podle DUŠKA a KŘÍSTKA (1986) je základním typem květenství u orchidejí jednoduchý hrozen. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že nejčastěji se vyskytují klasy a laty coby typ květenství.

Před rozvitím květů dochází u většiny druhů orchidejí k tzv. resupinaci (PROCHÁZKA, 1980), jejímž důsledkem je stočení pysku do dolní části květu. Stopka květu se při resupinaci otáčí o 180° (RÖLLKE, 2007). Květy bez resupinace se často objevují u druhu *Ophrys purpurea* - vstavač nachový (PROCHÁZKA, 1980).

Květy orchidejí jsou při mezidruhovém srovnání velmi rozmanité a to z hlediska zbarvení, tvaru i velikosti. Průměrná velikost květů vstavačovitých je podle ZOUNA (2008) 5 – 15 cm. ERFKAMP (2008) zmiňuje, že nejmenší květy se vyskytují u druhu *Platystele jangermannii* a měří průměrně 2 mm, ZOUN (2008) uvádí, že největší květy orchidejí mohou být velké až 35 cm.

Plod

Plodem vstavačovitých rostlin je tobolka, která obsahuje semena. Počet semen v tobolce může být až několik miliónů (ERFKAMP, 2008). Vajíčka se u orchidejí vyvíjejí až poté, co pylové láčky prorostou do semeníku (JEŽEK, 2003). ERFKAMP (2008) uvádí, že u některých druhů rodu *Phalaenopsis* okvětní lístky po opylení zezelenají a převezmou tak funkci listů, čímž podporují růst tobolek.

2.1.5 Rozšíření orchidejí ve světě

Orchideje v přírodě rostou na velmi široké škále stanovišť, rozšířených téměř po celém světě. Rostliny čeledi *Orchidaceae* je možné najít dokonce i za polárním kruhem (ZOUN 2008). Jako příklad lze uvést druh *Calypso borealis*, který se vyskytuje v oblastech za severním polárním kruhem (PROCHÁZKA a VELÍSEK, 1983). Převážná většina druhů je však spjata s výskytem v tropických a subtropických

oblastech. Podle JEŽKA (2003) se v tropech vyskytuje 90% všech orchidejí. PROCHÁZKA (1980) tvrdí, že v asijských a amerických tropech se vyskytují více než $\frac{3}{4}$ dosud známých druhů orchidejí. JEŽEK (2003) uvádí počet druhů orchidejí na jednotlivých kontinentech: v Asii se vyskytuje 10 – 15 000 druhů orchidejí, v Jižní Americe 6 – 8 000 druhů, V Africe 2 000 druhů, ve Střední Americe 1 000 druhů, v Austrálii 700 druhů, v Severní Americe 200 druhů a v Evropě 200 druhů orchidejí. ZOUN (2008) uvádí, že orchideje se vyskytují až do nadmořské výšky 3 800 m. n. m.

Velice zajímavá je souvislost mezi rozšířením orchidejí ve světě a geologickým stářím dané oblasti a její stabilitou. Například se uvádí, že v oblastech, které jsou po dlouhá období (miliony let) stabilní a nijak výrazně se nemění, se vyskytuje poměrně nízký počet druhů orchidejí, zatímco oblasti geologicky poměrně mladé či stále se měnící hostí velké množství druhů orchidejí (ERFKAMP, 2008). Podle ZOUNA (2008) je mnoho druhů orchidejí endemických. ERFKAMP (2008) uvádí oblasti, které jsou velmi bohaté na počet druhů orchidejí: horské oblasti Střední Ameriky, svahy pohoří Himaláje, oblast pohoří Andy a Filipíny, Indonésie, Malajsie a Papua – Nová Guinea.

2.1.6 Historie pěstování orchidejí

NASH a LA CROIX (2007) uvádějí, že orchideje rodu *Cymbidium* byly popsány Konfuciem ve staré Číně před více než 2 000 lety. ERFKAMP (2008) zmiňuje, že ve staré Číně představovaly orchideje symbol skromnosti a čistoty a rovněž byly symbolem léta jako ročního období. V literatuře se objevují zmínky o tom, že orchideje byly známy též v antickém Řecku – JEŽEK (2003) uvádí, že Aristotelův žák Theofrastos ve 3. století př. n. l. označil orchideje slovem „orchis“ ve svém díle „Historie rostlin“. Z tohoto slova později vzniklo označení pro celou čeleď rostlin – *Orchidaceae* (RÖLLKE, 2007). *Orchis* je rovněž latinské označení rodového jména terestrické orchideje rostoucí na našem území – vstavače; odtud pochází český termín označující čeleď *Orchidaceae* – vstavačovité (JEŽEK, 2003).

V Evropě se až na výjimky zmínky o orchidejích po dlouhou dobu téměř vůbec neobjevovaly. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že písemné zmínky o orchidejích na našem území se objevily až na konci 16. století. Podle DUŠKA a KŘÍSTKA (1986)

byly tropické orchideje do Evropy poprvé dovezeny ze západoindických ostrovů Španěly. ZOUN (2008) uvádí, že poprvé byly do Evropy dovezeny tropické orchideje z Ameriky v 17. století a z Asie v 18. století.

Začátek 18. století je považován za počátek pěstování orchidejí v Evropě. ERFKAMP (2008) uvádí, že orchideje byly v Anglii pěstovány od roku 1729, podle NASHE a LA CROIX (2007) dorazila do Anglie první tropická orchidej roku 1731, a to druh *Bletia verrucunda*. Podle DUŠKA a KŘÍSTKA (1986) tento druh *Bletia verrucunda* v Evropě poprvé vykvetl roku 1753. Následně se ve viktoriánské Anglii vzedmula velká vlna nadšení pro pěstování orchidejí. Tento nový koníček byl však velmi nákladný, neboť do tropických oblastí byli vysíláni sběratelé orchidejí a s tím spojené cestování do vzdálených oblastí, potíže při dopravování orchidejí do Evropy a ještě další faktory měly za následek vysoké ceny dovezených exemplářů. ERFKAMP (2008) uvádí, že orchideje se stávaly součástí sbírek šlechticů a též bohatých kupců na začátku 19. století.

S dovozem cizokrajných orchidejí do Evropy však byly spojeny také potíže s pěstováním orchidejí v oblastech, které měly odlišné klimatické podmínky, než jaké měly rostliny na původních stanovištích, ale rovněž problémy s rozmnožováním orchidejí, neboť symbiotický vztah mezi orchidejemi a houbovými vlákny, zvaný mykorrhiza, nebyl v té době dosud znám. Až do konce 19. století tak bylo pěstování exotických orchidejí v Evropě exkluzivní a drahou zálibou (JEŽEK, 2003).

Rozvoj vědy a techniky ve 20. století umožnil získání mnoha nových poznatků o oblasti pěstování orchidejí, díky čemuž je v současnosti možné pěstovat orchideje úspěšněji a efektivněji, v důsledku čehož mohou být tyto rostliny pro zájemce dostupnější a levnější. Nemalou zásluhu na tomto faktu má využívání poznatků v oblasti tkáňových kultur. V současnosti jsou orchideje pěstovány především pro svou estetickou hodnotu.

2.1.7 Využití orchidejí

NASH a LA CROIX (2007) uvádějí, že kultury žijící v tropech používaly orchideje k léčebným účelům. RÖLLKE (2007) zmiňuje používání látek získávaných z orchidejí rodu *Laelia* ve Střední Americe k výrobě lepidla.

Zřejmě nejznámější orchidejí z hlediska využití je druh *Vanilla planifolia* (vanilka plocholistá). Fermentované plody této orchideje jsou hojně využívány v gastronomii (PROCHÁZKA 1980) a též v kosmetickém průmyslu (JEŽEK, 2003). ZOUN (2008) uvádí, že vanilka byla známa a využívána již za dob starých Aztéků.

V gastronomii je též používán tzv. salep. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že se jedná o: „během květu nebo těsně po odkvětu sbírané a sušené mladé kořenové hlízy nejrůznějších tořičů (*Ophrys*), vstavačů (*Orchis*), dále rudohlávků (*Anacamptis*), dokonce i švihlíků (*Spiranthes*) a jiných terestrických hlíznatých orchidejí, například druhů mediteránního rodu *Serapias* nebo v Indii rodů *Eulophia* a *Rabanaria*“. Tyto hlízy jsou po sběru sušeny, následně semlety a z vzniklého prášku bývají připravovány nápoje. ERFKAMP (2008) uvádí, že salep byl po staletí používán v gastronomii malé Asie a východního Středomoří. PROCHÁZKA (1980) zmiňuje používání salepu též ve veterinární medicíně.

Orchideje zaujímají své postavení také v kulturní oblasti života člověka. NASH a LA CROIX (2007) uvádějí, že v Mexiku je spojena sklizeň ostnů druhu *Laelia anceps* s obdobím vánočních svátků, JEŽEK (2003) zmiňuje druh *Cattleya skinneri* jako národní květinu Kostariky. Tento druh (*Cattleya skinneri*) bývá podle autorů NASHE a LA CROIX (2007) pěstován v guatemalských vesnicích jako dekorace.

2.1.8 Rozmnožování orchidejí

Vegetativní rozmnožování

Rozmnožování se u orchidejí vyskytuje dvojího typu: vegetativní a generativní (JEŽEK, 2003). V případě vegetativního rozmnožování se jedná o rozmnožování nepohlavní a takto rozmnožená rostlina má genetickou výbavu identickou s výbavou matečné rostliny, z níž byla rozmnožena. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že vedlejší adventivní pupeny, jimiž se rostliny mohou vegetativně rozmnožovat, se vyskytují na kořenových hlízách, pahlízách i oddencích. Druhy sympodiálních orchidejí se rozmnožují pomocí pupenů vytvořených na oddenku. Orchideje s monopodiálním stonkem se rozmnožují jiným způsobem: mohou vytvořit postranní výhony (ERFKAMP, 2008), nebo odnož (tzv. keiki), která vyroste z pupenu na květním stvolu. Rozmnožování pomocí keiki se vyskytuje např. u rodu *Phalaenopsis* (RÖLLKE, 2007). PROCHÁZKA (1980) uvádí, že převážně vegetativně se

rozmnožuje *Liparis loeselii* (hlízovec Loeselův) a *Epipogium aphyllum* (sklenobýl bezlistý) se rozmnožuje téměř vždy vegetativně.

NASH a LA CROIX (2007) uvádějí, jaké způsoby rozmnožování mohou využít pěstitelé - jedná se o dělení oddenků či pahlíz (sympodiální druhy orchidejí), odříznutí kořenů ze spících pahlíz (např. u rodu *Cymbidium*), odstříhnutí a zasazení vzdušných odnoží (rod *Epidendrum*) či množení rostlin kmenovými řízků (např. druh *Dendrobium nobile*). JEŽEK (2003) uvádí, že vegetativně lze množit i monopodiálně rostoucí orchideje s prodlouženým stonkem (např. *Vanda*).

Speciálním druhem vegetativního rozmnožování je rozmnožování orchidejí v kulturách *in vitro*. O tomto způsobu rozmnožování rostlin bude pojednáno v kapitole 2.2 této diplomové práce.

Generativní rozmnožování

Druhým způsobem rozmnožování je rozmnožování generativní, u kterého dochází ke kombinaci genové výbavy rodičů vzniklého jedince. Při generativním rozmnožování dochází k opylení, tedy k zachycení pylu na povrchu blizny.

Opylení u orchidejí se děje několika způsoby. Podle PROCHÁZKY a VELÍSKA (1983) jsou orchideje z hlediska opylení převážně entomofilní a v některých případech ornitofilní. U některých druhů orchidejí dochází k samoopylení (NASH a LA CROIX, 2007). PROCHÁZKA (1980) uvádí, že téměř u poloviny orchidejí je opylování uskutečňováno za pomoci včel.

Květy orchidejí jsou různě přizpůsobené typu opylení. Některé orchideje mohou být opyleny pouze určitým druhem hmyzu – PROCHÁZKA (1980) uvádí, že rod *Spiranthes* (švihlík) může být opylen pouze čmelákem (*Bombus*). Jsou známy různé způsoby, jimiž orchideje lákají své opylovače – některé druhy orchidejí velmi věrohodně napodobují vzhledem i zbarvením květu druh hmyzu, který je schopen být jim opylovačem, jiné druhy lákají opylovače tvorbou nektaru a další druhy dokonce vylučují látky, které jsou podobné feromonům opylovače (JEŽEK, 2003). PROCHÁZKA (1980) zmiňuje tzv. pašťové květy – hmyz, který do těchto květů vletne, nalezne cestu ven vedoucí pouze kolem blizny, čímž na ní zanechá pylová zrna. ERFKAMP (2007) uvádí jiný způsob, jímž orchideje lákají svého opylovače – některé druhy

orchidejí s ornitofilním opylením kvetou červeně, oranžově či žlutě zbarvenými květy, neboť oko ptáků je prý na tuto část barevného spektra citlivé. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že orchideje lákají hmyz opticky nebo chemicky. Optické lákání hmyzu potvrzují DUŠEK a KŘÍSTEK (1986), kteří uvádějí, že květy některých druhů orchidejí mají bílé zbarvení za účelem přilákání nočního hmyzu, který je rostlinám opylovačem. JEŽEK (2003) zmiňuje napodobování zbarvení a tvaru těla samic hmyzích opylovačů u rodu *Ophrys* (vstavač).

Při opylení dochází k přenosu pylového zrna na povrch blizny a k následnému prorůstání tzv. pylové láčky do semeníku, kde pylová zrna mohou splynout s vajíčky uloženými v semeníku. JEŽEK (2003) uvádí, že u orchidejí se vajíčka vyvíjejí až poté co začne pylová láčka prorůstat do semeníku, což prodlužuje dobu mezi opylením a oplozením až na 280 dnů, a během této doby se ze semeníku vytváří tobolka. Podle RÖLLKEHO (2007) dozrávání vajíček trvá 3-9 měsíců v závislosti na druhu orchideje.

Pro orchideje je charakteristická obrovská produkce semen, přičemž rozměry semen jsou velmi malé. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že jedna rostlina druhu *Himantoglossum hircinum* (jazýček kozlí) může vyprodukovat až 84 000 semen, zatímco tropická orchidej rodu *Cymbidium* může obsahovat až 1 500 000 semen pouze v jedné tobolce. JEŽEK (2003) uvádí, že jediný semeník může obsahovat až 5 000 000 semen. Podle ZOUNA (2008) množství semen v 1 gramu může dosahovat hodnoty až 1 miliónu semen. Takto velká produkce semen je lehce odůvodnitelná, jsou-li vzaty v úvahu faktory jako potřeba navázání mykorrhizního vztahu se specifickým druhem houby, důležitá pro zdárný vývoj semene a růst mladé rostliny, ale i limitovaná plocha pro růst semenáčku v okolí mateřské rostliny a konkurence ostatních rostlinných druhů na stanovišti. Tyto faktory významně snižují možnost, že ze semene vyrostě nová rostlina.

Výsev k matečným rostlinám, symbiotický výsev a asymbiotický výsev

Mezi způsoby generativního rozmnožování orchidejí patří výsev k matečným rostlinám, tzv. symbiotický výsev a asymbiotický výsev (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986). U všech těchto metod je využíváno znalosti mykorrhizního vztahu semen orchidejí s určitými typy hub.

Výsev k matečným rostlinám se používá tehdy, jsou-li v substrátu matečné rostliny přítomny hyfy mykorrhizní houby (RÖLLKE, 2007), které mohou infikovat klíčící semeno a zajistit tak jeho další růst a vývoj. Symbiotický výsev spočívá v izolaci houbové kultury, ke které jsou poté vyseta semena rostliny (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986). Při asymbiotickém výsevu jsou semena vysévána na kultivační média, která obsahují látky, jež potřebují semena orchidejí pro vyklíčení. Tento druh generativního rozmnožování je založen na tom, že přítomnost mykorrhizní houby je nahrazována chemickými látkami (RÖLLKE, 2007).

2.1.9 Mykorrhiza a mykotrofie u vstavačovitých rostlin

Jev, který je nedílně spjat s životním cyklem a ontogenetickým vývojem vstavačovitých rostlin, se nazývá mykorrhiza. Tento termín označuje symbiotický vztah mezi rostlinou a houbovými vlákny (tzv. hyfami) určitých druhů hub. Tyto houby mohou být saprofytické, parazitické či tvořící ektomykorhizy (GRYNDLER et al., 2004).

Druh mykorrhizy, který se vyskytuje pouze u rostlin čeledi vstavačovitých, se nazývá orchideoidní mykorrhiza (GRYNDLER et al., 2004). JEŽEK (2003) uvádí, že všichni zástupci této čeledi jsou na tomto druhu symbiózy životně závislí, PROCHÁZKA (1980) však zmiňuje schopnost druhů *Sobralia macrantha* a *Bletilla striga* klíčit a rovněž růst „bez houbového endofyta“.

Zatímco význam orchideje pro houbu není podle JEŽKA (2003) přesně znám, hostitelská rostlina získává díky mykorrhiznímu vztahu s houbou organické i anorganické látky (PROCHÁZKA, 1980). PROCHÁZKA a VELÍSEK (1983) uvádějí, že prorůstání houbových hyf do kořenů vstavačovitých rostlin probíhá na úkor výživových látek rostliny, avšak v průběhu doby začne orchidej parazitovat na houbě, a využívá ji pro svou výživu. DUŠEK a KŘÍSTEK (1986) uvádějí, že mnohé orchideje dokážou případný nedostatek světla vyvážit zintenzivněním mykotrofie.

Za počátek vzniku orchideoidní mykorrhizy je možné označit infekci vstavačovité rostliny určitým druhem houby. PROCHÁZKA (1980) vysvětluje princip infekce tak, že dochází k prorůstání hyf houby buňkami rhizodermu do korového parenchymu. Toto prorůstání se podle GRYNDLERA et al. (2004) pravděpodobně děje přes plazmodesmy. K infekci semen dochází podle JEŽKA (2003) tím, že houba

vnikne do semene jeho spodní částí. PROCHÁZKA a VELÍSEK (1983) uvádějí, že semena orchidejí začnou klíčit vždy v příhodných podmínkách, bez mykorrhizy je však další vývoj semen nemožný (JEŽEK, 2003). Podle NASHE a LA CROIX (2007) je naklíčení umožněno díky vedlejším produktům metabolismu houby. ZOUN (2008) uvádí, že rostliny orchidejí při klíčení potřebují pouze látky, které mykorrhizní houba produkuje, nikoliv houbu samotnou.

Jedou z příčin, která by mohla vysvětlovat důležitost mykorrhizy pro vstavačovitě rostliny, je skutečnost, že orchideje vytvářejí poměrně málo kořenů, což je nepříznivé z hlediska příjmu vody a živin z půdy (GRYNDLER et al., 2004). I přes tuto skutečnost se infekce houbou nevyskytuje u všech kořenů – PROCHÁZKA (1980) uvádí, že u druhu *Epipactis helleborine* (kruštík širokolistý) se mykorrhiza vyskytuje asi u 25 % kořenů a poměr mykorrhizní houbou infikovaných kořenů (stejně jako poměr mezi heterotrofií a autotrofií) se může měnit se změnou ekologických podmínek v okolí rostliny.

Někteří autoři uvádějí, že nedělené kořenové hlízy, které se vyskytují např. u rodu *Orchis*, nejsou, na rozdíl od kořenů terestrických orchidejí, kolonizovány houbami (GRYNDLER et al., 2004 a PROCHÁZKA, 1980). V této souvislosti je zmiňována tvorba látek orchinolu a hyrcinolu, jež mají antimikrobiální účinky a brání hlízy orchidejí před napadením houbovými infekcemi (PROCHÁZKA a VELÍSEK, 1983).

Orchideoidní mykorrhiza se u některých druhů orchidejí nevyskytuje ve všech fázích ontogenetického vývoje rostliny, zatímco jiné druhy jsou na symbióze s houbou závislé po celý život (JEŽEK, 2003). PROCHÁZKA (1980) uvádí, že vstavačovitě rostliny se na počátku svého vývoje vyživují pouze heterotrofně (mykotrofně), zatímco v dospělosti se některé druhy rostlin dále vyživují heterotrofně a jiné mixotrofně až autotrofně, přičemž tentýž autor dále uvádí, že mykorrhiza a mykotrofie jsou u vstavačovitých rostlin nadřazeny autotrofnímu způsobu výživy.

Orchideoidní mykorrhizu tvoří zejména tyto rody hub: *Rhizoctonia*, *Epulorrhiza*, *Ceratorhiza* či *Moniliopsis* (GRYNDLER et al., 2004). Na kořenech terestrických

orchidejí byl zjištěn výskyt těchto rodů hub: *Rhizoctonia*, *Tulasnella* a *Ceratorhiza* (AGUSTINI ET AL., 2009).

2.1.10 Ochrana orchidejí

Obecně je možné říci, že orchideje patří mezi rostliny s nižší konkurenční schopností (NASH a LA CROIX, 2007). Tyto rostliny se sice dokázaly přizpůsobit široké škále ekosystémů, avšak ERFKAMP (2008) poukazuje na to, že tato adaptace probíhala velmi pomalu a rychlým změnám prostředí orchideje nejsou schopné se přizpůsobit. RÖLLKE (2007) dokonce uvádí, že u některých druhů orchidejí již došlo k vyhynutí.

Existence některých druhů orchidejí v určitém prostředí může být vázána např. na mikroklima (JEŽEK (2003) uvádí, že u epifytních orchidejí je „limitujícím faktorem“ úroveň vzdušné vlhkosti a její kolísání) nebo na výskyt určitých opylovačů (ERFKAMP, 2008).

Podle PROCHÁZKY a VELÍSKA (1983) mají vliv na snižování počtu orchidejí např. tyto antropogenní faktory: snižování ploch porostlých vegetací v důsledku zástavby či těžby nerostných surovin, aplikace herbicidů či „změny ve struktuře půdního fondu“. Podle ZOUNA (2008) jsou orchideje ohrožovány kácením lesů za účelem získání vzácného dřeva a také likvidací „původních porostů“ pro získání „nové zemědělské půdy“. RÖLLKE (2007) uvádí, že orchideje jsou ohrožovány též „nekontrolovaným sběrem“.

Na orchideje se vztahuje CITES (Úmluva o mezinárodním obchodě ohroženými druhy volně žijících živočichů a rostlin), která „reguluje mezinárodní obchod“ s ohroženými rostlinnými a živočišnými druhy (NASH a LA CROIX, 2007).

Ochrana rostlin v České republice je zajišťována zákonem č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění a také vyhláškou č. 395/1992 Sb., k provedení některých ustanovení zákona o ochraně přírody a krajiny. V příloze č. II této vyhlášky jsou vyjmenovány zvláště chráněné druhy rostlin, které jsou dále děleny na druhy kriticky ohrožené, druhy silně ohrožené a druhy ohrožené.

Mezi druhy kriticky ohrožené jsou řazeny např. tyto vstavačovitě rostliny: *Listera cordata* (bradáček srdčitý), *Liparis loeselii* (Hlízovec loeselův) či *Ophrys apifera* (tořič včelonosný), mezi druhy silně ohrožené patří ze vstavačovitých rostlin např. *Epipactis palustris* (kruštík bahenní), *Cephalanthera rubra* (okrotice červená) nebo *Orchis purpurea* (vstavač nachový) a k druhům ohroženým patří např. tyto orchideje: *Epipactis purpurata* (kruštík modrofialový), *Gymnadenia conopsea* (pětiprstka žežulník) či *Dactylorhiza majalis* (prstnatec májový) (Příloha č. II vyhlášky k provedení některých ustanovení zákona č. 114/92 Sb., č.395/92)

2.1.11 Obchod s orchidejemi

Orchideje jsou v posledních letech populárními květinami, čemuž odpovídá jejich produkce a obrat v zahraničním obchodu České republiky. V roce 2008 činila hodnota dovozu řezaných orchidejí do České republiky více než 46,5 mil. Kč a hodnota vývozu 1,38 mil. Kč, přičemž nejvyšší dovoz orchidejí do České republiky byl v tomto roce uskutečňován z Nizozemí (28,4 mil. Kč) a z Thajska (17,36 mil. Kč), a nejvyšší vývoz orchidejí uskutečňovala Česká republika na Slovensko (1,3 mil. Kč) (Situační a výhledová zpráva – okrasné rostliny, prosinec 2009).

RÖLLKE (2007) uvádí, že až do období 70. let 20. století měla většina vstavačovitých rostlin prodávaných v Americe a v Evropě původ v tropických deštných či mlžných lesech. Využívání tkáňových kultur umožňuje rychlé namnožení kvalitních rostlin, čehož je využíváno při množení orchidejí (VOTRUBA, 1987). Díky rozmnožování orchidejí technikami *in vitro* také mohlo dojít ke snížení cen kultivarů orchidejí (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986). Podle VOTRUBY (1987) jsou základní metodou používanou při množení orchidejí v podmínkách *in vitro* meristémové kultury.

2.2 Pěstování rostlin v kulturách *in vitro*

2.2.1 Kultivace rostlin v podmínkách *in vitro*

Při pěstování rostlin v kulturách *in vitro* se jedná o pěstování rostlin v umělých podmínkách. Mezi tyto podmínky (tzv. kultivační podmínky) patří vhodná teplota, množství a kvalita světla, vlhkost a kultivační médium (KOVÁČ, 1992). „*In vitro*“ je do češtiny překládáno jako „ve skle“ (JEŽEK, 2003), neboť pěstování rostlin v kulturách *in vitro* je uskutečňováno nejčastěji ve skleněných či plastových

nádobkách. Podle ZOUNA (2008) se pro kultivaci rostlin *in vitro* vžilo rovněž označení „množení na agaru“. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že v kulturách *in vitro* jsou kultivovány izolované části rostlin. Podle ZOUNA (2008) je rozmnožování rostlin v kulturách *in vitro* významně uplatňováno při produkci orchidejí. RÖLLKE (2007) uvádí, že v Evropě jsou za rok vyprodukovány desítky tisíc rostlin orchidejí. HRADILÍK (2005) uvádí využívání explantátových technik u zhruba 5 000 rostlinných druhů.

V kulturách *in vitro* může docházet ke kultivaci různých částí rostlinných těl. Rostliny mohou být rozmnožovány ze somatických buněk kultivací buď samotných buněk, buněčných pletiv či celých rostlinných částí – pak bývají tyto kultury označovány jako tkáňové či explantátové kultury *in vitro*, nebo mohou být na kultivační média vysévána přímo semena rostlin, což se označuje jako tzv. asymbiotický výsev. Ve všech případech je však nutné zachovávat v kulturách *in vitro* sterilní podmínky.

2.2.2 Metody kultivace rostlin v podmínkách *in vitro*

Metody tkáňových kultur rostlin, též označované jako tzv. mikropropagace se řadí k vegetativním způsobům rozmnožování rostlin (KOVÁČ, 1992). Podle HRADILÍKA (2005) jsou tyto metody využívány jak v praxi při rozmnožování rostlin, tak ve výzkumu. Při kultivaci rostlin v podmínkách *in vitro* jsou používány různé metody. Podle KOVÁČE (1992) mezi základní způsoby kultivace rostlin *in vitro* patří množení tvorbou prýtů z úžlabních (axilárních) pupenů, jež zahrnuje kultivaci vzrostných (apikálních) vrcholů, popř. kultivaci pouze meristémů a kultivaci tzv. jednonodálních segmentů, a dále množení pomocí tvorby adventivních prýtů či adventivních somatických embryí, které je dále možné rozdělit na množení přímou morfogenezi (jedná se o přímou tvorbu adventivních pupenů či přímou embryogenezi) a množení nepřímou morfogenezi, kam spadá odvození kalusů, organogeneze v kalusové kultuře a množení nepřímou somatickou embryogenezi.

Kultivace vzrostných (apikálních) vrcholů

Na vrcholech stonku a kořenů se vyskytují tzv. apikální meristémy (NOVÁK, 1990). Vrcholová část stonku, obsahující tyto apikální meristémy a několik listových

základů (tzv. primordií) tvoří 0,5 – 3 mm velký rostlinný explantát, který je používán při kultivaci apikálních vrcholů v kulturách *in vitro* (KOVÁČ, 1992).

Kultivace meristémů

Kultivovat je možné také soubor meristemických buněk (meristemická pletiva). Tato metoda umožňuje ve velkém množství získávat potomstvo, které je vzájemně geneticky identické při zachování jeho vysoké genetické stability (NOVÁK, 1990). Kultivovaný meristemický explantát má v tomto případě velikost asi 0,1 – 0,5 mm (KOVÁČ, 1992). Tento typ explantátových kultur rostlin bývá rovněž označován pojmy „meristémové kultury“ (NOVÁK, 1990) nebo „tkáňové kultury“ (RÖLLKE, 2007). Kultivace meristémů se využívá při tzv. ozdravování kultur (KOVÁČ, 1992). VOTRUBA (1987) uvádí využití meristémových kultur u jahodníku a bezostných ostružin.

Kultivace jednonodálních segmentů

Metoda kultivace jednonodálních segmentů je založena na kultivování jednonodových částí stonků obsahujících minimálně jeden axilární pupen, přičemž mezi výhody této metody patří vysoká genetická stabilita a úspěšnost zejména při rozmnožování bylin (KOVÁČ, 1992).

Přímá tvorba adventivních pupenů

Při tzv. přímé tvorbě adventivních pupenů dochází ke vzniku rostlinných prýtů z apikálních či axilárních pupenů, tedy ze struktur, které nejsou předem diferencované (KOVÁČ, 1992).

Přímá embryogeneze

Pro přímou embryogenezi je typické, že na primárních explantátech vznikají somatická embrya, a to z pletiv hypokotylu klíčnicích rostlin, děloh klíčnicích rostlin či zygotických embryí (KOVÁČ, 1992). Kultivační médium by při izolování rostlinných embryí mělo obsahovat zejména cukry, přítomnost auxinů v kultivačním médiu obvykle není nutná (NOVÁK, 1990).

Odvozování kalusových kultur

HRADILÍK (2005) uvádí, že kalusové kultury jsou nejstarší metodou používanou při kultivaci rostlin *in vitro*. Kalus lze u jednoděložných rostlin odvozovat například

z pletiv květních primordií, nodálních částí stonku či rostlinných embryí, a to zejména umístěním explantátů do tekutého média s vyšší koncentrací auxinu (KOVÁČ, 1992). Podle NOVÁKA (1990) vede k proliferaci kalusu nízká koncentrace cytokininu a vysoká koncentrace auxinu. JEŽEK (2003) uvádí, že při získávání kalusu jsou kultivované meristemické explantáty umístovány na otáčejícím se bubnu. Podle KOVÁČE (1992) jsou dlouhodobě kultivované kalusové kultury cytologicky nestabilní.

Organogeneze v kalusových kulturách

Při organogenezi v kalusových kulturách dochází ke vzniku rostlin (nebo rostlinných částí) z pletiv kalusové kultury, proto tato organogeneze bývá označována za organogenezi nepřímou (KOVÁČ, 1992). NOVÁK (1990) uvádí, že málokdy dojde k vytvoření tzv. kořenových a stonkových meristemoidů z kalusu najednou, v důsledku odlišných nároků meristemoidů na přítomnost růstových regulátorů. Podle KOVÁČE (1992) jsou základy rostlinných orgánů vytvářeny z kalusu na kultivačním médiu, které má nižší obsah auxinu. NOVÁK (1990) uvádí, že regenerace prýtlů a pupenů je podněcována vysokým obsahem cytokininu a nízkým obsahem auxinu.

Množení nepřímou somatickou embryogenezí

Tento druhu množení v podmínkách *in vitro* je tzv. vegetativní propagací a dochází při něm ke vzniku embrya, popř. celé rostliny z jiné buňky, než ze zygoty (HRADILÍK, 2005). Somatická embryogeneze má tyto etapy: odvození kalusové kultury a následně suspenzní kultury, redukce auxinu v živném médiu a pasážování somatických embryí na živná média s optimálním složením pro další vývoj (KOVÁČ, 1992). Podle HRADILÍKA (2005) dochází ke vzniku tzv. embryogenního kalusu, který může vznikat z endospermu, květních primordií, pylových zrn, zygotických embryí a dalších mladých pletiv.

2.2.3 Význam používání explantátových kultur rostlin

- Při mikropropagaci rostlin je možné namnožení rostlin se stejnými vlastnostmi, jaké má rostlina, ze které jsou kultivované rostlinné explantáty (ZOUN, 2008)

- Některé metody kultivace rostlinných explantátů mají poměrně vysoký množitelý koeficient – např. somatická embryogeneze (KOVÁČ, 1992)
- Namnožení velkého množství rostlin za poměrně krátké časové období (JEŽEK, 2003)
- Existují rovněž metody kultivace rostlinných explantátů, u kterých jsou výsledné rostlinné explantáty (tzv. regeneranty) geneticky poměrně stabilní – např. metoda kultivace jednodálních segmentů (KOVÁČ, 1992)
- U rostlinných druhů ohrožených vyhynutím nebo u druhů s významnými genetickými vlastnostmi je možné použít tzv. kryoprezervaci, při které jsou rostliny uchovávány ve zmraženém stavu za teploty - 196°C (HRADILÍK, 2005)
- Produkce bezvirózních rostlin a ozdravování rostlin v zemědělství (KOVÁČ, 1992)
- Kombinací meristémových kultur a embryokultur u rostlin je možné urychlit „šlechtitelský proces“ (VOTRUBA, 1987)

2.2.4 Fáze mikropropagace

Klonování rostlin v podmínkách *in vitro* také bývá označováno jako tzv. mikropropagace (NOVÁK, 1990). Podle KOVÁČE (1992) je mikropropagace rozdělována do následujících fází:

- Odvozování sterilní kultury (též označované jako primokultura) při využití povrchové sterilizace rostlinného materiálu
- Pasážování primokultury na živná média s cílem dosažení proliferace kultury rostlinných explantátů
- Zakořeňování rostlin v podmínkách *in vitro*
- Převod rostlin do prostředí *in vivo* a jejich aklimatizace na podmínky *in vivo*, popř. zakořeňování rostlin, pokud neproběhlo v prostředí *in vitro*

2.2.5 Sterilizace rostlinného materiálu

Sterilizace rostlinného materiálu je jednou z nejvýznamnějších částí mikropropagace, neboť získání povrchově sterilních explantátů je stěžejní pro pěstování rostlin v kulturách *in vitro*. Na povrchu rostlin se vyskytuje velké množství mikroorganismů a je využívána celá řada postupů a desinfekčních prostředků, které mají za cíl získání rostlin, jejichž povrch bude mikroorganismů prostý.

Některé metody sterilizace rostlinného materiálu využívají zvýšené teploty k eliminaci virů, avšak příliš vysoké hodnoty teplot, označované jako nefyziologické, mohou v určitých případech zvyšovat výskyt tzv. somatických mutací v rostlinném materiálu (NOVÁK, 1990)

KOVÁČ (1992) doporučuje před prováděním desinfekce oplachování rostlin pod tekoucí vodou (po dobu 0,5 – 2 hodiny) a rovněž oplachování saponátem s následným oplachováním vodou z důvodu zvyšování smáčivosti povrchu explantátů, což má vliv na zvýšení účinnosti desinfekčních prostředků používaných ke sterilizaci rostlin.

Ke sterilizaci rostlinného materiálu se používají zejména tyto desinfekční prostředky: chlornan sodný v koncentraci 0,5 – 5%, dusičnan stříbrný v koncentraci 1%, bromová voda v koncentraci 1 – 2% a chlorid rtuťnatý v koncentraci 0,1 – 1% (KOVÁČ, 1992).

Dále bývá doporučováno používání etanolu o různých koncentracích. Zatímco HRADILÍK (2005) uvádí používání 70% etanolu po dobu 5 sekund, KOVÁČ (1992) zmiňuje používání etanolu o koncentraci 75 – 95% a dobu působení v řádu sekund až minut. V některých případech je možné použít etanol o vyšších koncentracích - VOTRUBA (1987) uvádí použití etanolu o koncentraci dokonce 96% po dobu 5 – 10 minut při sterilizaci rostlinných semen. CASANOVA et al. (2008) zmiňuje sterilizaci povrchu pupat karafiátu v 96% etanolu po dobu 5 sekund. Podle KOVÁČE (1992) má ponoření rostlinných explantátů do etanolu o koncentraci 70% po dobu 2 minut vliv na zvýšení smáčivosti povrchu těchto explantátů.

Dále se používá chlorové vápno o koncentraci 4 – 5% (HRADILÍK, 2005), 2,5 – 5% Chloramin B (VOTRUBA, 1987) či 10 – 15% roztok komerčně vyráběného

roztoku SAVO Super (KOVÁČ, 1992). Časté používání roztoku „desinfekčního prostředku SAVO“ při sterilizaci rostlinného materiálu uvádí též ZOUN (2008), a to v koncentraci 5 – 20% při době působení 10 – 20 minut.

I v případě úspěšné povrchové sterilizace může dojít k projevení infekce v explantátových kulturách rostlin *in vitro*. Tento jev může být zapříčiněn endogenní infekcí rostlinných pletiv uvnitř rostliny. V těchto případech se používají antibiotika aplikovaná na povrch rostlinných explantátů či obsažená v kultivačních živných půdách (KOVÁČ, 1992).

2.2.6 Složení kultivačních médií

Při kultivaci rostlin v podmínkách *in vitro* je velmi důležité složení kultivačního média, neboť ovlivňuje růst i morfogenezi kultivovaných rostlin (KOVÁČ, 1992). Existuje mnoho druhů kultivačních médií, jejichž použití je závislé na charakteru explantátové kultury rostlin, druhu rostlin a též záměru kultivace. Dle HRADILÍKA (2005) obsahují kultivační média obvykle tyto složky: makroelementy, mikroelementy, aminokyseliny, vitamíny, sacharidy, zpevňující látku, růstové regulátory a redestilovanou vodu. Kromě těchto složek mohou být přidávány i další látky.

Makroelementy

Mezi mikroelementy se řadí tyto prvky: dusík, fosfor, vápník, draslík, hořčík a síra (KOVÁČ, 1992). Podle HRADILÍKA (2005) by mělo být v kultivačním médiu obsaženo 25 – 60 mM anorganického dusíku. KOVÁČ (1992) zmiňuje zlepšení růstu rostlin v médiu obsahujícím zároveň dusík ve formě nitrátové a dusík ve formě amonných solí. Zdrojem dusíku v kultivačním médiu mohou být rovněž bílkovinné hydrolyzáty a aminokyseliny (HRADILÍK, 2005). Podle KOVÁČE (1992) bývá dusík v kultivačním médiu přítomen ve formě dusičnanu amonného a dusičnanu draselného.

Mikroelementy

Mikroelementy přidávanými do kultivačních médií jsou: železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden (KOVÁČ, 1992). HRADILÍK (2005) mezi mikroelementy řadí též kobalt. KOVÁČ (1992) uvádí, že přítomnost železa, zinku, manganu, bóru, mědi a molybdenu jsou pro růst rostlin v kulturách *in vitro* nezbytná, zatímco ostatní

přidávané prvky jako kobalt, jód, chlór a sodík pro růst rostlin nezbytné být nemusejí. Podle HRADILÍKA (2005) bývají mikroelementy v kultivačních médiích obsahovány v koncentraci 0,1 – 100 μM .

Aminokyseliny

Aminokyseliny představují pro rostliny bezprostřední zdroj dusíku a používají se k podporování růstu při kultivaci rostlinných explantátů (KOVÁČ, 1992). Podle HRADILÍKA (2005) bývají do kultivačních médií přidávány např. tyto aminokyseliny: glycin, L-asparagin či L-glutamin.

Vitamíny

Vitamíny jsou katalyzátory metabolických procesů a jejich přítomnost je tak pro rostliny nezbytná. Rovněž mohou být limitujícím faktorem růstu rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* (KOVÁČ, 1992). Podle HRADILÍKA (2005) jsou do kultivačních médií nejčastěji přidávány tyto vitamíny: thiamin, pyridoxin, kyselina nikotinová a myo-inositol. Z těchto vitaminů je z hlediska růstu rostlinných explantátů nepostradatelný zejména thiamin (KOVÁČ, 1992). HRADILÍK (2005) uvádí, že do kultivačních médií mohou být přidávány též další vitamíny, např. kyselina askorbová, kyselina pantotenová, kyselina listová, biotin a riboflavin.

Sacharidy

Sacharidy představují pro rostliny zejména zdroj energie. Orchideje rostoucí v přírodě získávají sacharidy při fotosyntéze či prostřednictvím mykorrhizní houby. Pro podporu růstu rostlin v kulturách *in vitro* se používají exogenní cukry (VORÁČKOVÁ et al., 1998). V kultivačních médiích bývají cukry přítomny zejména ve formě sacharózy, a to obvykle v koncentraci 2 – 3%. PROCHÁZKA a VELÍSEK (1983) uvádějí, že obsah cukerného roztoku v kultivačním médiu by neměl přesahovat koncentraci 5%. PROCHÁZKA (1980) uvádí, že obsah cukrů v médiu o koncentraci nad 5% vyvolává u rostlin chlorózu. Podle NOVÁKA (1990) může přítomnost sacharózy v kultivačním médiu způsobovat „narušení fotosyntetické funkce“ listů vytvořených *in vitro*. VORÁČKOVÁ et al. (1998) uvádí, že obsah cukrů v kultivačním médiu pozitivně ovlivňuje růst a vývoj rostlin v kulturách *in vitro*, ale též pozitivně ovlivňuje úspěšnost převedení rostlin do podmínek *ex vitro*. SHA VALLI

KHAN et al. (1999) uvádí zvýšení zakořeňování při obsahu sacharózy v kultivačním médiu v rozmezí 1 – 3% a utlumování kořenění při dalším zvyšování obsahu sacharózy na 4 – 5% při kultivaci rostliny *Syzygium alternifolium* (Myrtaceae) *in vitro*.

Zpevňující látka

Kultivační média se obvykle rozlišují na tekutá a pevná. Hojně používanou zpevňující látkou u tuhých kultivačních médií je agar (KOVÁČ, 1992). Agar je získáván z některých ruduch (*Rhodophyta*), např. z rodu *Gelidium* (JELÍNEK a ZICHÁČEK, 2005). Zpevnění média je důležité pro ukotvení rostlinných explantátů, čímž může být zajišťován kontakt erxplantovaných částí rostlin se vzduchem (HRADILÍK, 2005). Agarový gel tuhne při teplotě 45°C (KOVÁČ, 1992), a jeho tuhost je možné ovlivňovat druhem agaru, hodnotou pH kultivačního média a též obsahem agaru v médiu (HRADILÍK, 2005). Podle KOVÁČE (1992) se koncentrace agaru v kultivačním médiu obvykle pohybuje v rozmezí 0,8 – 1%.

Růstové regulátory

Růstovými regulátory používanými při kultivaci rostlin *in vitro* v kultivačních médiích jsou podle KOVÁČE (1992) auxiny, cytokininy, gibbereliny a kyselina abscisová. Tyto látky patří mezi fytohormony.

Auxiny

Auxiny jsou typem fytohormonů, které podněcují dělení buněk, působí na vytváření adventivních kořenů, způsobují opadání listů a plodů a také zpomalují růst pupenů (PROCHÁZKA, S., 1998). Existuje několik chemických látek, které se řadí mezi auxiny. Mezi auxiny používané v kultivačních médiích patří podle HRADILÍKA (2005) např. kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) či kyselina naftyloctová (NAA). NAA je přírodním auxinem, IBA, 2,4-D a NAA jsou syntetickými auxiny (KOVÁČ, 1992). NOVÁK (1990) uvádí, že samotná 2,4-D má vliv na proliferaci kalusu.

HRADILÍK (2005) uvádí, že různé druhy auxinů se vyznačují různou účinností, na níž mají vliv i růstové podmínky a typ rostlinného explantátu. PROCHÁZKA, S., (1998) uvádí, že účinky auxinů se uplatňují při zakořeňování rostlinných řízků. Podle HRADILÍKA (2005) se vliv auxinů v kultivačním médiu projevuje zejména tím, že

podněcuje růst apikálních meristémů a růst kalusu a také působí na somatickou embryogenezi a na tvorbu adventivních kořenů. Podle NOVÁKA (1990) má výrazný vliv na podporu tvorby kořenů v podmínkách *in vitro* IBA.

Cytokyniny

Do kultivačních médií se přidávají např. tyto cytokyniny: benzylaminopurin (BAP), isopentenyladenin (2iP), furfurylaminopurin a zeatin (HRADILÍK, 2005). KOVÁČ (1992) uvádí, že benzylaminopurin (BAP) bývá též označován jako benzyladenin (BA). Podle PROCHÁZKY, S. (1998) přítomnost cytokyninů v kombinaci s přítomností auxinu v kulturách *in vitro* podněcuje dělení buněk a diferenciaci pupenů a kořenů. Oproti tomu HRADILÍK (2005) uvádí, že cytokyniny v kultivačním médiu mohou v některých případech tvorbě kořenů bránit. TEE et al. (2008) uvádějí utlumování tvorby kořenů na kultivačním médiu s obsahem BA a zakořeňování při kultivaci na médiu bez obsahu BA u rostliny *Dendrobium*.

Velmi záleží na vzájemném poměru auxinů a cytokyninů v kultivačním médiu. Rovněž celková množství auxinů a cytokinů v kultivačním médiu ovlivňují kultivaci rostlinných explantátů (KOVÁČ, 1992). PROCHÁZKA, S. (1998) uvádí, že pokud je obsah auxinu vyšší než obsah cytokininu, je podporována diferenciaci kořenů, zatímco vyšší obsah cytokininu než je obsah auxinu podporuje diferenciaci pupenů. Podle KOVÁČE (1992) je vyššími koncentracemi cytokyninů v kultivačních médiích dosahováno např. stimulace tvorby axilárních prýtů (inhibicí tzv. apikální dominance) u klonového množení rostlinných explantátů.

Gibereliny

Podle HRADILÍKA (2005) rostlinné explantáty v kulturách *in vitro* obvykle přítomnost giberelinů v kultivačním médiu nevyžadují. Gibereliny přidávanými do kultivačních médií bývají obvykle GA₃ a GA₇ (KOVÁČ, 1992). HRADILÍK (2005) uvádí, že giberelin GA₃ v kulturách *in vitro* podněcuje růst kalusu, růst buněčných struktur a využíván je rovněž k podpoře růstu zakrslých rostlin.

Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová patří do skupiny tzv. abscisinů (PROCHÁZKA, S., 1998). Přítomnost ABA v kultivačních médiích obvykle rovněž není nutná, podle

HRADILÍKA (2005) však bývá přidávána např. pro „indukci somatických embryí, stimulaci tuberizace, květní indukce, navození dormance“.

Ostatní složky médií

Do kultivačních médií byly v některých případech přidávány také složky (tzv. nedefinované organické složky médií), které mohou působit na růst kultivovaných rostlinných explantátů. Těmito složkami jsou např.: protein hydrolyzátu, kvasničný či sladový extrakt, extrakt z banánu, kokosové mléko či extrakt z pomerančové šťávy (KOVÁČ, 1992). PROCHÁZKA a VELÍSEK (1983) zmiňují rovněž používání rybí emulze a tomatové šťávy jako zvláštních složek kultivačních médií.

Přidáváno může být též aktivní uhlí, jehož hlavní funkcí v kultivačním médiu je schopnost pohlcovat metabolity explantátu, avšak zároveň mohou být pohlcovány fytohormony (HRADILÍK, 2005). Aktivní uhlí obsažené v kultivačním médiu též může přispět k zabránění hnědnutí rostlinných explantátů v kulturách *in vitro*, a to navázáním fenolových sloučenin produkovaných těmito explantáty (KOVÁČ, 1992).

2.3 Orchidej *Macodes petola* (Bl.) Lindl

Macodes petola (Bl.) Lindl se řadí do čeledi *Orchidaceae*, podčeledi *Neottoideae*, tribu *Neottieae* a subtribu *Physurinae*, rod *Macodes*. Subtribus *Physuriane* zahrnuje asi 30 rodů orchidejí, jimž je společný terestrický růst a měkké listy, obvykle výrazně zbarvené (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986). Stonky orchidejí subtribu *Physurinae* jsou dužnaté a polehavé či vzpřímené (RAJCHARD, 1995). Z hlediska nároků na světlo patří orchideje rodu *Macodes* mezi rostliny vyžadující stín (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986).

Rostliny rodu *Macodes* jsou stálezelené (NASH a LA CROIX, 2007), s neopadavými listy a bez období vegetačního klidu (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986). V přírodě rostou v nadmořských výškách 300 – 1400 m. n. m., v oblastech tropického deštného lesa či mlžného lesa při nízké intenzitě osvětlení, denních teplotách 21 – 27°C, nočních teplotách 16 – 18°C a trvalé vzdušné vlhkosti 78 - 80% (BALOUNOVÁ a RAJCHARD, 2001). Vyznačují se nápadně zbarvenými, ozdobnými listy, které jsou zelené, popř. červené, se zlatou žilkovanou kresbou (RÖLLKE, 2007). Podle DUŠKA a KŘÍSTKA (1986) jsou listy růžicovitě uspořádané. ERFKAMP (2008) uvádí, že listy rostlin rodu *Macodes* mají žilnatinu síťnatou.

Květenství jsou vzpřímená (NASH a LA CROIX, 2007), květy poměrně nevýrazné, malé, zbarvené dohněda (RÖLLKE, 2007), přičemž špičky tepalů jsou bílé (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986), a pysk je podle NASHE a LA CROIX (2007) trojlaločný.

Rostliny rodu *Macodes* se vyskytují v Jihovýchodní Asii (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986). Rod *Macodes* zahrnuje asi 9 rostlinných druhů a řadí se mezi rody, které jsou označovány jako tzv. „jewel orchids“ (NASH a LA CROIX, 2007). Orchideje patřící do rodu *Macodes* rostou terestricky, mohou však růst též epifyticky i litofyticky (BALOUNOVÁ a RAJCHARD, 2001). Do rodu *Macodes* patří např. tyto rostlinné druhy: *Macodes petola* Bl., *Macodes sanderiana* Rolfe a *Macodes marmorata* Bl. (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986).



Obrázek č. 1: *Macodes petola* (Bl.) Lindl (Suchý, 2005)

Druh *Macodes petola* (Bl.) Lindl se podle NASHE a LA CROIX (2007) vyskytuje v oblasti od Sumatry po Filipíny, RAJCHARD (1995) uvádí výskyt rostliny *Macodes petola* (Bl.) Lindl na Jávě a Malakce. Výška rostliny se pohybuje okolo 18

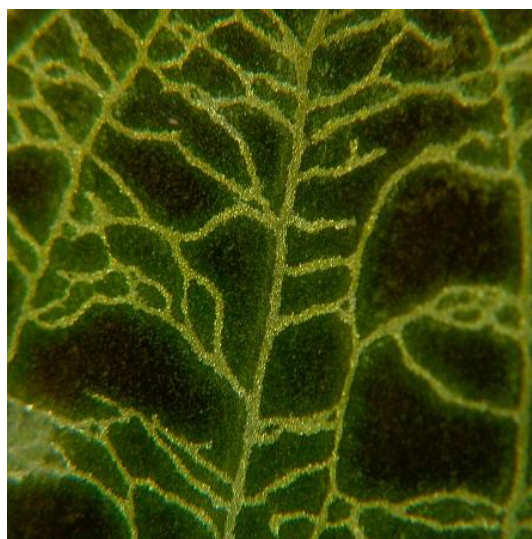
– 20 cm (NASH a LA CROIX, 2007), listy jsou dlouhé kolem 6 cm (DUŠEK a KŘÍSTEK, 1986) a velikost květů je 7 – 10 mm (RAJCHARD, 1995). Dorzální sepalum a petaly dohromady vytvářejí přílbovitý útvar (BALOUNOVÁ a RAJCHARD, 2001).

Velmi zajímavé jsou listy orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl, které jsou sametově zelené se zlatavou kresbou. Tyto listy vykazují známky adaptace na světelné podmínky v prostředí výskytu této orchideje – jedná se o konkávní tvar buněk tvořících pokožku listu, které zajišťují, že listy na svém povrchu nejsou mokré, a mohou také soustřeďovat světelné paprsky směrem k chloroplastům (BALOUNOVÁ a RAJCHARD, 2001).

Podle NASHE a LA CROIX (2007) ke kvetení rostlin druhu *Macodes petola* (Bl.) Lindl dochází v létě, přičemž kvetení u rostliny trvá asi 2 týdny (BALOUNOVÁ a RAJCHARD, 2001).



Obrázek č. 2: *Macodes petola* (Bl.) Lindl – list (Suchý, 2005)



Obrázek č. 3: *Macodes petola* (Bl.) Lindl – detail listu (Suchý, 2005)

3. METODIKA

3.1 Rostlinný materiál

Při práci byly připravovány rostlinné explantáty z rostliny *Macodes petola* (Bl.) Lindl, která byla pěstována v substrátu v nádobách. K tomuto účelu byly vybrány a použity pouze zdravě vypadající lodyhy rostlin o výšce cca 10-15 cm s dostatečným počtem velkých a nepoškozených listů.

3.2 Technické vybavení používané při práci

Práce probíhala v laboratoři vybavené flow boxem Labox s HEPA filtrem. Rostlinné explantáty převedené do prostředí *in vitro* byly umístěny do kultivačního boxu Sanyo MLR-351H. V boxu je nastavena teplota denní 26° C, noční 23° C, relativní vzdušná vlhkost denní 70%, noční 65 % a fotoperioda 12 hod. se světelnou intenzitou 13,5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ FAR.



Obrázek č. 4: Kultivační box (Suchý, 2011)



Obrázek č. 5: Laminární flow box Labox (Suchý, 2011)

Dále bylo používáno horské slunce vyzařující UV záření, které bylo zapínáno 1 hodinu před započítím práce a vypínáno bezprostředně před jejím započítím. Horským sluncem bylo ozařováno zejména prostředí flow boxu.

3.3 Pomůcky a chemikálie používané při práci

Při práci byl používán plynový kahan, laboratorní sklo (zejména kádinky a Petriho misky), pinzeta, ostré nůžky, skalpel, preparační jehla a hliníková fólie. Dále byla používána skleněná tyčinka k míchání roztoků a k pohybování rostlinnými explantáty při provádění jejich sterilizace. Při práci ve flow boxu byl používán také lihový kahan a buničina.

Z chemikálií byl používán etanol o koncentraci 70% a 80%, roztoky desinfekčního prostředku Savo a smáčedlo (Jar).

3.4 Sterilita prostředí a nástrojů

Pro úspěšné převedení rostlin z nesterilního prostředí do prostředí *in vitro* je stěžejní dodržování postupů a pravidel, které vedou k získání explantátů prostých infekce. Velmi důležité je dbát na vytvoření sterilního pracovního prostředí. Tomu značně napomáhá vzduch, který je nasáván přes filtr v zadní stěně flow boxu a hnán směrem ven. Neméně důležité je používat sterilní nástroje a dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci sterilní destilované vody, v níž jsou explantáty v závěrečné fázi postupu oplachovány.

Všechny nástroje a laboratorní sklo, které byly při práci používány, musely být před započítím práce sterilizovány. Sterilizace byla prováděna v sušárně při teplotě 110 °C, kam byly na 2 hodiny vkládány tyto pomůcky zabalené v hliníkové fólii.

Destilovaná voda používaná k oplachování a ředění desinfekčních prostředků byla sterilizována převařením. Povrch kádinky byl před zahříváním překryt hliníkovou fólií, což zabraňovalo odparu vody během vaření a zejména případné kontaminaci sterilní vody po převaření z okolního prostředí. Kádinka byla umístěna nad plynovým kahanem, destilovaná voda přivedena k varu a v něm udržovaná po dobu 30 minut. Poté byla již sterilní převařená destilovaná voda ponechána při pokojové teplotě, aby se ochladila a bylo ji možné použít při práci ve flow boxu.

Stěny a pracovní plocha flow boxu byly desinfikovány 80% roztokem etanolu, aplikovaným z rozprašovače.

3.5 Agarové médium

Rostlinné explantáty byly převáděny na živné agarové médium. Ve všech případech byl použit jeden typ média, a sice supermnoživé médium AK TDZ.

3.6 Metody převodu rostlinných explantátů na agar

Tropická terestrická orchidej *Macodes petola* (Bl.) Lindl byla kultivována do prostředí *in vitro* metodou jednonodálních segmentů na úrovni primokultury. Při převodu rostlinných explantátů na agar bylo použito několik dále popsaných metod, zaměřených na zkoumání optimalizace koncentrace sterilizačních prostředků a dobu jejich působení na rostlinné explantáty.

Metoda č. 1

Povrchová sterilizace rostlinných explantátů *Macodes petola* (Bl.) Lindl byla v této metodě prováděná 5% roztokem desinfekčního prostředku Savo po dobu 15 minut. V desinfekčním roztoku byla obsažena kapka smáčedla. Pracovní postup probíhal následovně:

1. Ze vzrostlých, v substrátu rostoucích rostlin *Macodes petola* (Bl.) Lindl bylo asi 3 cm nad zemí nůžkami odděleno několik lodyh o 5-6 listech (na některých místech z lodyhy vyrůstaly kořeny). Takto oddělené lodyhy byly opláchnuty ve vlažné sterilní destilované vodě, aby byly z rostliny odstraněny zbytky pěstebního substrátu a hrubé nečistoty.
2. Z opláchnutých lodyh byly nůžkami oddělovány jednotlivé explantáty, které byly tvořeny 1 nodem, 1 listem a částmi internodií, které byly ponechány asi 8 mm nad i pod nodem. Na některých explantátech byly ponechány drobné kořeny.
3. Připravené explantáty byly následně pomocí pinzety namočeny do 5 % roztoku Sava s kapkou smáčedla a přeneseny do aseptického prostředí flow boxu, kde byly ponechány celkem 15 minut. Přestože byly explantáty zcela ponořeny ve sterilizačním roztoku, bylo během této doby rostlinami občas

pohybováno pomocí dlouhé skleněné tyčinky, a to z toho důvodu, aby sterilizační roztok snáze pronikl ke všem částem rostliny.

4. Během 15 minut, kdy na rostliny působil sterilizační roztok, byla pozornost zaměřena na vysterilizování nástrojů jejich ponořením do 80 % etanolu a následným opálením ploch, které přijdou do kontaktu s vysterilizovanými explantáty, nad plamenem lihového kahanu. Rovněž uzavřené nádoby s agarovým médiem bylo nutné otřít buničinou namočenou v 80 % etanolu.
5. Po uplynutí 15 minut byly explantáty vyndány z roztoku Sava sterilní pinzetou a oplachovány po dobu 10 minut ve vychladlé převařené destilované vodě, která byla rozlita do 3 kádinek. Toto oplachování se provádělo proto, aby z explantátu byly odstraněny zbytky roztoku Sava.
6. Po opláchnutí explantátů ve sterilní destilované vodě byly jednotlivé explantáty přemístěny za pomoci sterilní pinzety na agarové médium, vždy po jednom explantátu do jedné nádoby s médiem.
7. Nádoby s explantáty byly přeneseny do kultivačního boxu.

Metoda č. 2

Tato metoda byla svým postupem velmi podobná metodě č. 1. Zatímco však u metody č. 1 byl list ponechán bez úprav, byla u této metody listová čepel zkrácena na 1-2 pětiny původní délky. Postup provádění této metody byl následující:

1. Z rostliny, která rostla v substrátu, bylo nůžkami odděleno několik lodyh, aby bylo získáno potřebné množství rostlinného materiálu pro vytvoření explantátů.
2. Oddělené lodyhy byly promyty ve vychladlé převařené destilované vodě.
3. Z lodyh byly ostrými nůžkami odděleny explantáty. Každý explantát byl tvořen jedním nodem, asi 8 mm dlouhými částmi internodií ponechanými nad a pod nodem a jedním listem, jehož čepel byla ostrými nůžkami zkrácena na zhruba 1-2 pětiny původní délky.
4. Tyto explantáty byly potopeny do 5 % roztoku Sava s kapkou smáčedla, přeneseny do flow boxu a za občasného zamíchání skleněnou tyčinkou

sterilizovány po dobu 15 minut. Současně byla prováděna sterilizace nástrojů, otírání nádobek s agarovým médiem a pracovní plochy flow boxu buničinou namočenou v 80 % etanolu.

5. Po 15 minutách byly explantáty vyjmuty sterilní pinzetou z roztoku Sava a 3x proplachovány v kádinkách se sterilní destilovanou vodou, aby z nich byly odstraněny zbytky Sava a smáčedla.
6. Po důkladném, cca pětiminutovém opláchnutí, byly explantáty pinzetou přemístěny do nádobek na agarové médium.
7. Explantáty umístěné na agarovém médiu byly přeneseny do kultivačního boxu.

Metoda č. 3

Při této metodě byla ověřována sterilizace explantátů postupným použitím obou desinfekčních roztoků, nejprve 70 % etanolem a poté 2,5 % roztokem Sava. Dále bylo při této metodě prováděno zakracování internodia, a to z důvodu odstranění rostlinných pletiv, která mohou být poškozena použitím sterilizačních prostředků. Postup při provádění metody č. 3:

1. Z rostliny rostoucí v substrátu byly nůžkami odděleny lodyhy asi 3 cm nad substrátem.
2. Oddělené lodyhy byly krátce opláchnuty ve vychladlé převařené destilované vodě. Pro lepší odstranění hrubých nečistot bylo lodyhami pohybováno pomocí dlouhé skleněné tyčinky.
3. Z lodyh byly nůžkami odděleny jednotlivé explantáty. Každý explantát byl tvořen jedním nodem, jedním listem a dvěma asi 8 mm dlouhými internodii, z nichž jedno internodium rostlo nad nodem a druhé pod nodem. Některý explantát obsahoval i drobný kořen.
4. Následně byl každý explantát ponořen na 15 sekund do kádinky se 70 % etanolem a přenesen do flow boxu.
5. Po vyjmutí explantátu z etanolu následovalo jeho opláchnutí ve sterilní destilované vodě.

6. Po opláchnutí ve sterilní destilované vodě byly explantáty přemístěny sterilní pinzetou do 2,5% roztoku Sava s kapkou smáčedla a v tomto roztoku byly za občasného zamíchání skleněnou tyčinkou ponechány po dobu 10 minut.
7. Po vyjmutí z roztoku byly 3x oplachovány v kádinkách se sterilní destilovanou vodou po dobu 5 minut.
8. Po třetím opláchnutí byly explantáty z destilované vody vyjmuty a sterilními nůžkami byla oddělena asi 3 mm dlouhá část internodia rostoucího pod nodem.
9. Takto připravené explantáty byly přeneseny umístěny na agarové médium a následně umístěny do kultivačního boxu.

Metoda č. 4

Při provádění této metody bylo jako sterilizačního prostředku použito pouze roztoku Sava s kapkou smáčedla, oproti předchozím metodám však byla významně prodloužena doba desinfekce explantátů. Rovněž u této metody bylo prováděno zkracování internodia pod listem. Postup metody:

1. Z rostliny rostoucí v substrátu byly odděleny lodyhy s dostatečným počtem listů. Tyto lodyhy byly za pomoci skleněné tyčinky oplachovány ve sterilní destilované vodě.
2. Po důkladném opláchnutí byly lodyhy z destilované vody vyjmuty a pomocí ostrých nůžek vytvořeny explantáty. Tyto explantáty opět sestávaly z jednoho nodu, jednoho listu a 2dvou asi 8 mm dlouhých internodií. V tomto případě nerostl z explantátů kořen.
3. Následovala sterilizace v 3 % roztoku Sava s kapkou smáčedla. Explantáty byly přeneseny do sterilizačního roztoku a nádoba s tímto roztokem a explantáty byla umístěna ve flow boxu. Explantáty bylo v roztoku občas pohybováno pomocí skleněné tyčinky. Celková doba sterilizace činila 25 minut.
4. Po uplynutí 25 minut byly explantáty vyjmuty z roztoku Sava sterilní pinzetou a 3x důkladně oplachovány ve sterilní destilované vodě po dobu asi 5 minut.

5. Po opláchnutí byl každý explantát vyjmut sterilní pinzetou z destilované vody a internodium pod listem bylo sterilními ostrými nůžkami zkráceno asi o 3 mm.
6. Takto vysterilizované a upravené explantáty byly umístěny na agarové médium při snaze o jejich umístění do média pod úhlem 45°.

Metoda č. 5

Také tato metoda byla založena na provádění povrchové sterilizace rostlinných explantátů v etanolu i v roztoku Sava. Koncentrace Sava byla zvolena 2,5%, ale byla prodloužena doba působení na explantát. Při této metodě nedocházelo k odstříhávání internodia. Postup metody:

1. Ze zdravé vzrostlé rostliny *Macodes petola* (Bl.) Lindl byly odděleny lodyhy. Tyto lodyhy byly krátce oplachovány ve vlažné sterilní destilované vodě.
2. Po vyjmutí lodyh z vody byly ostrými nůžkami připraveny jednotlivé explantáty. Každý z explantátů byl tvořen jedním listem a dvěma internodii. Na žádném z nich se nevyskytoval kořen.
3. Každý explantát byl na 15 sekund ponořen do 70 % etanolu a následně opláchnut ve sterilní destilované vodě.
4. Poté byly explantáty přemístěny za pomoci pinzety do roztoku Sava o koncentraci 2,5% s kapkou smáčedla a v tomto roztoku byly explantáty ponechány po dobu 15 minut.
5. Po vyjmutí sterilní pinzetou a trojím oplachování v kádinkách se sterilní destilovanou vodou se odstranily zbytky desinfekčního prostředku. Celková doba oplachování byla asi 5 minut.
6. Po přenesení explantátů sterilní pinzetou na živné médium byly umístěny do kultivačního boxu.

Metoda č. 6

Tato metoda byla prováděna jako metoda č. 5, avšak doba sterilizace v roztoku Sava byla prodloužena z 15 na 20 minut a bylo prováděno odstříhávání internodia pod listem. Postup metody:

1. Z mladé rostliny *Macodes petola* (Bl.) Lindl byly nůžkami odštíženy lodyhy s potřebným počtem listů. Celé lodyhy s listy byly oplachovány ve vlažné sterilní destilované vodě.
2. Po opláchnutí byly lodyhy vyjmuty z vody a nůžkami z nich byly odděleny explantáty. Každý explantát byl tvořen jedním listem a dvěma částmi internodií. Kořen se nevyskytoval na žádném z těchto explantátů.
3. Každý explantát byl ponořen na 15 sekund do 70 % etanolu. Po 15 sekundách byl krátce omýván v kádince se sterilní destilovanou vodou.
4. Poté byly explantáty přemístěny do 2,5% roztoku Sava s kapkou smáčedla a za občasného míchání v něm byly ponechány po dobu 20 minut.
5. Po jejich vyjmutí byly explantáty sterilní pinzetou přemístěny do kádinek se sterilní destilovanou vodou a promývány 3x po dobu 5 minut.
6. Po vyjmutí byly za pomoci sterilních ostrých nůžek a sterilní pinzety z explantátů odstraněny 1-3 mm dlouhé části internodia pod listem a explantáty přemístěny na agarové médium.
7. Explantáty umístěné na agarovém médiu byly přeneseny do kultivačního boxu.

Tabulka č. 1: Metody převodu rostlinných explantátů na agar

Přehled použitých metod				
Číslo metody	Počet rostlinných explantátů (ks)	Etanol 70% (s.)	Koncentrace Sava (%)	Doba působení (min.)
1	10	-	5	15
2	10	-	5	15
3	10	15	2,5	10
4	8	-	3	25
5	5	15	2,5	15
6	7	15	2,5	20

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Rostlinné explantáty orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl byly převedeny na živná agarová média metodami uvedenými v kapitole 3.5 této diplomové práce. Tyto rostlinné explantáty byly sledovány po několik týdnů a jejich stav a vývoj byl průběžně zapisován. Pozornost byla věnována zejména sledování počtu kontaminovaných explantátů a explantátů bez kontaminace, u kterých byl dále sledován počet explantátů, které začaly růst, a těch, které nevykazovaly růst, popř. se u nich objevovala nekrotizace rostlinných pletiv.

Metoda č. 1

U této metody bylo jako sterilizační činidlo použito pouze Savo, a to v 5% koncentraci, s přidáním malého množství smáčedla. Doba sterilizace činila 15 minut. Tato metoda se ukázala jako nevhodná, jelikož u rostlinných explantátů se poměrně rychle objevovala kontaminace a během 3 týdnů všechny rostlinné explantáty zkontaminovaly.

Metoda č. 2

Při převodu rostlinných explantátů do prostředí *in vitro* touto metodou bylo použito stejné koncentrace sterilizačního činidla i doby působení jako u metody č. 1, tedy působení 5% roztoku Sava s kapkou smáčedla na rostlinné explantáty po dobu 15 minut. Dále však bylo oproti metodě č. 1 sledováno, zda při zmenšení listové plochy bude docházet k lepšímu růstu rostlin vlivem snížení transpirace. Tento předpoklad se nepotvrdil, rostliny se jevily oslabenými, a vzorky v poměrně krátké době zkontaminovaly (do 3 týdnů zkontaminovalo 100% vzorků).

Metoda č. 3

Při této metodě byla použita kombinace 70% etanolu a roztoku Sava o koncentraci 2,5% s kapkou smáčedla. Jelikož etanol působí v silných koncentracích dehydrataci rostlinných pletiv, což vede k oslabování rostlin, popř. k nekrotizaci rostlinných pletiv, byla vzhledem k povaze rostlin zvolena pouze 70% koncentrace a rovněž koncentrace Sava byla oproti jiným metodám značně snížena, a to na 2,5 %. Používání kombinace obou těchto dezinfekčních prostředků byla přizpůsobena i doba sterilizace v roztoku Sava, a to na 10 minut.

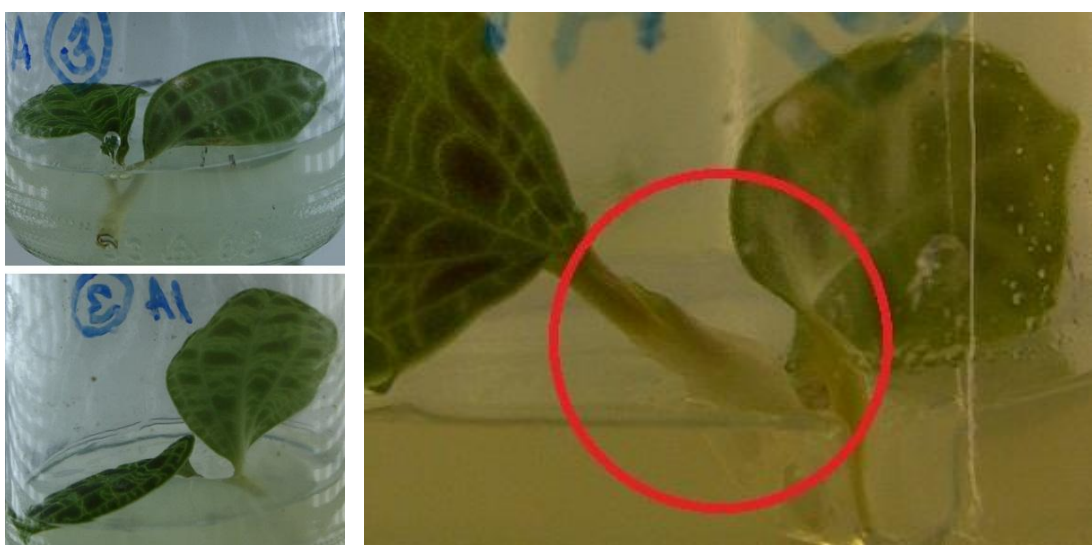
U explantátů převáděných do podmínek *in vitro* touto metodou se kontaminace objevila velmi rychle, avšak pouze u části vzorků. Do 1 týdne zkontaminovalo 50% vzorků, během 3. týdne dosáhla kontaminace hodnoty 80% vzorků. Po třetím týdnu se u zbývajících 20% vzorků kontaminace již neobjevila. U těchto 20% rostlinných explantátů se neobjevily žádné výrazné projevy nekrotizace tkání, rostliny působily zdravě a po 8 týdnech od kultivace se u všech 20% explantátů objevilo vyrůstání nových listů.

U vzorků převáděných metodou č. 3 se objevila např. následující kontaminace:



Obrázek č. 6: Metoda č. 3 – kontaminace (Suchý, 2011)

Při použití této metody zůstaly 2 rostlinné explantáty bez kontaminace a navíc se u nich objevil růst:



Obrázek č. 7: Metoda č. 3 – rostlinné explantáty bez kontaminace (Suchý, 2011)

Obrázek č. 8: Metoda č. 3 – růst nového listu u rostlinného explantátu (Suchý, 2011)

Metoda č. 4

Desinfekčním prostředkem při převádění rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl do prostředí *in vitro* bylo v této metodě pouze Savo s kapkou smáčedla. Oproti jiným metodám převodu rostlinných explantátů do prostředí *in vitro* popisovaným v této práci, při kterých byl použit pouze roztok Sava s malým množstvím smáčedla, došlo při této metodě k výraznému prodloužení doby sterilizace.

Cílem této metody bylo zjistit, zda při sterilizaci tímto desinfekčním prostředkem hraje významnější roli vyšší koncentrace roztoku při kratší době působení (metody č. 1 a 2) či naopak nižší koncentrace Sava při prodloužení doby sterilizace. Proto byla při této metodě snížena koncentrace Sava na 3% a doba sterilizace prodloužena na 25 minut.

Explantáty převedené do prostředí *in vitro* touto metodou nevykazovaly po dobu prvních 3 týdnů žádné známky kontaminace. Během 4. týdne se však kontaminace postupně projevila u všech rostlinných explantátů. Po 4 týdnech od kultivace byl tedy počet zkontaminovaných vzorků 100%.



Obrázek č. 9: Metoda č. 4 - Rostlinné explantáty kultivované metodou č. 4 po 3 týdnech od kultivace (Suchý, 2011)

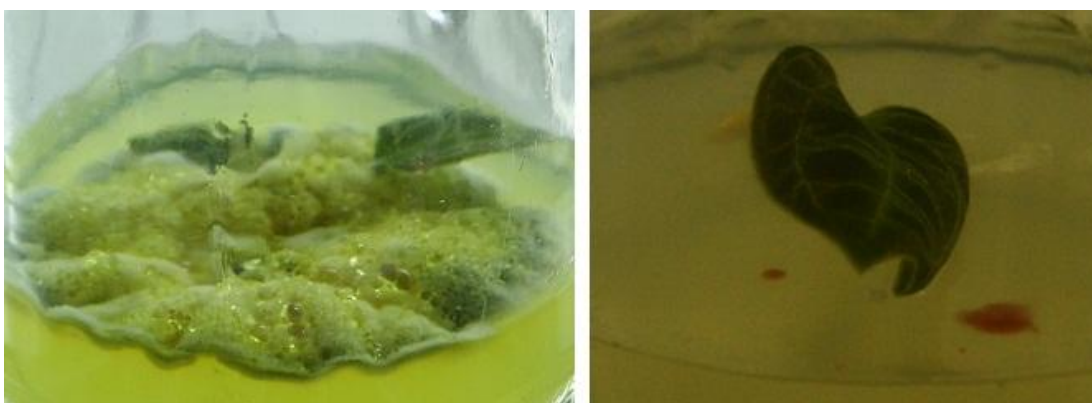


Obrázek č. 10: Metoda č. 4 – kontaminace (Suchý, 2011)

Metoda č. 5

Tato metoda je založena na desinfekci rostlinných explantátů pomocí 70 % etanolu a 2,5% roztoku Sava s kapkou smáčedla. Kombinace těchto dvou desinfekčních prostředků byla s částečným úspěchem použita u metody č. 3. Doba desinfekce v 70 % etanolu činila při použití této metody, stejně jako u metody č. 3, 15 sekund, doba desinfekce v roztoku Sava s kapkou smáčedla však byla oproti metodě č. 3 mírně prodloužena, a to na 15 minut. Část internodia pod listem u rostlinných explantátů při použití této metody nebyla odstraňována.

Po 3 týdnech od převodu rostlin do prostředí *in vitro* se objevila kontaminace u 40%. Během 4. týdne se objevila kontaminace u dalších 20%.



Obrázek č. 11: Metoda č. 5 – kontaminace (Suchý, 2011)

U rostlinných explantátů kultivovaných do prostředí *in vitro* touto metodou byl zaznamenán růst u 1 rostlinného explantátu. Jednalo se o růst kořene, vyrůstání nových listů pozorováno nebylo.

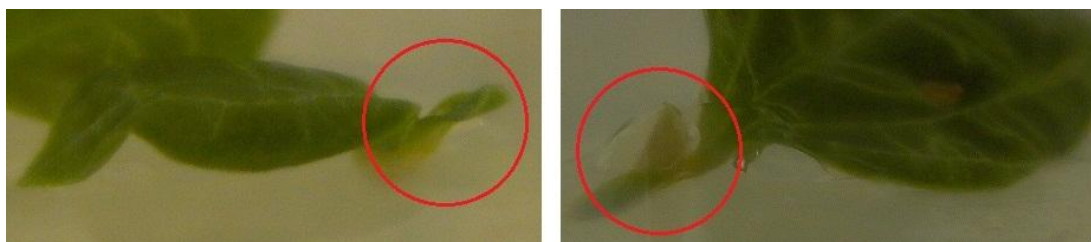
Metoda č. 6

Při této metodě byly použity stejné desinfekční prostředky ve stejných koncentracích jako u metody č. 5. Pouze doba působení roztoku Sava s kapkou smáčedla na rostlinné explantáty byla prodloužena na 20 minut.

Během prvních 3 týdnů se kontaminace neobjevila u žádného ze vzorků a činila tedy 0%. Po 4. týdnu od kultivace rostlinných explantátů kontaminace dosahovala hodnoty 28,5%.

Ve 4. týdnu od převedení explantátů na živnou půdu se objevily u 2 rostlinných explantátů známky růstu. Růst byl pozorován zejména v úžlabí listů

na vrcholové části rostliny, kde se objevily nově vyrůstající listy. Během pozorování nebyl zaznamenán žádný růst kořenů.



Obrázek č. 12: Metoda č. 6 - růst rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl (Suchý, 2011)

Tabulka č. 2: Výsledky

Výsledky celkem				
Číslo metody	Kontaminace (%)		Bez kontaminace (%)	Růst (% všech vzorků)
	Po 3 týdnech	Po 4 týdnech	Po 4 týdnech	
1	100	100	0	-
2	100	100	0	-
3	80	80	20	20
4	0	100	0	-
5	40	60	40	20
6	0	28,5	71,5	28,5

Na základě vpředu uvedených skutečností, zjištěných při kultivaci rostlinných explantátů tropického druhu orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl, lze v diplomové práci formulovat následující výstupy:

1. Výběr vhodného sterilizačního prostředku a vliv doby jeho aplikace

Používání pouze roztoku desinfekčního prostředku Savo o koncentraci 3 – 5% s malým množstvím smáčedla se při mikropropagaci orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl neosvědčilo, neboť kontaminace se postupně projevila u všech rostlinných explantátů převedených do prostředí *in vitro*, u kterých byla povrchová sterilizace prováděna tímto způsobem.

Rostlinné explantáty orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl, které byly povrchově sterilizovány v roztoku Sava o nižší koncentraci po delší dobu sterilizace zůstaly

bez kontaminace po delší dobu, než ty rostlinné explantáty, které byly povrchově sterilizovány v roztoku Sava o vyšší koncentraci a kratší době sterilizace.

Jednoznačně nejúčinnějšími se ukázaly být metody založené na kombinaci používání 70% etanolu a následně roztoku Sava. S využitím těchto metod bylo dosaženo velmi dobrých výsledků při povrchové sterilizaci rostlinných explantátů (zejména u metody č. 6). Rovněž nebyly shledány žádné výraznější známky nekrózy rostlinných pletiv. U takto převedených explantátů se objevily známky růstu.

SVOBODOVÁ (2007), která prováděla povrchovou sterilizaci rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl 70% etanolem po dobu 20 s. uvádí, že při použití tohoto způsobu povrchové sterilizace zůstalo 100% rostlinných explantátů bez kontaminace, avšak růst se neobjevil ani u jednoho z kultivovaných rostlinných explantátů. Metody založené na snížení doby působení 70% etanolu na 15 sekund a použití ještě dalšího desinfekčního prostředku, používané při provádění kultivace rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl. do prostředí *in vitro* se ukázaly být efektivní z hlediska celkového vlivu na rostlinné explantáty této orchideje. Přestože počet rostlinných explantátů kultivovaných *in vitro* bez projevené kontaminace nebyl v tomto případě 100% (nejlepší dosažené výsledky byly 71,5%), celkový stav těchto rostlinných explantátů byl velmi dobrý, neobjevovaly se nekrózy rostlinných pletiv a navíc byly zaznamenány projevy růstu.

2. Citlivost rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl při různých metodách povrchové sterilizace

Výběr desinfekčních prostředků a postup sterilizace při kultivaci rostlinných explantátů je nutné přizpůsobit konkrétnímu druhu rostliny, stáří rostliny a jejímu zdravotnímu stavu, neboť tyto faktory rovněž hrají důležitou roli v úspěšnosti převodu rostlin do podmínek *in vitro*.

ORCUTT a NILSEN (1996) uvádějí, že druhy rostlin, které jsou přizpůsobené prostředí s nižší ozářeností, mají větší a tenčí listy s tenčí kutikulou. S přihlédnutím k tomuto poznatku byly používány při kultivaci orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl. do prostředí *in vitro* desinfekční prostředky o nižších koncentracích a dobách působení, aby rostlinná pletiva byla při povrchové sterilizaci pokud možno co nejméně poškozena.

U některých metod použitých při kultivaci orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl., popisovaných v této diplomové práci, byla odstříhávána část internodia pod listem o velikosti 1 – 3 mm. HRADILÍK (2005) doporučuje odříznutí obou konců internodií rostlinného explantátu, které by mohly nasát sterilizační roztok. Část internodia pod listem byla zkracována při provádění kultivace rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl do podmínek *in vitro* pomocí metody č. 3, č. 4 a metody č. 6. Při použití metod č. 3 a č. 6 byl zjištěn nejen růst u rostlinných explantátů, ale i jejich dobrý zdravotní stav. U rostlinných explantátů kultivovaných *in vitro* metodou č. 5 nebyl pozorován růst listů.

3. Další faktory ovlivňující kultivaci rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl v prostředí *in vitro*

Při kultivaci *Macodes petola* (Bl.) Lindl do prostředí *in vitro* je důležité vzít v úvahu skutečnost, že tato orchidej patří mezi velmi pomalu rostoucí rostliny. Podle DUŠKA a KRÍSTKA (1986) se růst u rostlinných pletiv orchidejí kultivovaných do prostředí *in vitro* pomocí meristémových kultur rostlin objevuje po 3 týdnech, v některých případech teprve po 3 měsících.

KOVÁČ (1992) uvádí, že nejvyššího růstu rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* je dosahováno tehdy, jsou-li rostlinné explantáty odvozovány z rostliny, která se nachází v aktivní růstové fázi. Podle PROCHÁZKY, S. (1998) ovlivňuje morfogenezi v kulturách *in vitro* fytohormonální stav v pletivech, ze kterých jsou rostlinné explantáty odvozovány. Při kultivaci orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl se růst objevil u rostlinných explantátů ve stejnou dobu, přestože u některých rostlinných explantátů tato doba činila 8 týdnů a u jiných necelé 4 týdny od kultivace do podmínek *in vitro*.

Ohledně světelných nároků orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl, již bylo zmíněno, že rostliny rodu *Macodes* rostou v oblastech, kde je nízká intenzita osvětlení (BALOUNOVÁ a RAJCHARD, 2001). PROCHÁZKA, S. (1998) uvádí, že hodnota kompenzační ozářenosti (tzv. světelný kompenzační bod) se u rostlin nejčastěji vyskytuje mezi 5 – 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ FAR. DVOŘÁČEK (2007) zjistil, že světelný kompenzační bod fotosyntézy u *Macodes peola* (Bl.) Lindl nastává při hodnotě ozářenosti kolem 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Světelné podmínky nastavené

v kultivačním boxu při kultivaci orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl. v podmínkách *in vitro*, popisované v této diplomové práci, se v této souvislosti zdají být nastaveny vhodně i vzhledem ke skutečnosti, že při kultivaci *in vitro* se obvykle používají snížené hodnoty ozáření. Podle DUŠKA a KŘÍSTKA (1986) lze orchideje úspěšně pěstovat bez přítomnosti denního světla.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo ověřování některých způsobů kultivace tropické orchideje *Macodes petola* Bl. Lindl v prostředí *in vitro*. Za tímto účelem byly kultivovány jednonodální segmenty této rostliny na úrovni primokultury.

Desinfekčními prostředky používanými při povrchové sterilizaci rostlinných explantátů byly etanol v koncentraci 70% a roztoky desinfekčního prostředku Savo o různých koncentracích s přidáním malého množství smáčedla. V některých případech byl používán pouze roztok Sava, jiné metody využívaly kombinace obou těchto desinfekčních prostředků.

Nalezení optimální koncentrace desinfekčních prostředků a vhodné doby jejich použití ke sterilizaci rostlinných explantátů je individuální, především s přihlédnutím ke druhu kultivované rostliny. Byly zkoušeny různé metody s cílem nalezení těch vhodných pro vytýčený cíl a naopak vyloučení nevhodných metod k povrchové sterilizaci rostlinných explantátů orchideje *Macodes petola* Bl. Lindl. Rostlinné explantáty kultivované v prostředí *in vitro* byly po provedení jednotlivých metod průběžně sledovány, zejména z hlediska zda dochází k projevům kontaminace. Na základě průběžných výsledků vývoje v těchto kulturách byly koncipovány metody, používané při dalších kultivacích této orchideje.

Jako nejvhodnější se ukázala být sterilizace 70% etanolem po dobu 15 sekund s následnou sterilizací v 2,5% roztoku Sava s kapkou smáčedla, popisovaná v metodě č. 6. Tato metoda vedla k úspěšnosti 71,5% při kultivaci jednonodálních segmentů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl v podmínkách *in vitro*. Zároveň se ukázalo, že použití tohoto způsobu sterilizace je šetrné k rostlinným pletivům této orchideje, neboť se neobjevily významné nekrózy rostlinných pletiv a dokonce se objevily projevy růstu.

6. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

1. AGUSTINI, V., SUFAATI, S., SUHARNO. Mykorrhizal Association of Terrestrial Orchids of Cycloops Nature Reserve, Jayapura. [online] [cit. 14. 3. 2011, 12:23 hod.]. dostupné na [www:](http://www.biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1004/D100403.pdf)
<http://www.biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1004/D100403.pdf>
2. BALOUNOVÁ, Z., RAJCHARD, J. *Macodes petola* (Bl.) Lindl., ekologie a kultivace. Interorchid 2001: sbírka referátů, Brno 16. 3. – 17. 3. 2001. MZLU, Brno, 2001. Str. 89 – 94. ISBN 80-7157-564-X.
3. CASANOVA, E., MOYSSET, L., TRILLAS, M. I. Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biologia plantarum*, 52(1): 1-7. ISSN 0006-3134
4. DUŠEK, J., KŘÍSTEK, J. *Orchideje*. Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, 1986. 1. vyd. 204 s.
5. DVOŘÁČEK, J. (2007). Stanovení některých fyziologických parametrů orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl. [Diplomová práce]. České Budějovice, 37 s. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra biologických disciplín.
6. ERFKAMP, J. *Kouzelné orchideje*. Praha: Euromedia Group, k.s. – Knižní klub v Praze, 2008. 1. vyd. 144 s. ISBN 978-80-242-2198-4.
7. GRYNDLER, M., BALÁŽ, M., HRŠELOVÁ, H., JANSÁ, J., VOSÁTKA, M. *Mykorrhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin*. Praha: Academia, 2004. 1. vyd. 366 s. ISBN 80-200-1240-0.
8. HRADILÍK, J. *Rostlinné explantáty*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2005. 1. vyd. 85 s. ISBN 80-7157-915-7.
9. JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V. *Biologie pro gymnázia (teoretická a praktická část)*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2005. 8. aktualizované vydání. 576 s. ISBN 80-7182-177-2.
10. JEŽEK, Z. *Encyklopedie orchidejí*. Rebo International, b. s., Nizozemí, Rebo productions CZ, spol. s r.o., Dobřejovice, 2003. 1. vyd. 308 s. ISBN 80-7234-305-X.
11. KOVÁČ, J. *Explantátové kultury rostlin*. Ústí nad Labem: Pedagogická fakulta UJEP, 1992. 1. vyd. 146 s. ISBN 80-7044-036-8.
12. NASH, N., LA CROIX, I. *Orchideje, Více než 1500 druhů orchidejí*. Brno: Computer Press, a. s., 2007. 1. vyd. ISBN 978-80-251-1459-9.
13. NILSEN, E. T., ORCUTT, D. M. *Physiology of plants under stress: abiotic factors*. New York: John Wiley & Sons, 1996. 1. ed. 689 s. ISBN 0-471-03512-6.
14. NOVÁK, F. J. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Praha: Academia, 1990. 1. vyd. 208 s. ISBN 80-200-0344-4.

15. PROCHÁZKA, F. *Naše orchideje*. Pardubice: Krajské muzeum východních Čech – pracoviště Pardubice, 1980. 1. vyd. 296 s.
16. PROCHÁZKA, F., VELÍSEK, V. *Orchideje naší přírody*. Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, 1983. 1. vyd. 284 s.
17. PROCHÁZKA, S. *Botanika: Morfologie a fyziologie rostlin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998. 1. vyd. 242 s. ISBN 80-7157-313-2.
18. RAJCHARD, J. *Pěstování orchideje v láhvi*. Živa: časopis přírodnický. Číslo 3/1995, s. 116 – 117. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd. ISSN 0044-4812.
19. RÖLLKE, F. *Orchideje*. Praha: Nakladatelství Jan Vašut, s. r. o., 2007. České 1. vyd. 128 s. ISBN 978-80-7236-497-8.
20. SHA VALLI KHAN, P.S., HAUSMAN, J.F., RAO, K.R. Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on *in vitro* rooting of *Syzygium alternifolium*. *Biologia plantarum*, 42 (3): 333-340, 1999. ISSN 0006-3134.
21. SVOBODOVÁ, S. (2007): Možnosti kultivace orchideje *Macodes petola* technikami *in vitro*. [Diplomová práce]. České Budějovice, 38 s. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra biologických disciplín.
22. TEE, C. S., MAZIAH, M., TAN, C. S. Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium Sonia* 17. *Biologia plantarum*, 52 (4): 723-726, 2008. ISSN 0006-3134. ISSN 0006-3134.
23. TSAY, H.-S. Use of tissue culture for the mass propagation of pathogen-free plants. [online] [cit. 14. 3. 2011] Dostupné na www.agnet.org/library/tb/158/tb158.pdf
24. VORÁČKOVÁ, Z., LIPAVSKÁ, H., KONEČNÝ, P. The efficiency of transfer of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions as affected by sugar supply. *Biologia plantarum*, 41 (4): 507-513, 1998. ISSN 0006-3134.
25. VOTRUBA, M. a kol. *Explantátové techniky (pro biotechnologii a šlechtitele)*. Praha: Vysoká škola zemědělská v Čs. Redakci VN MON, 1987. 1. vyd. 102 s.
26. ZOUN, M. *Orchideje. Druhy vhodné pro pěstování v domácích podmínkách*. Brno: Computer Press, a. s., 2008. 303 s. ISBN 978-80-251-2135-1.
27. Situační a výhledová zpráva – okrasné rostliny, prosinec 2009. Odbor rostlinných komodit MZe. Vydalo Ministerstvo zemědělství. [online][cit. 26. 4. 2011] dostupné na http://eagri.cz/public/web/file/36224/Okrasne_rostliny_12_2009.pdf
28. Zákon č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění.
29. Vyhláška č. 395/92 Sb., vyhláška k provedení některých ustanovení zákona č. 114/92 Sb.