

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Vegetativní množení vybraných druhů střešníků rodu

***Paphiopedilum* in vitro**

diplomová práce

Zdeněk Roule

vedoucí práce

Doc. RNDr. Hana Čížková, CSc.

konzultant

Mgr. Bohumil Vondruš

České Budějovice 2012

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích, dne 15. 4. 2009

Podpis:

Poděkování

Chtěl bych poděkovat paní RNDr Haně Čížkové, CSc za odborné vedení, konzultace a za veškerý čas, který mi věnovala. Dále bych chtěl poděkovat panu Mgr. Bohumilu Vondrušovi a jeho firmě Explantex za uskutečnění této práce (poskytnutí rostlinného materiálu, prostoru i chemikálií), za jeho trpělivost a nepřehledné množství informací, o které se rád podělil. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým rodičům za jejich podporu při studiu.

Anotace

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

Klíčová slova: TDZ, *Paphiopedilum charlesworthii*, *Paph. delenatii*, *Paph. delenatii* var. *vinicolor*, další hybridy rodu *Paphiopedilum*, světlo, teplota

Annotation

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

Key words: TDZ, *Paphiopedilum charlesworthii*, *Paph. delenatii*, *Paph. delenatii* var. *vinicolor*, other hybrids of genus *Paphiopedilum*, light, temperature

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Literární přehled.....	9
2.1 Rod <i>Paphiopedilum</i>	9
2.2 Popis studovaných druhů	11
2.2.1 <i>Paphiopedilum delenatii</i> (PA 6922)	11
2.2.2 <i>Paphiopedilum charlesworthii</i> (HPA 2951)	12
2.2.3 <i>Paphiopedilum delenatii</i> var. <i>vinicolor</i> (PA 6747).....	13
2.2.4 Použité hybridy	13
2.3 Metody množení u tropických druhů čeledi <i>Orchidaceae</i>	14
2.3.1 Současné používané metody množení orchidejí	16
2.3.2 Vegetativní množení <i>ex vitro</i> :	16
2.3.3 Vegetativní množení <i>in vitro</i> :	17
2.3.4 Generativní množení <i>ex vitro</i>	17
2.3.5 Generativní množení <i>in-vitro</i>	18
2.3.6 Metodické nároky na kultivace <i>in vitro</i>	18
2.4 Úloha TDZ v explantátových kulturách.....	19
2.5 Oceňování klonů	19
2.6 Biologické kontaminanty	20
2.6.1 Základní charakteristika.....	20
2.6.2 Růstové regulátory a rezistence vůči patogenům.....	21
2.6.3 Účinek virových infekcí.....	21

2.6.4 Účinek organismů podobných mykoplazmě.....	22
2.6.5 Vliv bakteriálních onemocnění	22
2.6.6 Účinek houbových onemocnění.....	23
3 Metodika	25
3.1 Uspořádání pokusů.....	25
3.1.1 Pokus č. I.....	25
3.1.2 Pokus č. II	27
3.2 Technologický postup	28
3.2.1 Složení média.....	28
3.2.2 Příprava základních roztoků pro médium MS	28
3.2.3 Příprava zásobních roztoků vitamínů.....	30
3.2.4 Příprava samotného média AKZ.....	30
3.2.5 Příprava a umístění explantátu do média	31
4 Výsledky	32
4.1 Pokus č. I.....	32
4.1.1 Průběh pokusu:.....	32
4.1.2 Zhodnocení pokusu:	34
4.2 Pokus č. II	37
4.2.1 Průběh pokusu:.....	37
4.2.2 Zhodnocení pokusu:	37
5 Diskuze.....	39
6 Závěr	41
7 Seznam použité literatury.....	42

1 Úvod

Rod střevíčník (*Paphiopedilum*) patří spolu s dalšími šesti druhy a jedním rodem z čeledi *Orchidaceae* mezi nejpřísněji chráněné orchideje na světě. (<http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>, 3. 12. 2011). Podle Washingtonské úmluvy (CITES) se nachází v kategorii s nejpřísnějším stupněm ochrany, CITES I, která je klasifikována jako druhy ohrožené vyhynutím. Jedná se o rod obsahující 61 druhů (Cribb 1998) vyskytujících se v malých nepočetných skupinách.

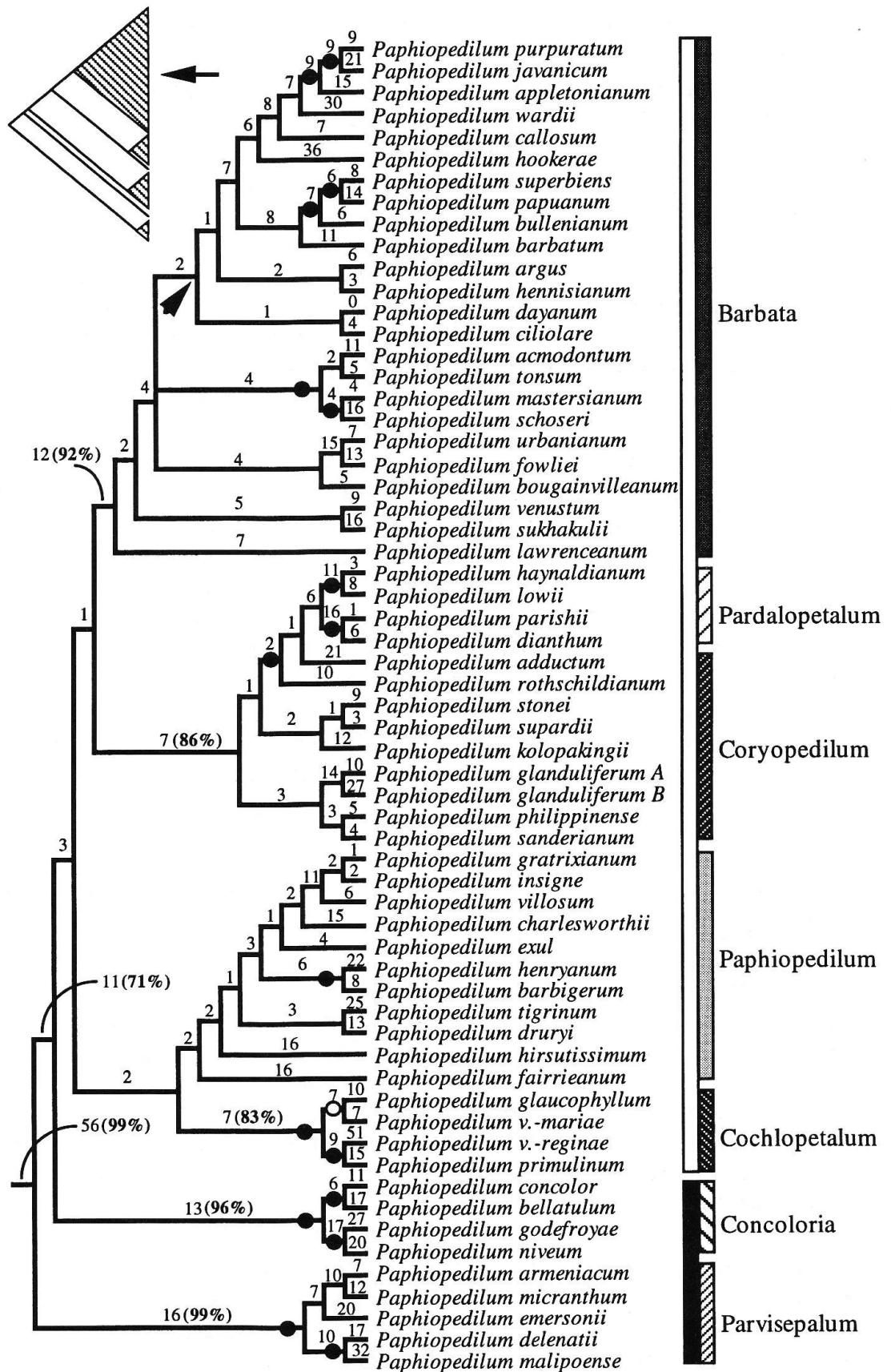
Díky přístupu mnoha lidí k životnímu prostředí a vidině zisku mizí přírodní stanoviště střevíčníků značnou rychlostí. V závislosti na úbytku přirozených biotopů ubývají i počty těchto skvostných rostlin. Další příčinou jejich ohrožení je jejich atraktivní vzhled, který láká mnohé pěstitele, aby je získali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

2 Literární přehled

2.1 Rod *Paphiopedilum*

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

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



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

2.2 Popis studovaných druhů

Dále uvedený popis studovaných druhů (*Paph. delenatii*, *Paph. charlesworthii*) je založen na údajích Cribba (1998).

2.2.1 *Paphiopedilum delenatii* (PA 6922)

Paph. delenatii je (obr. 2) terestricky rostoucí rostlina s trsnatým růstem. Listů 6 – 7, eliptické až podlouhle-eliptické, tupé, na vrcholu trochu (jemně) trojzubé. Dlouhé jsou maximálně do 11cm, široké 3 -3,9cm, okraje listů na bázi nálevkovité, tmavě skvrnitě



Obr. 2 *Paph. delenatii* (<http://www.slipperorchids.info>, 2012)

směrem k apexu listu světle zelené, na spodní straně silně fialově skvrnitě. Květenství nese 1 obvykle však 2 květy; květní stvol dlouhý do 22cm, fialový, bíle chlupatý; listen eliptický až vejčitý, 1,2 – 1,5cm dlouhý, 1cm široký, zelený s fialovými skvrnami, krátce chlupatý. Květy jsou atraktivní o průměru květu 7,5 – 8cm, růžové nebo světle růžové s červeně a žlutě zbarveným sloupkem, chlupatým po obou stranách; květní stopka a semeník dlouhé do 5,5cm, fialové, chlupaté. Dorsální sepala vejčitá, tupá až subakutní, 1,7 – 3,5cm dlouhá, 1,8 – 2,5

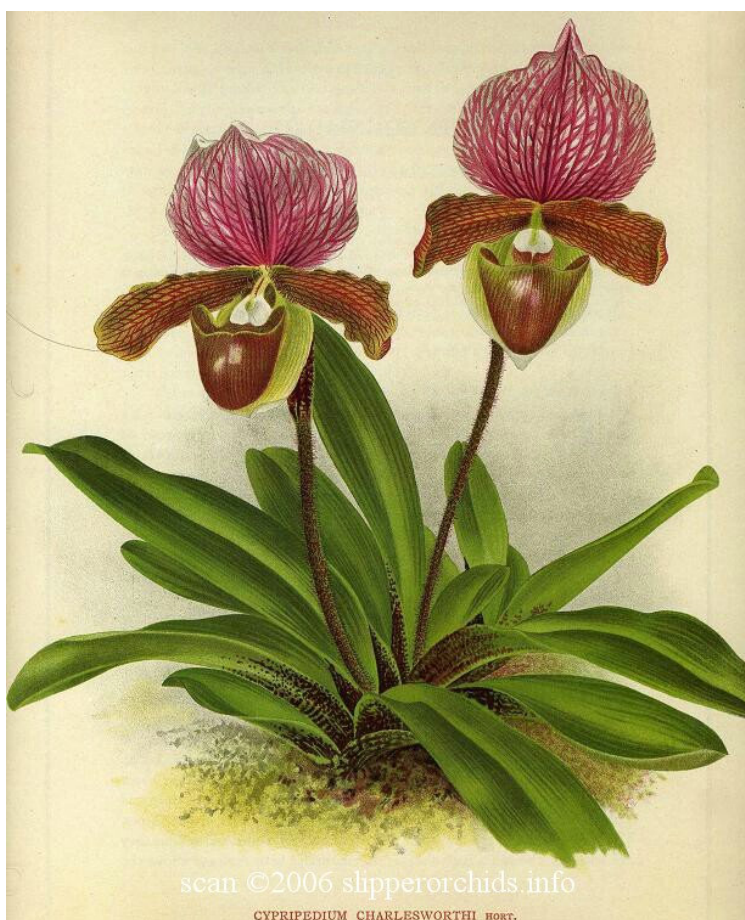
široká. Synsepala (větvená struktura vzniklá částečným nebo úplným srůstem dvou nebo více sepal) obdobná, 1,9 – 3cm dlouhá a 1,4 – 2,9cm široká. Petaly široce eliptické, tupé nebo na koncích zakulacené, 3 – 4,3cm dlouhé a 2,4 – 3,8cm široké. Pysk elipsovitý až zakulacený, 2,5 - 3,8cm dlouhý a 2,5 – 3cm široký, okraje podvinuté

dovnitř pysku, řídce chlupatý (pýřitý). Sloupek poněkud vydutý, vejčitý a tupý, 1,4 – 1,7cm dlouhý, 1,3 - 1,6cm široký, jemně pýřitý. $2n = 26$.

Rozšíření: Pouze ve Vietnamu v nadmořských výškách 800 – 1300 (- 1500) m. n. m.

2.2.2 *Paphiopedilum charlesworthii* (HPA 2951)

Paph. charlesworthii (obr. 3) je terestricky rostoucí rostlina. Listy jsou tupě eliptické nebo lineárně-tupé, špičaté trojzubé na vrcholu, dlouhé 15 cm a 2,8 cm široké, shora zelené, na bázi fialově skvrnitě. Rostlina nese jeden květní stvol, dlouhý 8 – 15 cm,



Obr. 3 *Paph. charlesworthii* (<http://www.slipperorchids.info>, 2012)

krátce chlupatý, světle zelený s mnoha kaštanovými skvrnami. Listen je obvejčitý, velmi tupý, 2,9 – 3,2 dlouhý, 1,4 – 2 cm široký, světle zelený, sytě kaštanově skvrnitý, jemně chlupatý. Květ je 8 cm velký, dorzální sepala růžová s tmavší žilnatinou nebo občas s bílou; petaly světle žlutozelené s hnědou síťnatou žilnatinou; pysk růžovohnědý s tmavší žilnatinou. Sloupek bílý; květní stopka a semeník je 2,8 – 3,9 cm dlouhý, světle zelený s tmavě kaštanovými skvrnami a je pokryt

chloupky kaštanové barvy. Dorzální sepala je napříč eliptická až kulovitá, tupá, 4,4 – 5,7cm dlouhá a 4,7 – 6,6cm široká. Postranní okraje dorzální sepaly jsou ploché, nazpět ohnuté, jemně chlupaté na vnější straně. Synsepala je velmi malá, eliptická až špičatá, 3,8 – 4cm dlouhá, 2 - 2,8cm široká, světle žlutá, skvrnitá, se světle fialovou žilnatinou, bez jemných chlupů. Petaly se rozprostírají více či méně horizontálně, jsou nepatrně

zahnuté dovnitř, jazykovité - lžicovité, tupé, 4 – 4,4cm dlouhé a 2,6 – 2,7cm široké, mírně chlupaté směrem k vrcholu. Pysk s širokým ústím do láčky je 3,8 – 4,3cm dlouhý a 2,6 – 2,7cm široký, uvnitř chlupatý. Sloupek je obvejčitý, 9 – 10mm dlouhý, 10mm široký, lysý, s centrálně se zvedajícím nažloutlým výstupkem. $2n = 26$.

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

2.2.3 *Paphiopedilum delenatii* var. *vinicolor* (PA 6747)

Jedná se o typově stejnou rostlinu jako je výše popsané *Paph. delenatii*. Rozdílem je pouze zbarvení pysku (obr. 4), které je oproti výše zmíněnému druhu tmavě fialové a temně fialová spodní strana listu.



Obr. 4 *Paph. delenatii* var. *vinicolor* detail květu (www.slipperorchids.info)

2.2.4 Použité hybridy

***Paphiopedilum* Pulsar x Hsinying Redjo (PA 6759)**

***Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx (PA 6905)**

***Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Goto' x Hsinying Dragon 'Ching Hua' (PA 7071)**

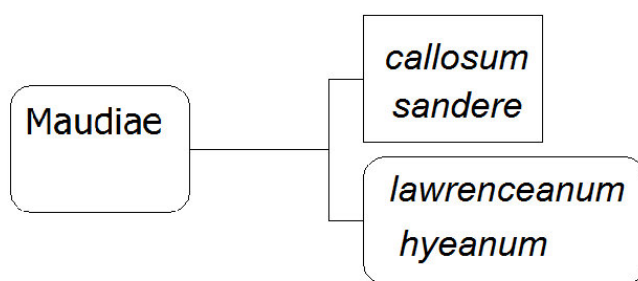
***Paphiopedilum* Hsinying Silvercharm x Maudiae 'Silverado' AM/AOS (PA 6801)**

Na základě získaných údajů z databáze Royal Horticultural Society (RHS, 2012), v sekci The International Orchid Register, jsem vytvořil pro hybridy ***Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx** (příloha 1- 6) a

Paphiopedilum Pulsar x Hsinying Redjo (příloha 7 - 11) šlechtitelský postup křížení. Tyto údaje sahají až mezi prvotní primární hybridy daných složitých hybridů. Na základě těchto údajů si je možné vytvořit přibližnou představu o vzhledu výsledného hybridu. Spolu s ostatními hybridy, jejichž „rodokmen“ se mi nepodařilo v databázi dohledat, tvoří skupinu podobných znaků. Jedná se o tzv. typ *Maudiae*.

O *Paphiopedilum Maudiae* bylo napsáno mnohé. Pro představu a obecný přehled jsem proto zařadil i krátce něco o tomto hybridu. V roce 1900 firma Josepha Charleswortha, Haywards Heath, registrovala křížence druhů *Paphiopedilum callosum sandere* s *Paphiopedilum lawrenceanum hyeantum* jako *Paphiopedilum Maudiae* (obr. 5 a b). Jednalo se o albinotické formy rodičovských rostlin, a když bylo o tomto hybridu poprvé publikováno v *The Orchid Review* (říjen, 1900) zvedla se vlna ohlasů. Již v tentýž rok v září byl tento hybrid oceněn první cenou a získal titul First Class Certificate (FCC) (podrobnější přehled oceňování hybridů viz níže v kap. 2.5) od Manchester Orchid Society.

Za mnoho let od vzniku *Paph. Maudiae* vzniklo i několik barevných variet, které se stejně jako původní hybrid těší obrovské přízně pěstitelů. Do současné je jedním z nejpoužívanějších hybridů do dalších šlechtitelských postupů.



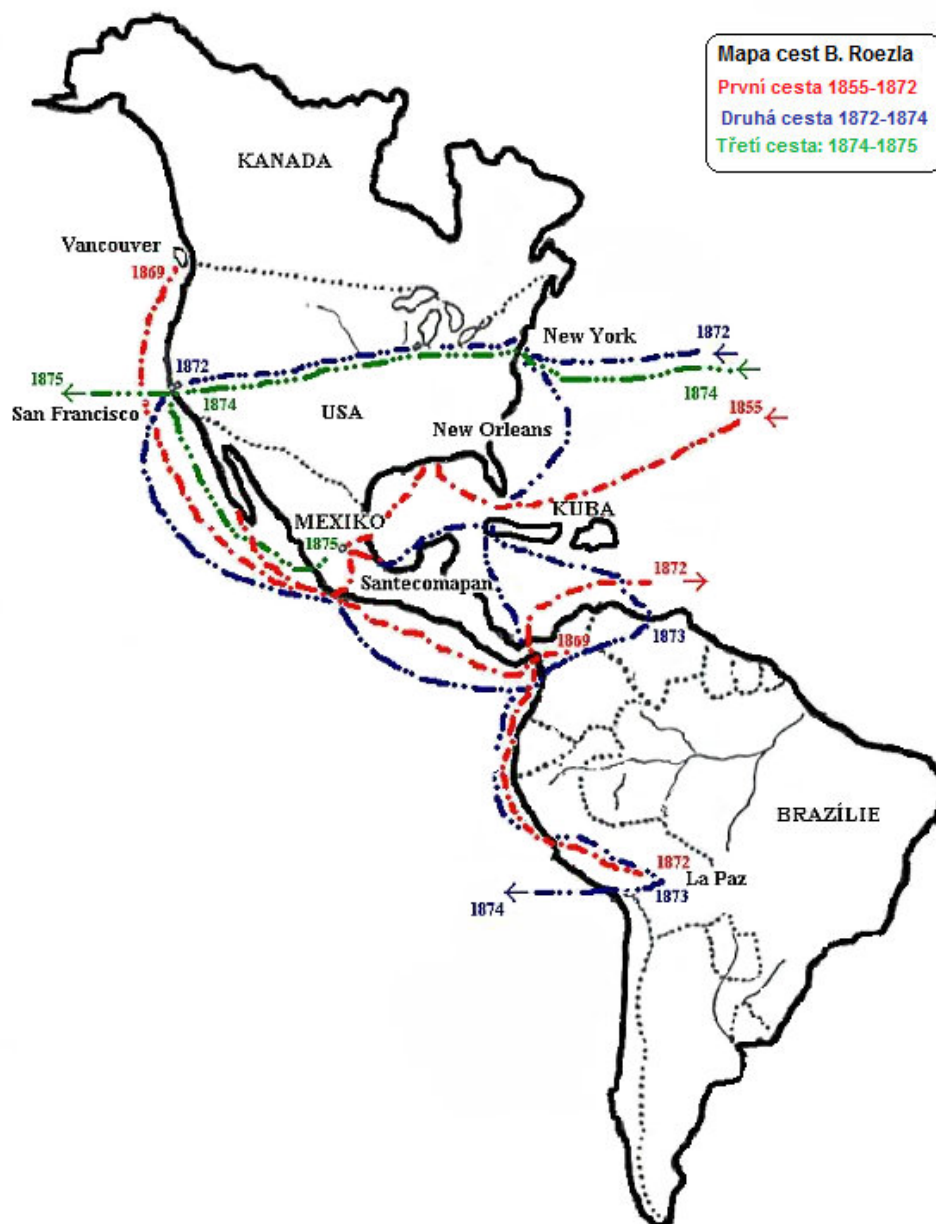
b

Obr. 5a- *Paphiopedilum Maudiae*, **b-** postup křížení botanických druhů *Paphiopedilum callosum sandere* a *Paphiopedilum lawrenceanum hyeantum* za vzniku *Paphiopedilum Maudiae*.

2.3 Metody množení tropických druhů čeledi *Orchidaceae*

První kultivační snahy se týkaly tropických orchidejí. V 19. století začaly evropské expedice pronikat hlouběji do tropických pralesů (obr. 6), odkud přivážely mnoho nových druhů pozoruhodných rostlin, především orchidejí, které se staly módními a

oblíbenými okrasnými květinami. Velká poptávka však nemohla být uspokojována množením rostlin v Evropě, které nebylo úspěšné, neboť klíčení semen v podmínkách *ex vitro* probíhá pouze za přítomnosti vhodné symbiotické houby, což není při běžném výsevu zajištěno (Flos 1957). Proto pocházela většina prodávaných rostlin z dovozu, což vedlo k exploataci tropických pralesů. Například jen v roce 1875 vyvezl Benedikt Roezl z Mexika 100 000 orchidejí získaných levně od domorodců (rangeros). Mnoho rostlin transport nepřežilo (Hoffmanová 1993).



Obr. 6 Cesty B. Roezla za lovením orchidejí (převzato a upraveno z <http://botany.cz/cs/roezl/>, 2012)

2.3.1 Současné používané metody množení orchidejí

Obecně lze říci, že současné metody množení můžeme rozdělit do dvou skupin, množení vegetativní a generativní. Každou z těchto skupin lze rozdělit na další dvě podskupiny podle způsobu kultivace na kultury *in vitro* a *ex vitro*.

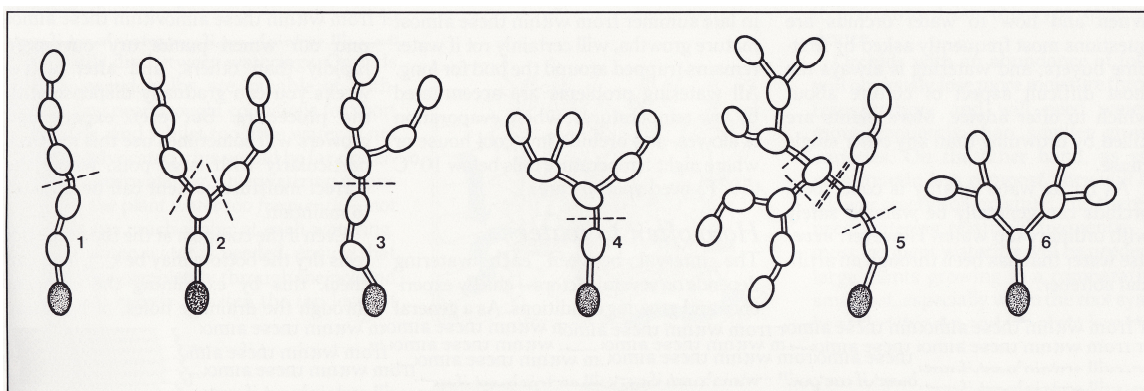
2.3.2 Vegetativní množení *ex vitro*

Vegetativně lze bez problémů namnožit všechny orchideje sympodiálního růstu. Využívá se tak zvaného dělení trsu, kdy se od mateřské rostliny oddělí několik pahlíz nebo trsů (obr. 7) (Williams 1984).

Takto jsou množeny oceněné klony kvůli zachování genetické identity (habitu). Pro širší využití je metoda ekonomicky neefektivní vzhledem k nedostatku matečných rostlin a také proto, že matečné rostliny nejsou schopné produkce dostatečného množství odnoží.

U monopodiálně rostoucích orchidejí se využívají pro kultivaci *ex vitro* keiky (rod *Phalaenopsis* a *Doritis*), jejichž tvorba se dá podpořit keiky pastou, která se nanáší na květní stvoly použitých druhů. Tvorbu odnoží například u rodu *Vanda* nebo *Ascocentrum* můžeme podpořit dekapitací (odříznutí vrcholové partie rostliny).

U některých terestritů, jako jsou orchideje okrasné listem, je možné k vegetativnímu množení použít řízky z poléhavých stonků (*Ludisia*, *Anoectochilus*, *Macodes*).



Obr. 7 Způsoby dělení trsu u různých typů odnožování sympodiálních orchidejí. **1.** Šest pahlíz/růžic můžeme rozdělit tak, aby nám vznikly dvě rostliny, **2.** Zajistěte, aby každý dělenec měl tři pahlízy/růžice, **3.** a **4.** terminální části dceřiných rostlin mohou být odděleny od starších pahlíz/růžic jak je znázorněno na obrázku, **5.** Rostlinu lze dále dělit, **6.** Tato rostlina by neměla být rozdělena do doby, než se více rozroste.

2.3.3 Vegetativní množení *in vitro*

Způsob množení *in vitro*, můžeme také nazvat explantátovými kulturami. Explantátové kultury rostlin vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. Jde o oddělení určité části ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny a umístění této části rostliny do sterilního prostředí, kde se kultivuje (Novák 1990). Tento způsob množení se používá například u rodu *Cattleya* nebo *Cymbidium* (Zákrejs 2000), při kterém se odebírají meristémová pletiva a následně se z nich zakládají meristémové kultury.

Dalším ze způsobů, jak účinně namnožit některé rody orchidejí, je kultivace ze spících pupenů květního stvolu. Nejčastěji se této metody využívá u rodů *Phalaenopsis*, *Doritis* a všech jejich hybridů s ostatními rody orchidejí. Používají se i segmenty (výseky listů), u kterých se vyvolá tvorba kalusu a z něho regenerace protokormů (změnou média).

2.3.4 Generativní množení *ex vitro*

Do doby, než Američan L. Kudson v roce 1917 přišel s aseptickým asymbiotickým výsevem *in-vitro* (Steward F. C. 1958), se pěstitelé orchidejí pokoušeli o generativní množení orchidejí běžnými zahradnickými způsoby. Cílem jejich snah bylo, účinné množení, ale i možnost šlechtění. Při svých pokusech zjistili, že semena klíčí při výsevech k mateřským rostlinám rostoucích ve starých sklenících, kde již byla půda dostatečně inokulována houbami. Příčinu objasnil Francouz Noel Bernard (1899), když objevil závislost klíčící rostlinky na mykorhize. Současně se mu podařilo získat první semenáčky výsevem semen hlístníku hnízdáku (*Neottia nidus-avis*) na umělou kulturu mykorhizní houby získané z kořenů mateřské rostliny. Na jeho pokusy navázal německý badatel Hans Burgeff (1911), který takto vyséval vstavač mužský (*Orchis mascula*) a vstavač vojenský (*Orchis militaris*). Tento způsob nazývaný symbiotický výsev se stal první možností generativního množení orchidejí. Jeho úspěšnost je však omezena obtížnou udržitelností rovnováhy mezi houbou a orchidejí a i tak docházelo k odumírání většiny semenáčků. Tento způsob množení není efektivní. Důvodem je velmi nízká klíčivost.

2.3.5 Generativní množení in-vitro

Významný krok ve výzkumu množení orchidejí učinil ve 20. letech Američan Lewis Knudson, když zjistil, že hlavními látkami, které získávají orchideje symbiózou s houbou, jsou sacharidy. Knudson v roce 1917 poté prvně získal semenáčky tropických orchidejí aseptickým výsevem semen na agarovou živnou půdu s obsahem maltózy, která nahradila přítomnost hub (Steward F. C. 1958). Proto je metoda nazývána asymbiotický výsev. Asymbiotický výsev je v současnosti hojně využíván k množení tropických orchidejí (zvláště při získávání nových hybridů křížením), jinak se okrasné tropické druhy množí ve velké míře vegetativně explantátovými kulturami vycházející právě z *in-vitro* výsevů) (Bo Long et al. 2010, Chyuam-Yih Ng et al. 2011). V dnešní době jde o nejvyužívanější způsob rozmnožování všech druhů čeledi *Orchidaceae*.

2.3.6 Metodické nároky na kultivace in vitro

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

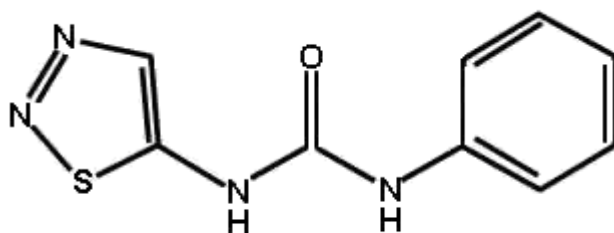
Pokud pracujeme se sterilní kulturou, jako je tomu v případě této práce, materiál umístíme do flow boxu, který běžel alespoň 15min před samotnou manipulací v něm (aby došlo k ustálení proudu vzduchu). Láhev s kulturou a všechny pracovní pomůcky, které do boxu vkládáme, povrchově desinfikujeme lihem.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

2.4 Úloha TDZ v explantátových kulturách

Ve své práci využívám pozitivních účinků TDZ na regenerační procesy v kulturách in vitro. Na základě několika prací zabývajících se podobnou problematikou a využití TDZ v pozitivních regeneračních procesech (Yung-Haw Lin et al. 2000, Bo Long et al. 2010, Chyuam-Yih Ng et al. 2011) jsem se rozhodl pro jeho užití ve své diplomové práci.

Tidiazuron (TDZ) patří mezi růstové regulátory do specifické skupiny cytokininů. TDZ je aromatickým derivátem močoviny (obr. 8). Jeho hlavním účinkem je stimulace buněčného dělení a je základem regeneračních procesů in vitro. Cytokininy jako takové ovlivňují některé reakce v buněčném cyklu, pravděpodobně stimulují některé z kináz. Mají ale také významný vliv na replikaci DNA ve fázi S mitózy: zvyšují množství počátků replikace, tzn. že zkracují replikony, a tím urychlují přepis DNA synchronizují buněčné dělení v pletivech (Procházka et al. 1998).

Změnou poměru koncentrací cytokininů a auxinů je možné ovlivňovat průběh regenerace. Jejich vyrovnaný poměr vede k tvorbě nediferencovaného pletiva (kalusu), nadbytek cytokininů vyvolává regeneraci prýtů a naopak zvýšením hladiny auxinů docílíme regeneraci kořenů (Miller 1956).



Obr. 8 Strukturální vzorec tidiazuronu

2.5 Oceňování klonů

Součástí některých jmen kultivarů se stává také zkratka ceny, která mu byla udělena. Ceny udělují komise orchidejářských společností v pravidelných termínech nebo

zvláštní komise při významných výstavách. O stupni ocenění rozhoduje počet bodů podle pravidel. Nejstarší a nejvýznamější jsou First Class Certificate (FCC za 90 bodů a více), Award of Merit (AM za 80 – 89 bodů) a Highly Commended Certificate (HCC za 75 – 79 bodů). Tato ocenění udělují anglická Royal Horticultural Society (RHS), American Orchid Society (AOS) a s lokálnějším významem i další společnosti v Asii a Austrálii. Uvedeným cenám odpovídají zlatá, stříbrná a bronzová medaile Německé orchideářské společnosti (DOG) pro hodnocení květů (GM/DOG, SM/DOG a BM/DOG) hybridů (GH/DOG, SH/DOG, a BH/DOG) a pro botanické druhy (GB/DOG, SB/DOG a BB/DOG). Příkladem ceny udělené na světové orchidejářské konferenci je třeba GM/8.WOC (zlatá medaile 8. World Orchid Conference). Jméno oceněného kultivaru je tedy například *Brassocattleya Cliftonii* ‘Magnifica’ FCC/RHS, které se přirozeně opět přenáší pouze na vegetativně získané potomky. Zprávy o udělených cenách přinášejí odborné orchidejářské časopisy, rostliny jsou s nimi uvedeny v katalozích, ale souborně zpracovány nejsou (Gut 2010).

2.6 Biologické kontaminanty

2.6.1 Základní charakteristika

Jedním z největších nepřátel explantátových kultur jsou kontaminanty, které způsobí v lepším případě jen kontaminaci živného média s explantátem ve druhém případě, a to horším, úhyn explantátu. Bohužel se u prvního případu snižuje následnou desinfekcí schopnost explantátu přežít, hrozí opětovné kontaminace a mnoho dalších nepříznivých faktorů. Proto jsem se níže zabíval problematikou kontaminantů podrobněji.

Termínem biologické kontaminanty máme na mysli v první řadě bakterie a houby nacházející se vně i uvnitř explantátové kultury nebo v prostoru laboratoře. Zdroje znečištění zahrnují: vzduch laboratoře, pevné povrchy, osoby a nesprávně připravené tkáňové kultury. Při zamoření v explantátové kultury je potřeba co nejdříve najít zdroj znečištění a vyvarovat se tím dalším kontaminacím. V první řadě je třeba zkontrolovat, zda nedošlo k pochybení personálu a porušení některého z pravidel správné manipulace s materiálem (Cassells 1991).

Pokud není příčinou neopatrná manipulace je třeba hledat určitý druh patogenu, který kulturu infikoval. V následujícím textu jsou uvedeny různé typy patogenů a jejich vliv na hladiny růstových regulátorů, které ovlivňují reakci či úhyn explantátu.

2.6.2 Růstové regulátory a rezistence vůči patogenům

Patogeny svým působením na atakované rostliny ve vztazích interakce patogen – hostitel – prostředí způsobují výrazné změny v hormonální regulaci. Změny v obsahu fytohormonů vedou v konečném důsledku k fyziologickým a morfologickým změnám, které se obvykle označují jako symptomy onemocnění a v konečném důsledku celkově ovlivňují život rostlin. Mezi možné účinky patogenů na fytohormony můžeme zařadit syntézu *de novo*, přeměny mezi jejich volnými a vázanými formami, jakož i transportní a detoxikační účinky. Tyto změny pak ovlivňují syntézu nukleových kyselin, enzymů, proteinů a dalších strukturálních látek rostlinných buněk, pletiv a orgánů. Problematika účinku patogenů na hladinu regulátorů rostlinného růstu je velmi složitá a musí být sledována samostatně u jednotlivých skupin patogenů, jako jsou viry, mykoplasmy (MLO), bakterie a houby (Procházka et al. 1997).

2.6.3 Účinek virových infekcí

Mnohé symptomy virových onemocnění předpokládají změny v biosyntéze anebo v metabolismu růstových regulátorů. Vzhledem k tomu, že parciální měření endogenních hladin fytohormonů je velmi složité, užívá se srovnávacích studií mezi zdravými a infikovanými částmi rostlin. Auxinová hladina se podle těchto studií snižuje. Rovněž bazipetální transport auxinů se snižuje. Aplikace auxinů má vliv na virové replikace, ale je závislá na stáří rostlin před ošetřením v kombinaci virus – hostitel (Procházka et al. 1997). Bailiss (1974) a Aharoni et al. (1977) ve svých pracích uvádějí, že hladina giberelinů (dále jen GA₃) se v průběhu onemocnění snižuje. Exogenní aplikace GA₃ nepřinesla obecně platný efekt. Cytokininová hladina se pod vlivem virových onemocnění zvyšuje (Goodman et al. 1986). Huaifang a Chiu (1985) při studiu obsahu cytokininů ve zdravých rostlinách náchylných a rezistentních vůči virovým onemocněním zjistili vyšší hladinu cytokininů u rostlin rezistentních než u rostlin náchylných. Exogenní aplikace cytokininů byly účinné jen tehdy, byly-li realizovány před infekcí (Tavantzis 1978). Jejich produkce je při těchto onemocněních zvýšena. Pritchard a Ross (1975) ve své práci uvádějí, že mechanismus účinku není zatím znám. Účinek těchto onemocnění na hladinu kyseliny abscisové (dále jen ABA) není

jednoznačně uzavřen: v některých případech byly zaznamenány stimulační účinky na tvorbu ABA, někdy však nebyly v obsahu ABA zjištěny žádné změny. Také při studiu role ABA v rezistenci proti virovým onemocněním nebyly získány jednoznačné výsledky (Rajagopal 1977).

2.6.4 Účinek organismů podobných mykoplazmě

O účinku organismů podobných mykoplazmě (MLO, mycoplasma-like organisms) na hladiny regulátorů rostlinného růstu je v literatuře málo údajů. Zatím je známo, že přímo napadené orgány, vyznačující se symptomy těchto onemocnění, mají zvýšenou hladinu cytokininů. Studie obsahu ABA a GA₃ v červeném rybízu (*Ribes rubrum*) ukázaly snížení obsahu giberelinů a zvýšení obsahu ABA (Pecho a Vizárová 1990).

2.6.5 Vliv bakteriálních onemocnění

Z bakteriálních onemocnění byly nejvíce prostudovány účinky *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* sp., *Erwinia* sp. (Odutayo et al. 2004). Morris (1986) udává, že v současné době je znám genetický materiál *Agrobacterium tumefaciens*, který tvoří kromě bakteriálního chromozomu dvojvláknová molekula DNA, tzv. plazmid *Ti*, nesoucí úseky T-DNA, jež obsahují geny zodpovědné za biosyntézu a produkci indolyl-3-octové kyseliny (IAA). Sumarizací doposud zjištěných výsledků bylo zjištěno zvyšování hladin regulátorů rostlinného růstu vlivem přítomnosti patogenu v rostlinách. K výraznému zvýšení hladiny IAA dochází již 48 hodin po infekci. V současné době však nejsou jednoznačně uzavřeny názory na mechanismus zvyšování hladiny IAA v nemocných pletivech. Předpokládá se produkce patogenu, ale i zvýšená syntéza v atakovaných pletivech, jakož i změny v enzymatické degradaci. Je však všeobecně známo, že při těchto onemocněních dochází k fenoménu tzv. hyperauxinu. IAA má podstatnou roli v tvorbě tumorů rostlin (Procházka et al. 1997). Nester a Kosuce (1981) studiem mechanismů jejich tvorby zjistili, že plazmidy *Ti* inhibují rostlinné protoplasty a indukují fenotypické odpovědi charakteristické pro toto onemocnění. Nemocná pletiva pocházejí z transformovaných protoplastů obsahujících přesné segmenty plazmidů T-DNA, jež jsou integrovány do rostlinné DNA. *Ti*-plazmid DNA, který obsahuje geny *ipt* a *tzs* je též zodpovědný za biosyntézu a produkci cytokininů *in vitro*. Jsou to geny kódující proteiny s izopentyl-transferázovou aktivitou. Gen *ipt* odpovídá za cytokininovou autonomii v transformovaných buňkách. Gen *tzs* je odpovědný za sekreci trans-zeatinu. V současné literatuře jsou četné údaje o

produkci cytokininů různými kmeny bakterií (Morris 1986, Upadhyaya et al. 1991, Ovečková a Vizárová 1993). Také ABA zvyšuje svou hladinu v průběhu patogeneze. Reakce je podle autorů obdobná reakci vyvolané vodním stresem. Předpokládá se, že zvyšování hladiny etylenu a ABA může být využito v monitoringu, který by zdokonalil poznání mechanismů indukované rezistence. Goodman et al. (1986) se jako jeden z mála také věnoval gibberelinům. Jelikož jeho výsledky nejsem schopen porovnat s ostatními nebudu se zde GA₃ dále zabírat.

2.6.6 Účinek houbových onemocnění

Houbové patogeny, jako jsou např. *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* sp, *Saccharomyces* sp, *Fusarium oxysporum*, *Rizopus nigricans* a *Fusarium culmorum* a jiné, výrazně ovlivňují hladiny růstových regulátorů v průběhu patogeneze.

Pod vlivem výše uvedených patogenů se hladina IAA v hostitelských rostlinách zvyšuje. Zvýšení hladin IAA je zvláště výrazné v kompatibilních reakcích patogenu s hostitelem. V některých případech dochází k tzv. hyperauxinizaci. Mechanismus zvýšení hladiny IAA v nemocných pletivech není doposud objasněn. Předpokládá se, že zvýšení hladiny IAA může být způsobeno zvýšenou syntézou v hostitelských pletivech anebo produkcí patogenem. Biosyntéza IAA patogenními houbami je pravděpodobně ta samá jako ta v hostitelských rostlinách, tj. z tryptofanu přes indolyl-3-acetaldehyd. Zvýšení hladiny IAA může však být způsobeno inhibicí degradace IAA enzymatickými cestami. Doposud byla potvrzena, jak produkce IAA fytopatogenními houbami, tak i enzymatická inhibice degradace IAA (Goodman et al. 1986, Vizárová 1977, Krátká a Kúdela 1981).

Pod vlivem houbových patogenů se zvyšuje hladina cytokininů. Toto zvýšení je spojeno s kvalitativními změnami v zastoupení jednotlivých forem cytokininů. V současné době je důležité poznání, že zvýšení jejich hladiny při infekci biotrofickými houbami spojené s kvalitativními změnami je patrné u rostlin vytvářející s patogenem kompatibilní reakce (Goodman et al. 1986). Dále pak dochází v průběhu patogeneze k ovlivnění hladiny gibberelinů (GA₃) s následkem dlouhivého růstu. Je všeobecně známo, že houba *Gibberella fujikuroi* je producentem kys. gibberelové objevená Sawadou v roce 1931.

Také bylo zjištěno zvýšení ABA v infikovaných pletivech. Současně je známo, že celá řada fytopatogenních hub má schopnost produkovat ABA do kultivačního média (Okamoto et al. 1988). Těž dochází v infikovaných pletivech ke zvýšení produkce etylenu stejně tak při stresových situacích jako již zmiňované napadení patogenem či např. poranění, změna teploty a podobně. Ovšem fyziologický význam zvýšení etylenu ve stresových podmínkách není dosud vyjasněn (Procházka et al. 1997)

3 Metodika

3.1 Uspořádání pokusů

Cílem pokusů bylo otestovat vliv koncentrace TDZ v modifikovaném médiu Murashige- Skoog (MS) na odnožování u vybraných druhů a hybridů rodu *Paphiopedilum*. Tuto modifikaci označenou AKZ vytvořil pan Mgr. Vondruš a s úspěchem ji použil vegetativní množení některých dalších druhů orchidejí, jako je rod *Dendrobium* nebo rod *Phalaenopsis* z listových explantátů (Vondruš, ústní sdělení).

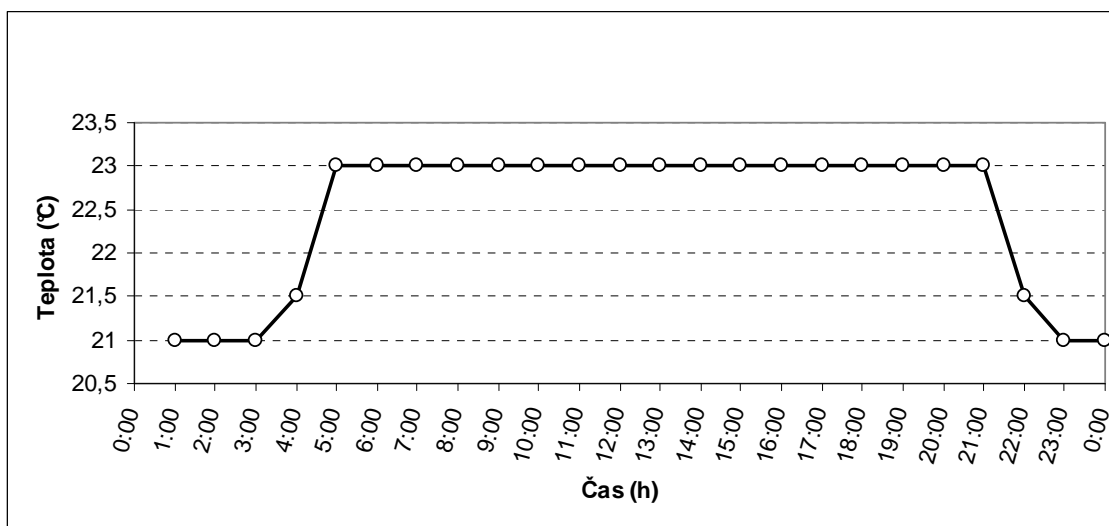
3.1.1 Pokus č. I

Pro první pokus bylo vybráno široké spektrum druhů i hybridů rodu *Paphiopedilum* i široké spektrum koncentrací TDZ. Pro každý explantát daného druhu byla připravena média s obsahem TDZ, 0, 2, 4, 6 a 10 mg/l. Na pokus byly použity tyto druhy a hybridy: *Paphiopedilum charlesworthii*, *Paph. delenatii* x sib, *Paph. Delenatii* 'vinicolor' x sib, *Paph. Pulsar* x Hsinying Redjo, *Paph. Alma Gevaert*'Golden Gate' x Hsinying Konyx, *Paph. Alma Gevaert*'Goto' x Hsinying Dragon 'Ching Hua' a *Paph. Hsinying Silvercharm* x Maudiae 'Silverado' AM/AOS. Rostlinný materiál pro pokus poskytla firma Explantex Vondruš. Hybridy byly zakoupeny u thaiwanské pěstitelské firmy Ching hua orchids. Pokus byl zahájen 18. 8. 2011 a ukončen 29. 2. 2012.

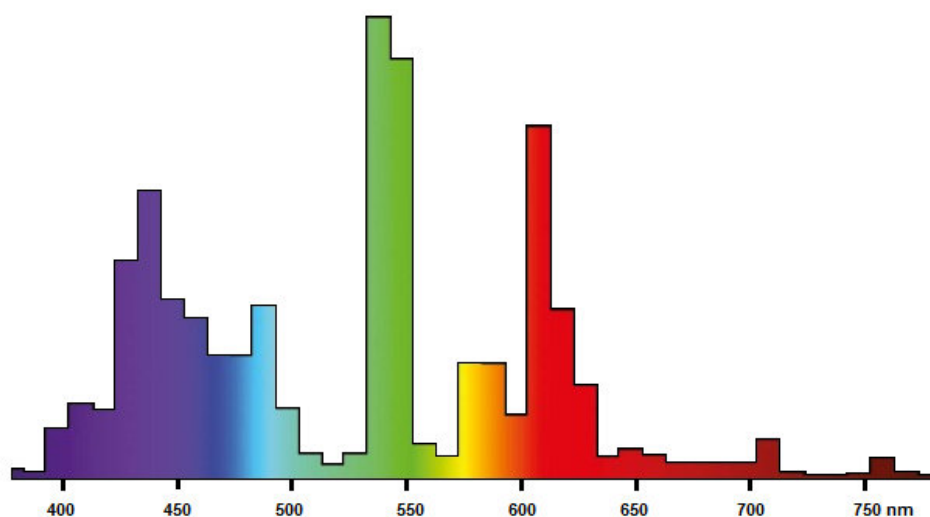
Pro každý ze sedmi taxonů jsem vytvořil pokusnou řadu médií s rozdílnou koncentrací TDZ (0, 2, 4, 6, 10 mg/l). V rámci daného taxonu jsem pro každou koncentraci TDZ použil jeden explantát. Celkem bylo použito 35 rostlinných explantátů ze sedmi druhů/hybridů umístěných v 35 lahvích s médii o pěti různých koncentracích TDZ.

Lahve s připravenými explantáty jsem umístil do kultivační místnosti s řízenými podmínkami. Délka světelné a temné periody byla nastavena na 16/8 a teplota na 23°/21C °C přes den a v noci (obr. 9). Pro osvit kultivačního stojanu byla použita čtyři zářivková tělesa (Osram lumilux 36watt/865, 6500 K, 3250 lm). Světlo dosahovalo hodnot 4000 lm v době světlé periody. Vlnová délka zářivkové trubice je znázorněna v obrázku 10. Vlhkostí jsem se v tomto případě zabývat nemusel, protože v uzavřených lahvích s explantáty je zachována 100% vzdušná vlhkost.

Průběh pokusu byl zaznamenáván každých 14 dní a stav kultury zapsán do tabulek. Pro lepší přehled byly tabulky upraveny na měsíční interval kontroly (Příloha 12 - 18). U explantátů byl zaznamenáván náznak začínající proliferace (označen 0*) a při následné kontrole potvrzeno nebo vyvráceno zdali se skutečně jednalo o proliferaci či nikoli. Po ukončení pokusu byly výsledky zpracovány a shrnuty v kapitole výsledky.



Obr. 9 Průběh denní teploty v kultivační místnosti při sv. režimu 18/6.



Obr. 10 Spektrum vlnových délek vyzařovaných zář. trubicí Osram lumilux 36W/865 (www.osram.cz)

3.1.2 Pokus č. II

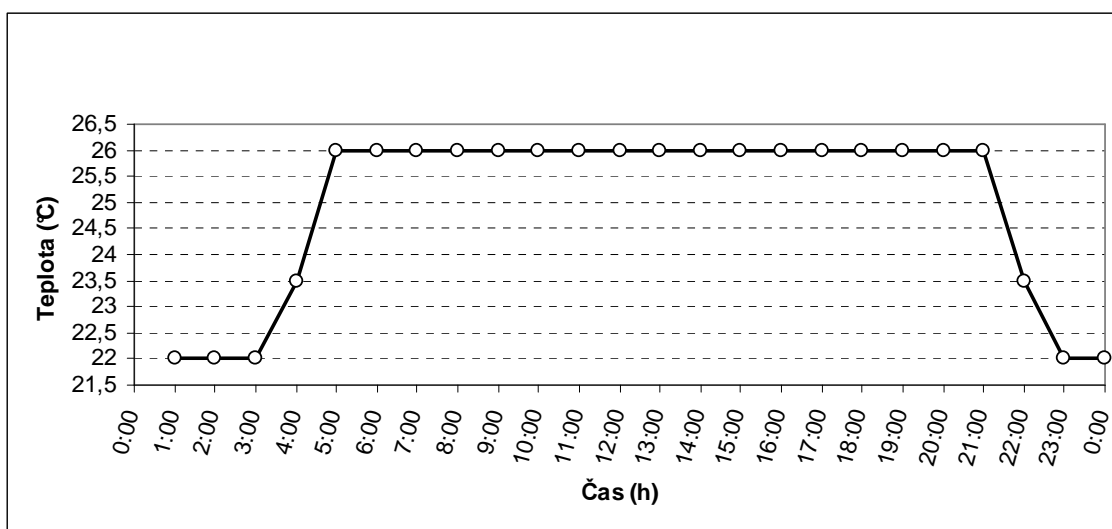
Cílem druhého pokusu bylo specifikovat koncentraci TDZ u taxonů z předchozího pokusu. Pro tento pokus byly s přihlédnutím na pozitivní reakci z předchozího pokusu vybrány tyto druhy a hybridy: *Paphiopedilum* Hsinying Silvercharm x *Maudiae* 'Silverado' AM/AOS, *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx, *Paphiopedilum charlesworthii*. Na tyto taxony byly aplikovány koncentrace TDZ 2, 4, 6 mg/l, na které tyto druhy reagovaly za nejkratší časový interval. Dalším cílem bylo ověřit, zda se podaří zvýšením teploty a intenzity ozáření zkrátit dobu od počátku pokusu do proliferační fáze jednotlivých explantátů.

Pro každý ze tří taxonů jsem vytvořil pokusnou řadu médií s rozdílnou koncentrací TDZ (2, 4, 6 mg/l). Vždy pět opakování od jedné koncentrace pro jeden taxon. Celkem bylo použito 45 rostlinných explantátů ze tří druhů/hybridů umístěných v 45 lahvích s médii o třech různých koncentracích TDZ (2, 4, 6 mg/l).

Po zkušenostech z předchozího pokusu bylo provedeno přidání dalších dvou zářivkových těles (Osram lumilux 36watt/865), tím došlo k zvýšení osvětlení na cca 5000 lm a zvýšení teploty o 3°C v době světlé periody a o jeden stupeň celsia v době temné fáze periody (obr. 11).

Kontrola byla prováděna stejným způsobem jako u pokusu I.

Pokus byl zahájen 16. 1. 2012 a ukončen 20. 3. 2012.



Obr. 11 Průběh denní teploty v kultivační místnosti při sv. režimu 18/6 po přidání zářivkových těles.

3.2 Technologický postup

Pro oba pokusy byly použity stejné technologické postupy včetně složení média a způsobu práce s rostlinným materiálem.

3.2.1 Složení média

Pro kultivaci bylo použito modifikované Murashige- Skoog (MS) médium (Murashige, Skoog 1962). Pro účel obou pokusů byl do základního MS média přidán 6-benzylaminopurin (BAP), protože podporuje regeneraci a buněčné dělení, a dále TDZ v odstupňovaných koncentracích dle uspořádání pokusu.

3.2.2 Příprava základních roztoků pro médium MS

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

Složení média AK je uvedeno v tabulce 1

Tab.1 Složení média AKZ

Látka	Množství
Makroelement:	A
NH ₄ NO ₃	66 g
KNO ₃	76 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14,8 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	17,6 g
KH ₂ PO ₄	6,8 g
Mikroelementy:	B
H ₃ BO ₃	620 mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230 mg
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	860 mg
	C
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25 mg
	D
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5 mg
Chelatizované železo:	E
Na – EDTA	7,45 g
FeSO ₄ · H ₂ O	5,57 g
Látka	Množství na 1l
Inositol	100 mg
Thiamin	100 mg
Pyridoxin	0,5 mg
Kys. nikotinová	0,5 mg
Adeninsulfát	10 mg
TDZ	0, 2, 4, 6, 10 mg
NAA	0,25 mg
BAP	0,75 mg
Glukoza	10 g
Plantagar	6 g

3.2.3 Příprava zásobních roztoků vitamínů

Z látek uvedených v tabulce (pyridoxin, kyselina nikotinová, inositol a thiamin) jsem připravil zásobní roztoky. Navážil jsem 50mg pyridoxinu a spolu s 50mg kyseliny nikotinové jsem navážku kvantitativně přesypal do 600 ml odměrné baňky. Navážku jsem rozmíchal s 300ml destilované vody a poté dolil destilovanou vodou do 500ml. Takto vzniklý roztok jsem přelil do 0,5l PET lahve. Lahev jsem označil číslem jedna a umístil do chladničky. Stejným způsobem jsem pokračoval u dalších dvou látek inositolu a thiaminu. Rozdílne však byly navážky, oproti prvnímu zásobnímu roztoku jsem navážil 5g inositolu a 5g thiaminu. Připravil jsem stejným způsobem zásobní roztok, přelil jej do 0,5 l PET lahve a označil číslem dva.

3.2.4 Příprava samotného média AKZ

Do připravené 2l plastové odměrky jsem odlil cca 300ml destilované vody, do které jsem následně přidával odměřené množství jednotlivých částí média. Ze zásobního roztoku A jsem pomocí 100ml odměrného válce odměřil 75ml a vylil do plastové odměrky. Postupně jsem takto odměřil i další zásobní roztoky označené B, C, D, E (Murashige-Skoog 1962). Ze zásobních roztoků B, C, D jsem pomocí 50ml odměrného válce odměřoval 20ml, z roztoku E jsem odpipetoval 10ml. Dále jsem přidal navážených 40g sacharózy a 20g glukózy. Dále jsem přidal 10ml vitamínů označených číslem jedna a 20ml ze zásobního roztoku vitamínů z lahve označené číslem dva. Aby medium fungovalo tak, jak má, musel jsem přidat růstové hormony. Na digitální váze s přesností 0,001g jsem navážil 1,5mg BAP (6-benzylaminopurin), 0,5mg NAA (kys. α -naftyloctová) a 20mg adeninsulfátu. Tuto směs jsem doplnil do 2l destilovanou vodou. Dále jsem přidal na vodní lázni rozvařený agar. Vše jsem důkladně promíchal a následně rozlil po 400ml do pěti kádinek o objemu 500ml. První jsem nechal bez přídatku TDZ, jako kontrolní vzorek. Do druhé kádinky jsem přidal 0,8mg TDZ, do třetí 1,6mg TDZ, do čtvrté 2,4mg TDZ a do poslední, páté, 4mg TDZ. pH papírkem (Sigma, P4536 – 100EA, citlivost 0,5 pH) jsem změřil pH všech vytvořených médií. Naměřené pH splňovalo požadavky pro dané médium, tj. pH 5,6. Následovalo rozlité do lahví od dětské výživy, zavíčkování a přemístění lahví do autoklavu, kde došlo při teplotě 121°C a tlaku 101,2 kPa po dobu 20 minut ke sterilizaci a dorozpuštění některých látek v médiu.

3.2.5 Příprava a umístění explantátu do média

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

Donorové rostliny byly obvykle staré cca 2 roky a měly vždy minimálně dva listy. Rostliny jsem zbavil kořenů a odumřelých a nekrotizujících částí pletiv. Pinzetu a skalpel jsem opět steriloval. Jednotlivé explantáty jsem mělce zanořil do média, láhev uzavřel a popsal. Po každé zpracované rostlině jsem nástroje dezinfikoval, aby nedošlo k přenosu infekce do další lahve.

4 Výsledky

4.1 Pokus č. I

4.1.1 Průběh pokusu

Průběh pokusu trvajícího 200 dní je zdokumentován v tabulkách v přílohách 12 - 18. Výsledná tabulka (tab. 2) zaznamenává finální stav všech explantátů vzorového pokusu včetně počtu dní od zahájení pokusu do započetí proliferace daného explantátu.

Při první kontrole byla zjištěna kontaminace vzorku PA 6747 (obr.12) v celé šíři pokusu (tj. na koncentracích 0, 2, 4, 6 i 10 mg TDZ na jeden litr média). Jako první proliferoval vzorek PA 6801, na koncentraci 4 mg TDZ na litr, a to za 85 dní od umístění explantátu na živné médium. Postupně došlo k proliferaci i u dalších vzorků. Poté se proliferace, u zatím neproliferujících vzorků, na více jak čtyři týdny zastavila. K další aktivitě došlo až po 150 dnech od zahájení pokusu. Po této pauze proliferovalo dalších osm vzorků. Po 200 dnech byl pokus ukončen a vyhodnocen.

Tab.2 Stav explantátových kultur studovaných druhů rodu *Paphiopedilum* ke dni ukončení pokusu 20. 3. 2012

Legenda: 0 - žádná reakce, Kon – kontaminace, N – nekróza. Číselné hodnoty udávají počet dnů od zahájení pokusu do viditelné proliferace laterálních pupenů.

HPA 2951 – *Paph. charlesworthii*, **PA 6747** – *Paph. delenatii* var. *vinicolor*, **PA 6759** – *Paph. Pulsar* x *Hsinying Redjo*, **PA 6801** – *Paph. Hsinying Silvercharm* x *Maudiae 'Silverado'* AM/AOS, **PA 6905** – *Paph. Alma Gevaert 'Golden Gate'* x *Hsinying Konyx*, **PA 6922** – *Paph. delenatii*, **PA 7071** – *Paph. Alma Gevaert 'Goto'* x *Hsinying Dragon 'Ching Hua'*

Druh/hybrid	Obsah TDZ (mg)				
	0	2	4	6	10
HPA 2951	99	0	150	99	N
PA 6747	Kon	Kon	Kon	Kon	Kon
PA 6759	0	0	0	195	0
PA 6801	0	150	85	0	0
PA 6905	0	0	0	99	99
PA 6922	0	0	175	175	0
PA 7071	0	0	195	195	195

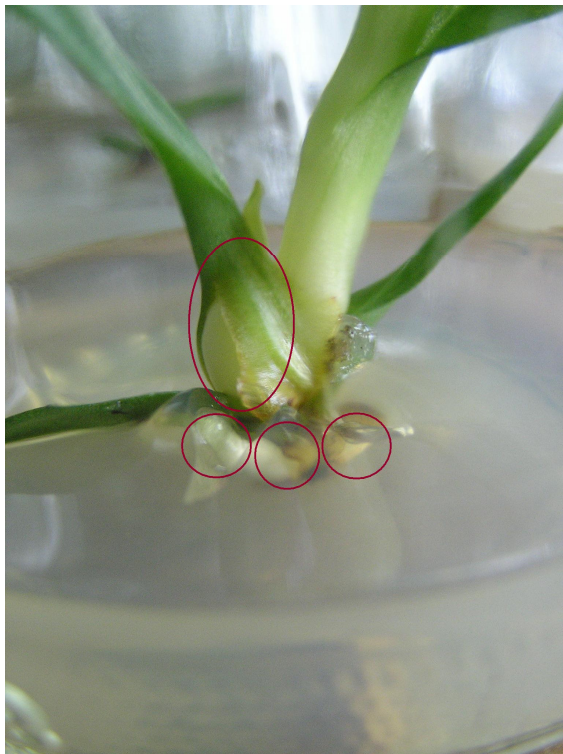


Obr. 12 a a b kontaminované vzorky PA 6747

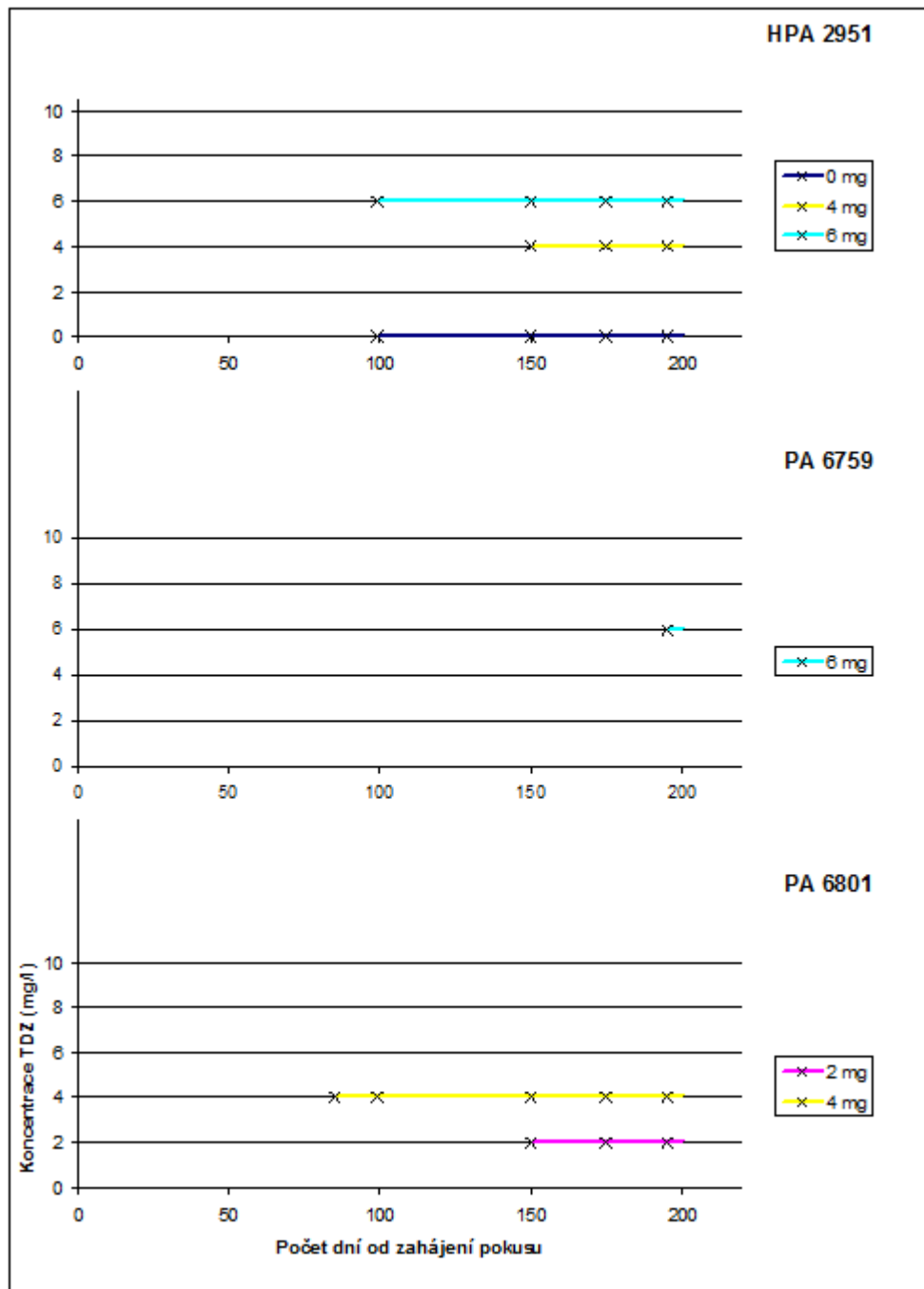
4.1.2 Zhodnocení pokusu

Cílem tohoto pokusu bylo otestovat vhodnost koncentrace TDZ v modifikovaném médiu na vliv odnožování u námi použitých druhů a hybridů u rodu *Paphiopedilum*. I přes kontaminaci jedné řady vzorků (vzorek PA 6747), byl tento pokus úspěšným. U 13 vzorků z celkového počtu 35 došlo, k proliferaci z laterálních pupenů. Z doposud nezjištěných příčin došlo u neproliferujících rostlin v době mezi 99 až 150 dnem od zahájení pokusu k zastavení proliferace i růstu explantátu samotného. Poté došlo opět k propuknutí proliferace u dalších explantátů. Nejrychleji proliferoval vzorek PA 6801, na koncentraci TDZ 4mg/l, po 85 dnech (obr. 14). Při následné kontrole byla zjištěna další proliferace hned u několika vzorků: PA 6905 na koncentracích 6 a 10mg TDZ/l (obr. 15) a HPA 2951 na koncentracích 0 a 6mg TDZ/l (obr. 14). Na obrázku 14 je znázorněna zbylá část explantátů a jejich proliferace v průběhu pokusu.

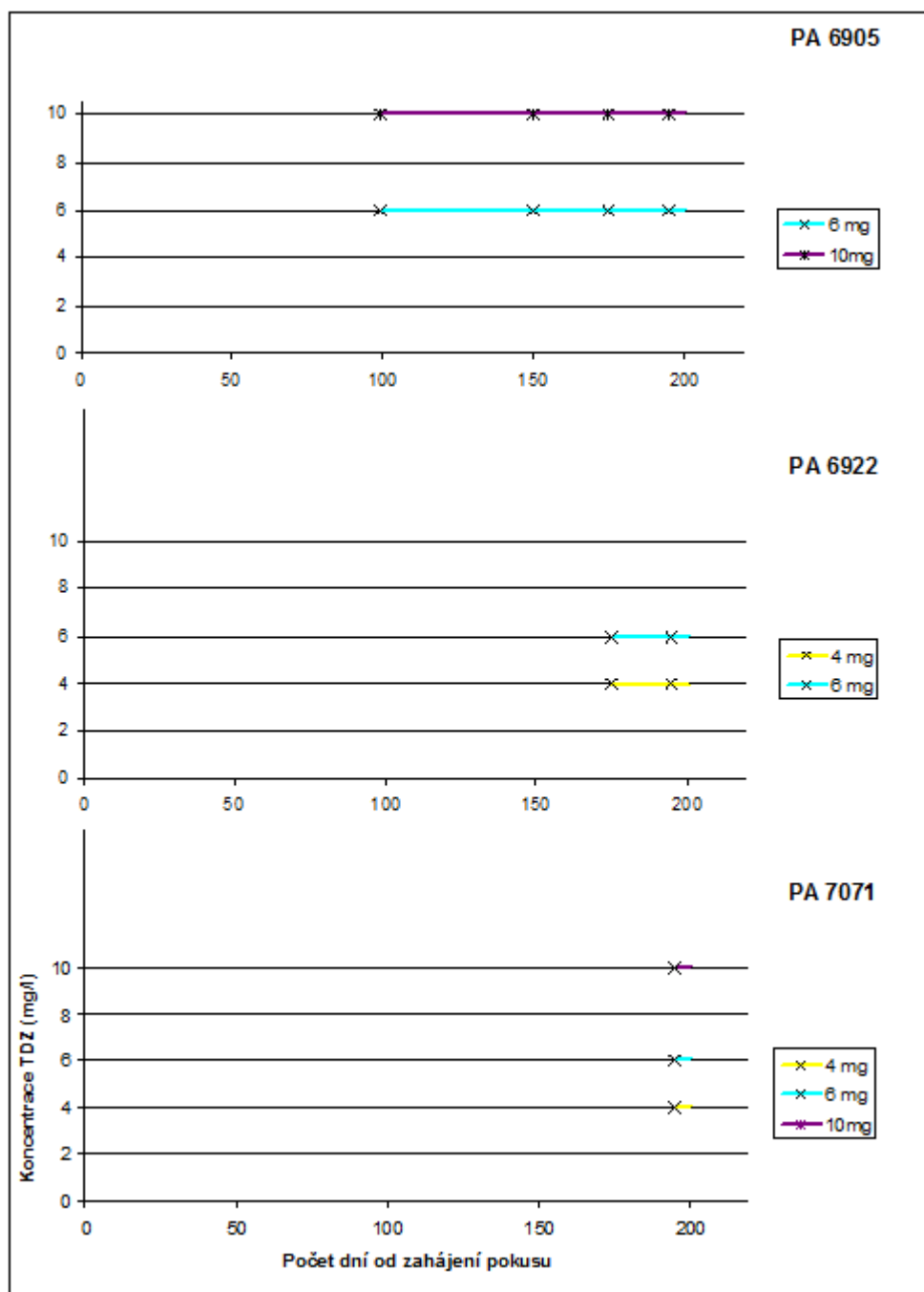
Na základě informací získaných z tohoto pokusu jsem vybral několik druhů/hybridů, které reagovaly nejochotněji a za nejkratší dobu. Pro následující pokus byly vybrány tyto druhy/hybridy: *Paphiopedilum* Hsinying Silvercharm x *Maudiae* 'Silverado' AM/AOS, *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx, *Paphiopedilum charlesworthii*.



Obr. 13 Proliferující jedinec (vzorek PA 6905) na koncentraci 10 mg TDZ/l po 99 dnech.



Obr. 14 Časový harmonogram průběhu proliferace u vzorků HPA 2951, PA 6759, PA 6801.



Obr. 15 Časový harmonogram průběhu proliferace u vzorků PA 6905, PA 6922, PA 7071.

4.2 Pokus č. II

4.2.1 Průběh pokusu

Průběh pokusu je zdokumentován v tabulkách v příloze (příloha 19 – 21) a graficky znázorněn v obrázku 16. Při první kontrole nebyly zjištěny žádné průkazné známky proliferace.

Druhá kontrola proběhla po 44 dnech, na explantátech HPA 2951 byla patrná proliferace na koncentracích 4 a 6mg TDZ/l kdy proliferovalo u každé koncentrace po jedné rostlině. U vzorku PA 6801 na koncentraci 2mg TDZ/l reagoval jeden explantát, na koncentracích 4 a 6mg TDZ/l reagovali vždy dva explantáty. U posledního vzorku PA 6905 při druhé kontrole nejlépe reagoval explantát na koncentraci 4mg TDZ/l v počtu dvou proliferujících jedinců. Jedinci umístěné do média s koncentrací 2mg TDZ/l reagoval při druhé kontrole jediný vzorek. U koncentrace 6mg TDZ/l nebyla zaznamenána žádná aktivita (obr. 16).

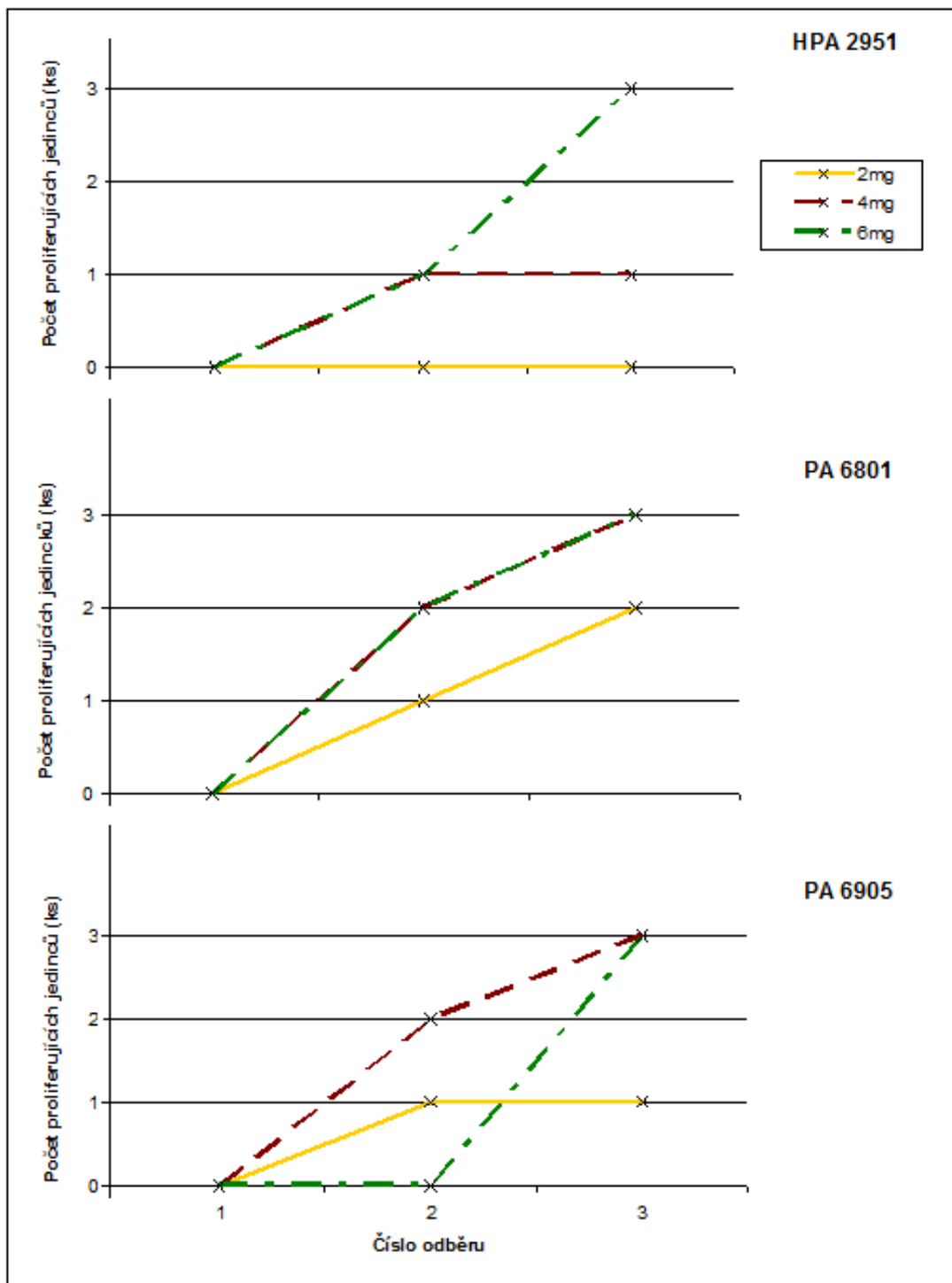
Při závěrečné kontrole nebyla zaznamenána žádná reakce pouze u vzorku HPA 2951 na koncentraci 2mg TDZ/l. Explantáty pěstované na koncentraci 4mg TDZ/l dále nereagovaly a proliferovala tedy pouze jedna rostlina na dané koncentraci. U koncentrace 6mg TDZ/l došlo v době mezi kontrolami k nárůstu proliferujících jedinců na tři. U vzorku PA 6801 došlo mezi posledními kontrolami o navýšení proliferujících rostlin o jednu na všech koncentracích TDZ (2, 4 a 6mg TDZ/l). U vzorku PA 6905 na koncentraci 2mg TDZ/l nebyla zaznamenána další proliferace. U explantatů na koncentraci 4mg TDZ/l došlo od poslední kontroly o navýšení počtu proliferujících jedinců o jeden. U rostlin kultivovaných na koncentraci 6mg TDZ/l došlo po 50. dni k proliferaci tří jedinců (obr. 16).

4.2.2 Zhodnocení pokusu

Cílem druhého pokusu bylo specifikovat koncentraci TDZ u taxonů vybraných na podkladě výsledků předchozího pokusu a ověřit, zda se podaří zvýšením teploty a intenzity ozáření zkrátit dobu od počátku pokusu do proliferace jednotlivých explantátů.

Z průběhu 64 dnů trvajících pokusu je zřejmé, že se podařilo specifikovat koncentraci TDZ i podmínky kultivace pro vybrané taxony rodu *Paphiopedilum*. Z výsledných grafů lze vyčíst, že optimální koncentrací pro použité taxony jsou

koncentrace 4 a 6mg TDZ/l (obr. 16). Taktéž díky přidání zářivkových těles (ať už díky teplotě či vyšší intenzitě světla) došlo k výraznému zkrácení intervalu mezi zahájením pokusu a prvními proliferaujícími jedinci. Celkem bylo pro tento pokus použito 45 rostlinných explantátů z toho 19 jedinců proliferovalo ve velmi krátké době.



Obr. 16 Průběhy proliferace zaznamenaných při kontrolách

5 Diskuze

Nejen u rodu *Paphiopedilum*, ale i u ostatních orchidejí v kulturách *in vitro* dochází k růstovým anomáliím projevujících se různou dobou reakce na médium (Vondruš, ústní sdělení). Ve své bakalářské práci jsem založil kulturu podobnou té, kterou jsem využil v diplomové práci. K proliferaci a vzniku další rostliny došlo až po roce a půl.

Obecně platí, že jedinci rodu *Paphiopedilum* pomalu přirůstají, jak v *in vitro* kultuře, tak rostliny pěstované *ex vitro* ve srovnání s ostatními rychleji rostoucími druhy čeledi *Orchidaceae*.

Dlouhodobým cílem velkokapacitních pěstíren, ale i drobných pěstitelů orchidejí je vyvinout metodu, která by byla vhodná pro rychlé a účinné namnožení orchidejí tzv. „ve velkém“. V současné době je vidět výrazný nepoměr mezi produkcí u rodu *Phalaenopsis*, kde jsou zvládnuty veškeré současné metody množení orchidejí, a rodem *Paphiopedilum*. Nean (2004) uvádí ve své studii, že v roce 2002 bylo exportováno z Taiwanu 717,97 mil. kusů orchidejí rodu *Phalaenopsis* a „pouze“ 1,08 mil. kusů orchidejí rodu *Paphiopedilum*. Z předchozích údajů je zřejmé, který z těchto druhů je pěstitelsky náročnějším. Údaje nespecifikují, zda se jedná o materiál získaný výsevy nebo explantátovými kulturami. Nicméně výrazný rozdíl produkce hovoří jasně.

První etapou o nalezení vhodné metody množení druhů rodu *Paphiopedilum* byla moje bakalářská práce (Roule 2009), v níž byla testována metoda iniciace protokormů u vybraných druhů rodu *Paphiopedilum* pomocí aplikace TDZ v kulturách listových explantátů. Výsledky ukázaly, že metodu nelze bez dalších úprav aplikovat na rod *Paphiopedilum*.

V diplomové práci jsem na předchozí práci navázal tím, že jsem využil potenciálu TDZ a otestoval jej na rostlinných explantátech. Upustil jsem od metody listových explantátů a použil jsem celé semenáče zbavené kořenové části. Na základě poznatků získaných studiem fyziologie rostlin a účinků TDZ se mi povedlo u vybraných druhů a hybridů rodu *Paphiopedilum* aktivovat proliferaci z laterálních pupenů. Výsledky poukazují na splnění dílčích cílů u jednotlivých pokusů. Jedná se sice o malé množství proliferujících jedinců, ale počty nově vzniklých růžic převyšují počet samotných explantátů použitých při pokusech.

Při druhém pokusu byly přidány zdroje osvětlení. V korelaci s vyšší hladinou světla došlo ke zvýšení teploty z původních 23°C, u prvního pokusu ve světlé fázi, na 26°C v pokuse druhém. Tato kombinace pozitivně ovlivnila proliferaci explantátu a došlo ke zkrácení doby od zahájení pokusu do první proliferace téměř o polovinu tj. z původních 85 dní na 44 dní. Na podkladě získaných dat nemůžeme odlišit vliv samotného světla a doprovodný vliv teploty. Yung – I Lee et. al. (2009) studovali vliv působení šesti rozdílných led svítidel na přírůstky semenáčů rodu *Paphiopedilum* v podmínkách *in vitro*. Nejlepších výsledků nárůstu listové plochy dosáhli použitím studeného světla (5000K).

Pro pokus nebylo využito statistického vyhodnocení z důvodu malého počtu opakování vzhledem k omezenému množství rostlinného materiálu, jehož pořizovací ceny se pohybují v řádech desítek až stovek dolarů za lahev obsahující v průměru 20 - 25 jedinců. Materiál zakoupila firma Explantex v čele s panem Mgr. Vondrušem a též jej poskytla pro účely pokusu.

Na základě získaných informací z pokusů k diplomové práci je zřejmé, že tuto metodu lze aplikovat na rod *Paphiopedilum* a jeho hybridy. V dalších pokusech by bylo zajímavé zabývat se vlivem působení tepla a světla na vývoj jednotlivých částí explantátů. Nalezením optima těchto dvou faktorů by se mohlo podařit zkrátit dobu od zahájení pokusu do prvních náznaků proliferace a tím metodu zefektivnit.

6 Závěr

V práci byla testována metoda proliferace rostlin vybraných druhů a hybridů rodu *Paphiopedilum* z laterálních pupenů pomocí aplikace TDZ do kultivačních médií. Při druhém pokusu byla pak pozorována reakce proliferujících jedinců na zvýšenou intenzitu osvětlení. Na základě zjištěných údajů z úspěšných pokusů lze říci, že tato metoda je vhodná pro množení orchidejí rodu *Paphiopedilum*. Po drobných úpravách je tato metoda pravděpodobně použitelná pro množení dalších sympodiálně rostoucích druhů a hybridů čeledi *Orchidaceae*.

7 Seznam použité literatury

- Bailiss K. W. (1974): The relationship of gibberellin content to cucumber mosaic virus infection of cucumber, *Physiological Plant Pathology*, Vol. 4, p. 73 - 80.
- Bernard N. (1899): Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *Comptes Rendus Hebdomadaires de l'Academie des Sciences, Paris*, Vol. 128, p. 1253 – 1255.
- Bo Long, Alex X. Niemiera, Zhi-ying Cheng, Chun-lin Long (2010): In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Vol. 101, p. 151 - 162.
- Burgeff H. (1911): Die Anzucht tropischer Orchideen aus Samen neue Methoden auf der Grundlage der symbiotischen Verhältnisse von Pflanze und Wurzelpilz
- Cassels A. C. (1991): Problems in tissue culture. In: *Micropropagation: Technology and Application*, p. 31 – 44 (eds P. C. Debergh and R. H. Zimmerman) Dordrecht: Kluwer
- Cox A. V., Pridgeon A. M., Alebert V. A., Chase M. W. (1997): Phylogeny of the slipper Orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences, *Plant systematics Evolution*, Vol. 208, p. 197 – 223.
- Cribb P. (1998): The Genus *Paphiopedilum*, Second Edition. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu and Royal Botanic Gardens, Kew.
- Dušek J., Křístek J. (1986): *Orchideje*, Academia, Praha
- Flos F. (1957): *Lovci orchidejí*, statní nakladatelství dětské knihy, Praha
- Goodman R. N., Király Z., Wood K. R. (1986): *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*, University of Missouri Press, Columbia, 452
- Gut J. (2010): Názvosloví orchidejí, Česká orchidejářská společnost, ročník 21., str. 13-35 (leden 2010)
- Hoffmanová E. (1993): Don Benito, knihkupectví „ U podléšky“, Božkov
- Huaifang L. F., Chiu W. P. (1985): *Science Sin.*, Vol. 38, p. 626 – 632.
- Chyuam-Yih Ng, Norihan Mohd. Saleh (2011): In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, Vol. 105, p. 193 – 202.
- Krátká J., Kúdela V. (1981): Biochemical Changes in Alfalfa Plants Inoculated with *Verticillium albo-atrum*, *Journal of Phytopathology*, Vol. 100, Issue 4, p. 289–299, April 1981

- Miller C. O. (1956): Similarity of some kinetin and red light effects, *Plant Physiology*, Vol. 31, p. 318 – 319.
- Morris R. O. (1986): Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens, *Annu. Rev. Plant Physiological*, Vol. 37, p. 509 – 538.
- Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nean L. (2004): APOC8 (Asia Pacific Orchid Conference): Proceedings of 8th Asia Pacific Orchid Conference.
- Nester E. W., Kosuge T. (1981): *Annu. Rev. Microbiol.*, Vol. 35, p. 338 – 365.
- Odutayo OI, Oso RT, Akinyemi BO, Amusa NA (2004): Microbial contaminants of cultured *Hibiscus cannabinus* and *Telfaria occidentalis* cultured tissue African Journal Biotechnol. 3: 301-307.
- Okamoto M., Hirai N., Kashimizu K. (1988): Biosynthesis of abscisic acid in *Cercospora pini-densiflorae*, *Phytochemistry*, Vol. 27, p. 2099 – 2103.
- Ovečková O. Vizárová G. (1993): Cytokinins production by *Agrobacterium tumefaciens* with binary vectors, *Biológia*, Bratislava, Vol. 48, p. 337 – 342.
- Pritchard D. W., Ross A. G. (1975): The relationship of ethylene to formation of tobacco mosaic virus lesions in hypersensitive responding tobacco leaves with and without induced resistance, *Virology*, Vol. 64, p. 295 – 307.
- Procházka S., Šebánek J. a kol. (1997): *Regulátory rostlinného růstu*, Academia, Praha
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998): *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha.
- Rajagopal R. (1977): Effect of tobacco mosaic virus infection on the endogenous levels of indolacetic and abscisic acids of tobacco leaves in various stages of development. *PflanzenPhysiol.*, Vol. 83, p. 403 – 409.
- Roule Z. (2009): Vegetativní množení střešníků (*Paphiopedilum* spp.) in vitro.
- Steward F. C. (1958): Prof. Lewis Knudson (Obituary) *Nature*. Vol. 182, p. 1640 (13. December 1958)
- Tavantzis S. M., Smith S. H., Witham F. H. (1979): The influence of kinetin on tobacco ringspot virus infectivity and the effect of virus infection on the cytokinin activity in intact leaves of *Nicotiana glutinosa* L., *Physiological Plant Pathology*, Vol. 14, p. 227 – 233.
- Upadhyaya N. M., Letham D. S., Parker C. W., Hocard C. H., Dart P. J. (1991): Do rhizobia produce cytokinins?, *Biochemistry international*, Vol. 24, p. 123 – 130.

- Vizárová G. (1977): Rastové látky v jačmeni po ochorení na múčnatku, Veda Bratislava, Ser. biol. práce XXII (7): 92
- Williams B. (1984): Orchids for everyone, Treasure Press, London, p. 81
- Yung-Haw Lin at al. (2000): Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Journal of Plant Biotechnology, Vol. 62, p. 21 – 25.
- Yung – I Lee, Wei Fang, Chi - Chung Chen (2009): Effect of six different LED light qualities on the seedling growth of *Paphiopedilum*, Pouster, Taiwan
- Zákrejs J. (2000): Pěstujeme orchideje, Nakladatelství Brázda, Praha, první vydání.

Internetové zdroje

www.cites.org

www.slipperorchids.info

www.apps.rhs.org.uk

www.botany.cz

www.osram.cz

Seznam příloh:

Příloha 1. Obecné schéma šlechtitelkých postupů pro hybrid *Paphiopedilum Alma Gevaert 'Golden Gate'* x *Hsinying Konyx*

Příloha 2. Část **A** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Alma Gevaert 'Golden Gate'* x *Hsinying Konyx*

Příloha 3. Část **B** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Alma Gevaert 'Golden Gate'* x *Hsinying Konyx*

Příloha 4. Část **C** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Alma Gevaert 'Golden Gate'* x *Hsinying Konyx*

Příloha 5. Část **D** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Alma Gevaert 'Golden Gate'* x *Hsinying Konyx*

Příloha 6. Část **E** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Alma Gevaert 'Golden Gate'* x *Hsinying Konyx*

Příloha 7. Obecné schéma šlechtitelkých postupů pro hybrid *Paphiopedilum Pulsar* x *Hsinying Redjo*

Příloha 8. Část **F** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Pulsar* x *Hsinying Redjo*

Příloha 9. Část **G** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Pulsar* x *Hsinying Redjo*

Příloha 10. Část **H** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Pulsar* x *Hsinying Redjo*

Příloha 11. Část **I** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Pulsar* x *Hsinying Redjo*

Příloha 12. Kontrola pokusu č. I 1. 9. 2011

Příloha 13. Kontrola pokusu č. I 30. 9. 2011

Příloha 14. Kontrola pokusu č. I 31. 10. 2011

Příloha 15. Kontrola pokusu č. I 30. 11. 2011

Příloha 16. Kontrola pokusu č. I 3. 1. 2012

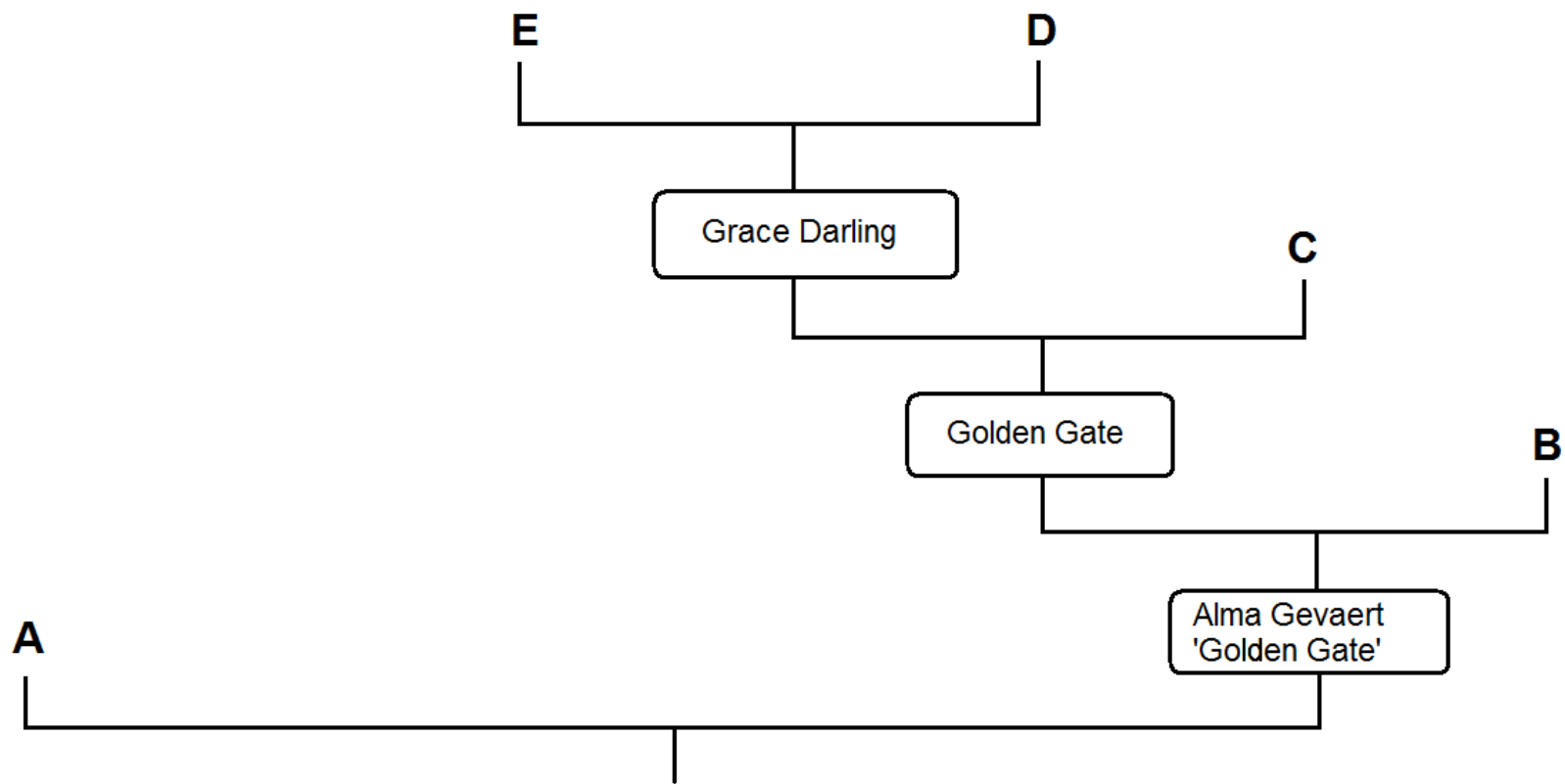
Příloha 17. Kontrola pokusu č. I 31. 1. 2012

Příloha 18. Kontrola pokusu č. I 5. 3. 2012

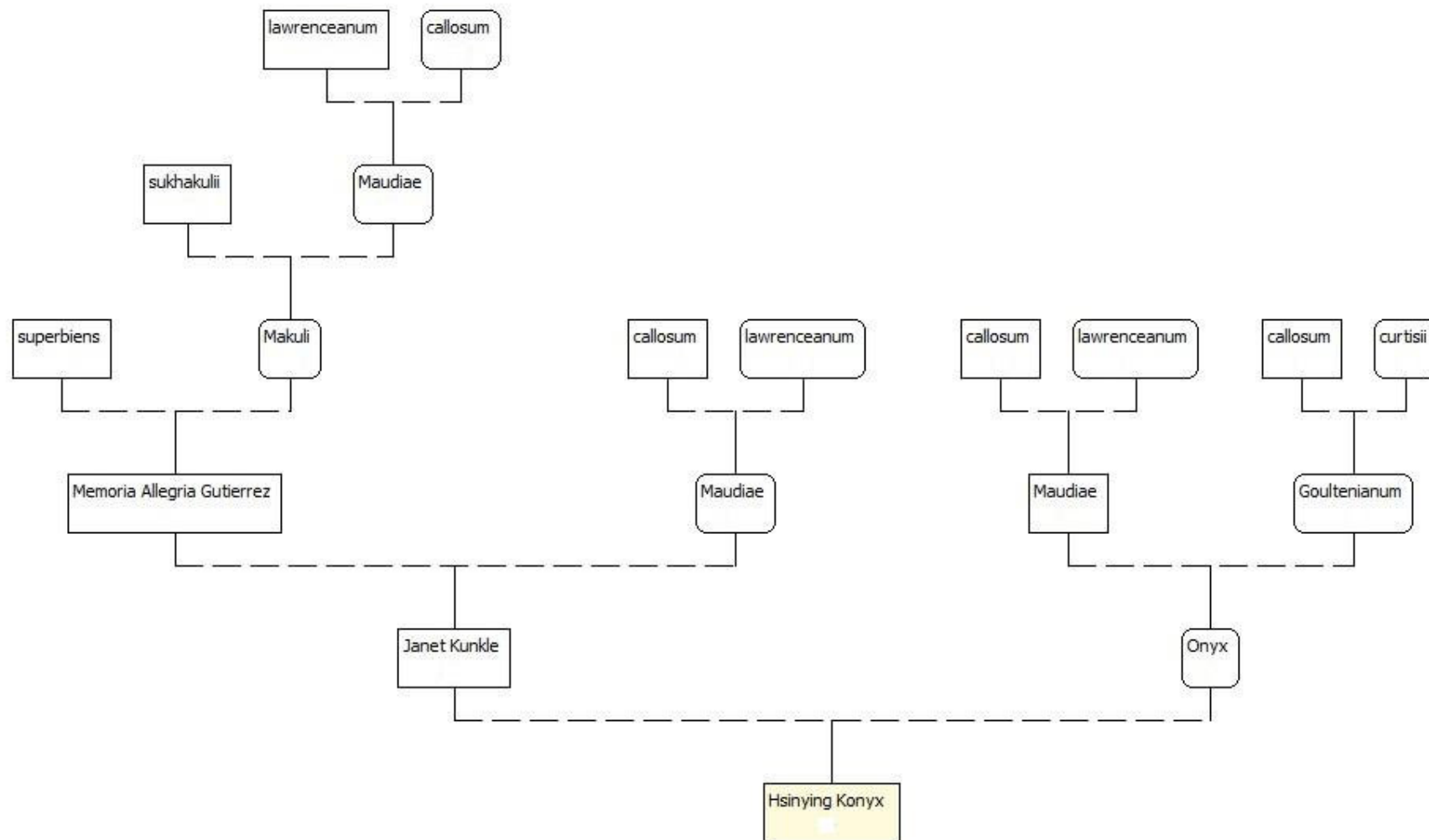
Příloha 19. Kontrola pokusu č. II 6. 2. 2012

Příloha 20. Kontrola pokusu č. II 29. 2. 2012

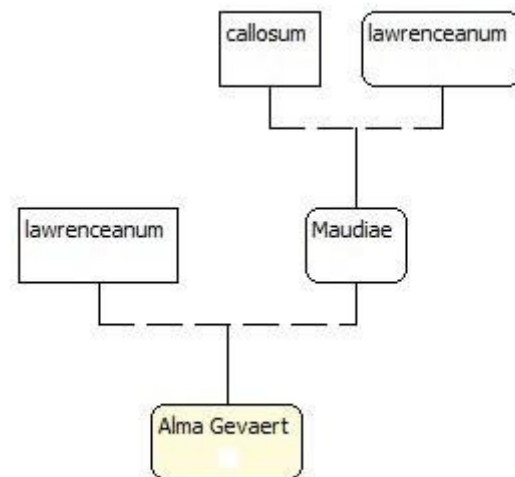
Příloha 21. Kontrola pokusu č. II 20. 3. 2012



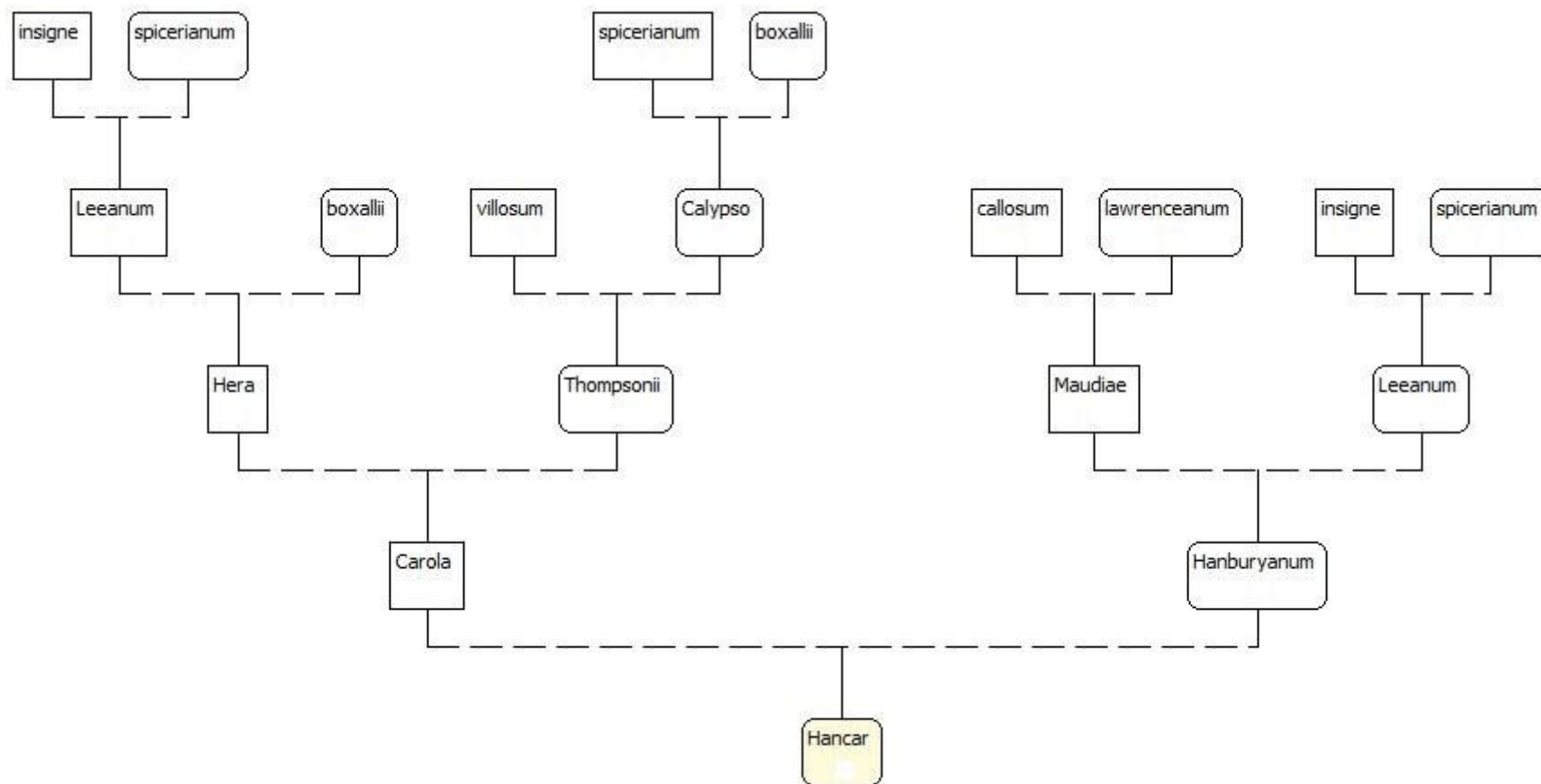
Příloha 1. Obecné schéma šlechtitelských postupů pro hybrid *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx



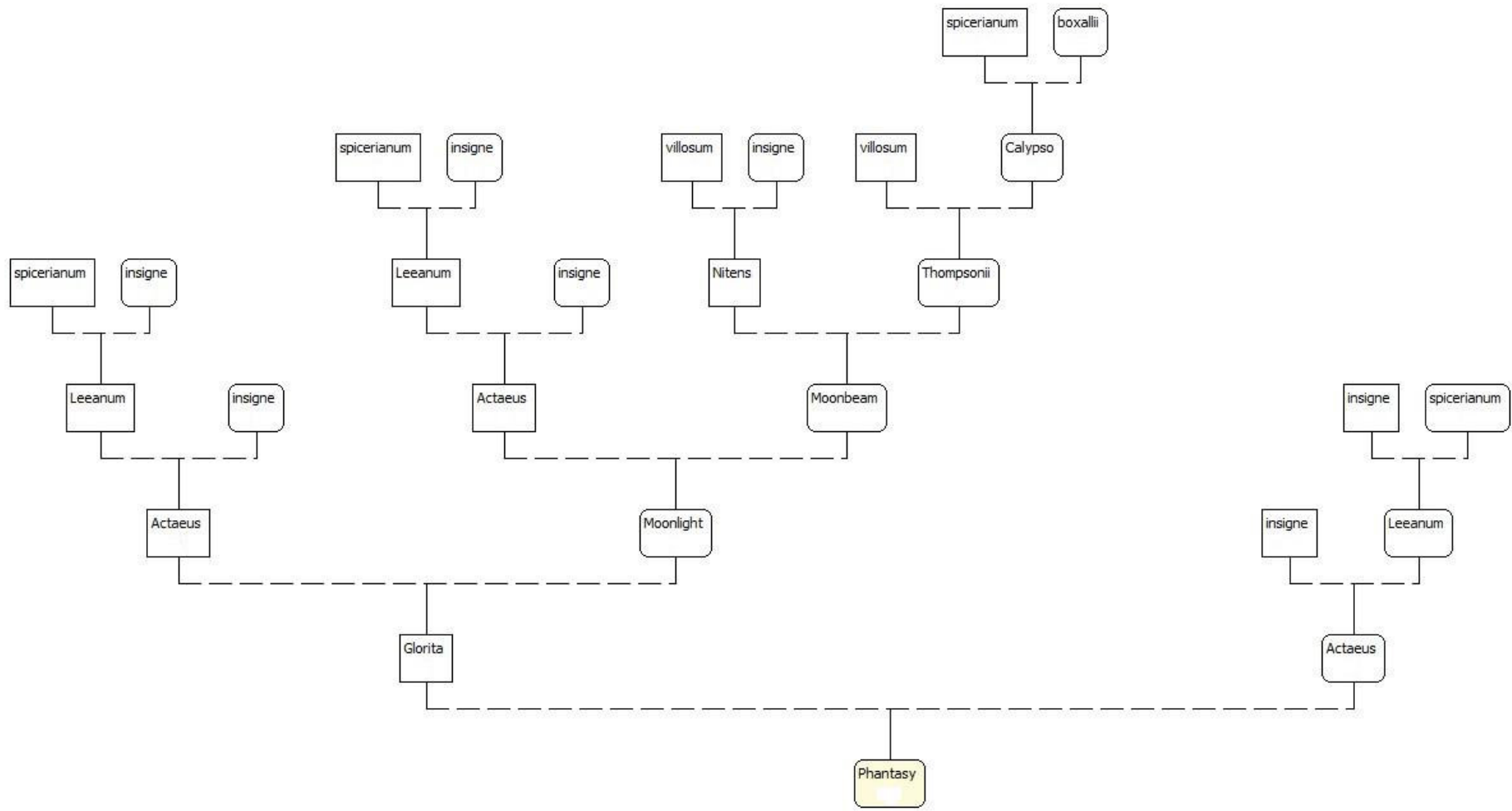
Příloha 2. Část A ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx



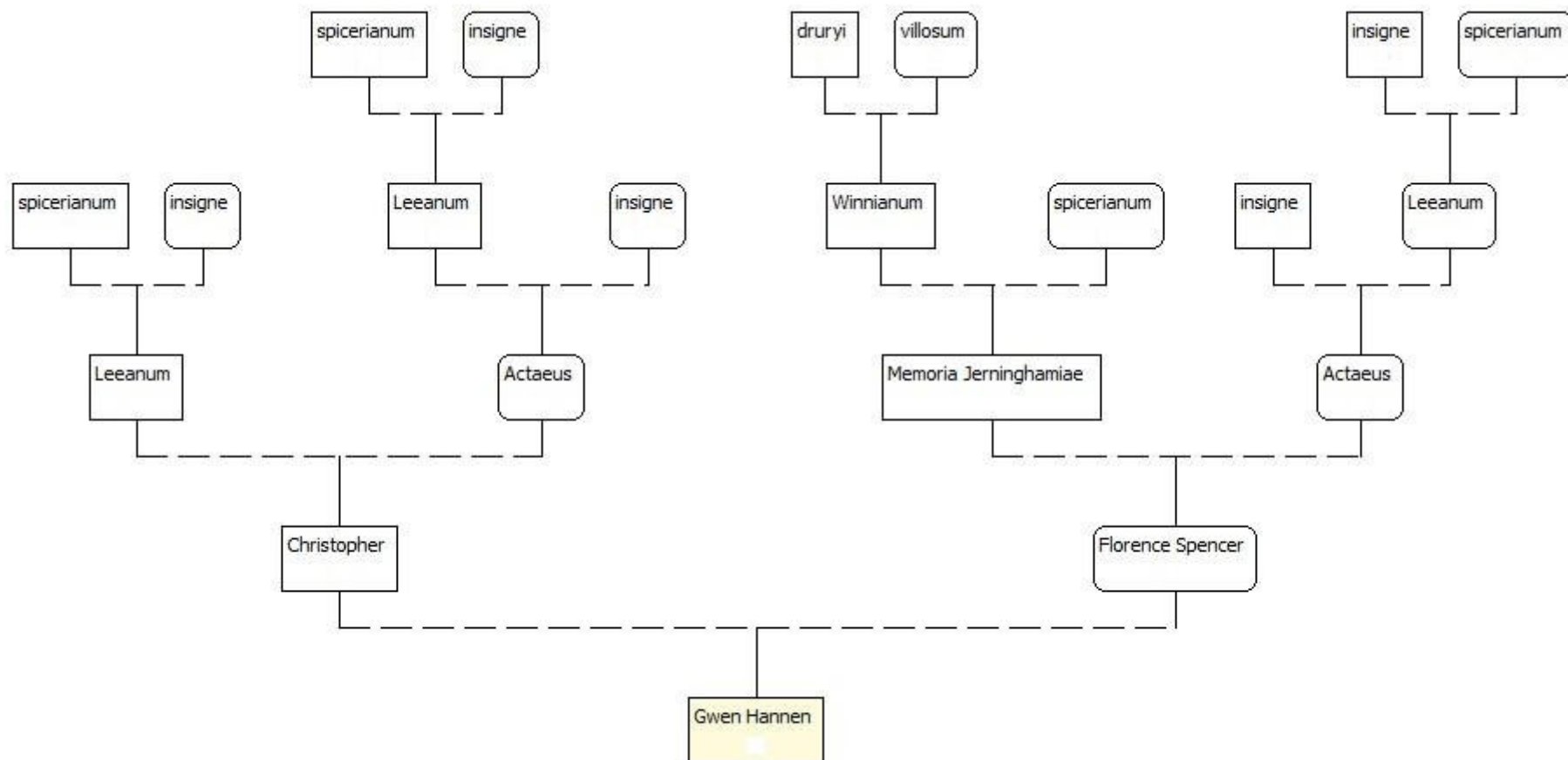
Příloha 3. Část B ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx



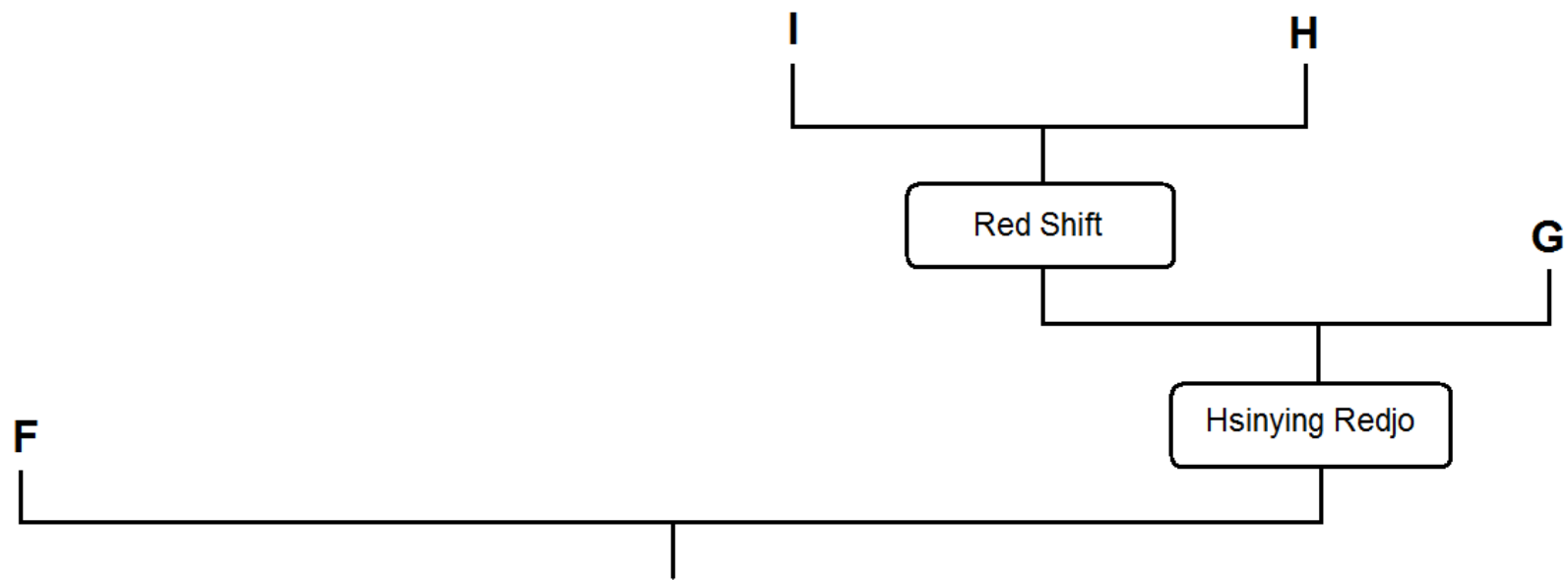
Příloha 4. Část C ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx



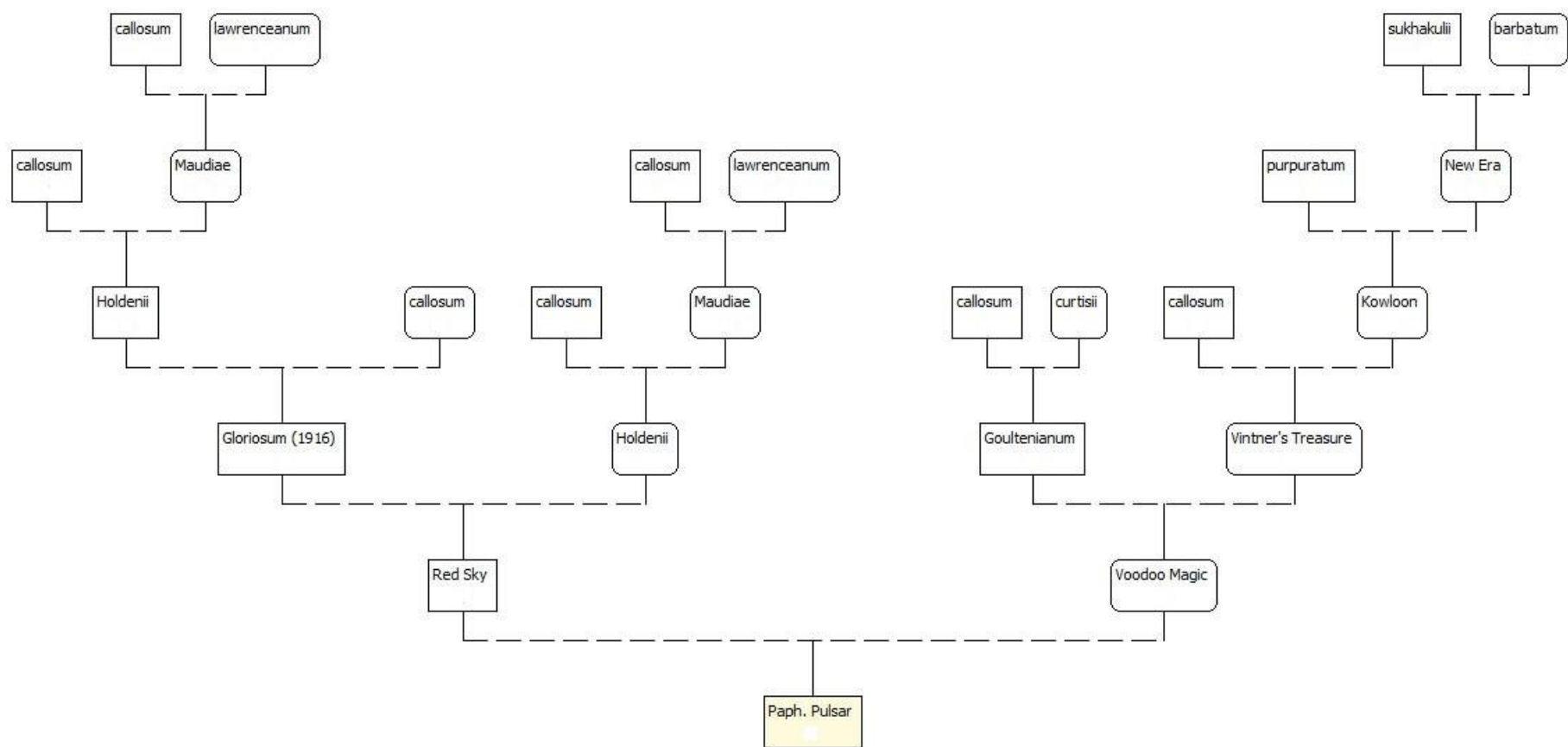
Příloha 5. Část D ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx



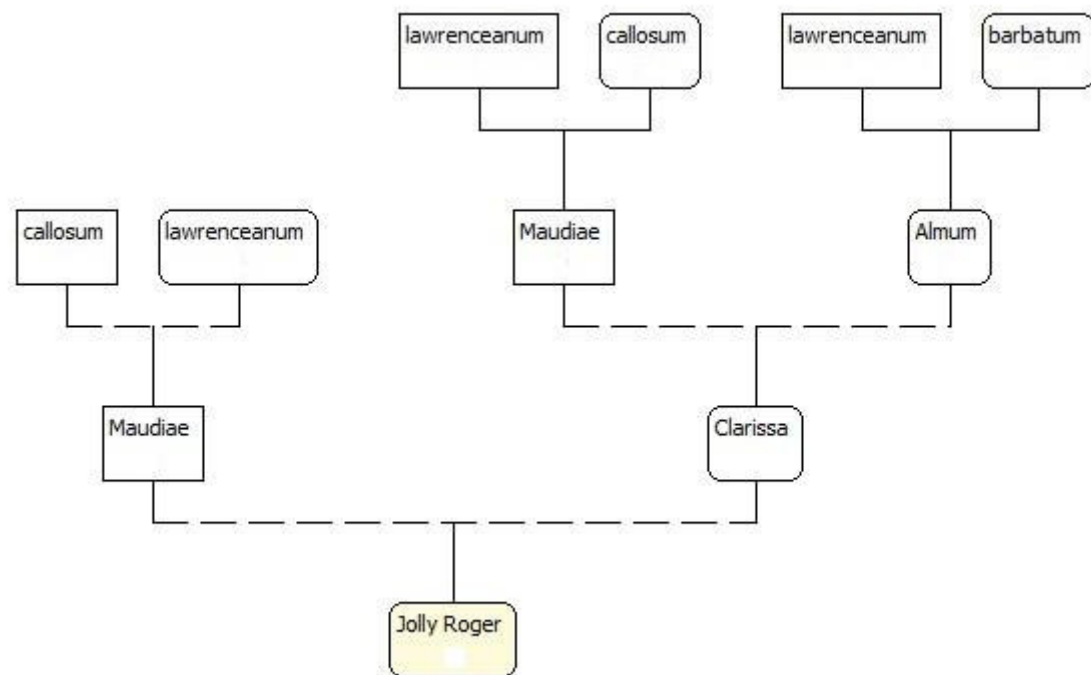
Příloha 6. Část E ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum* Alma Gevaert 'Golden Gate' x Hsinying Konyx



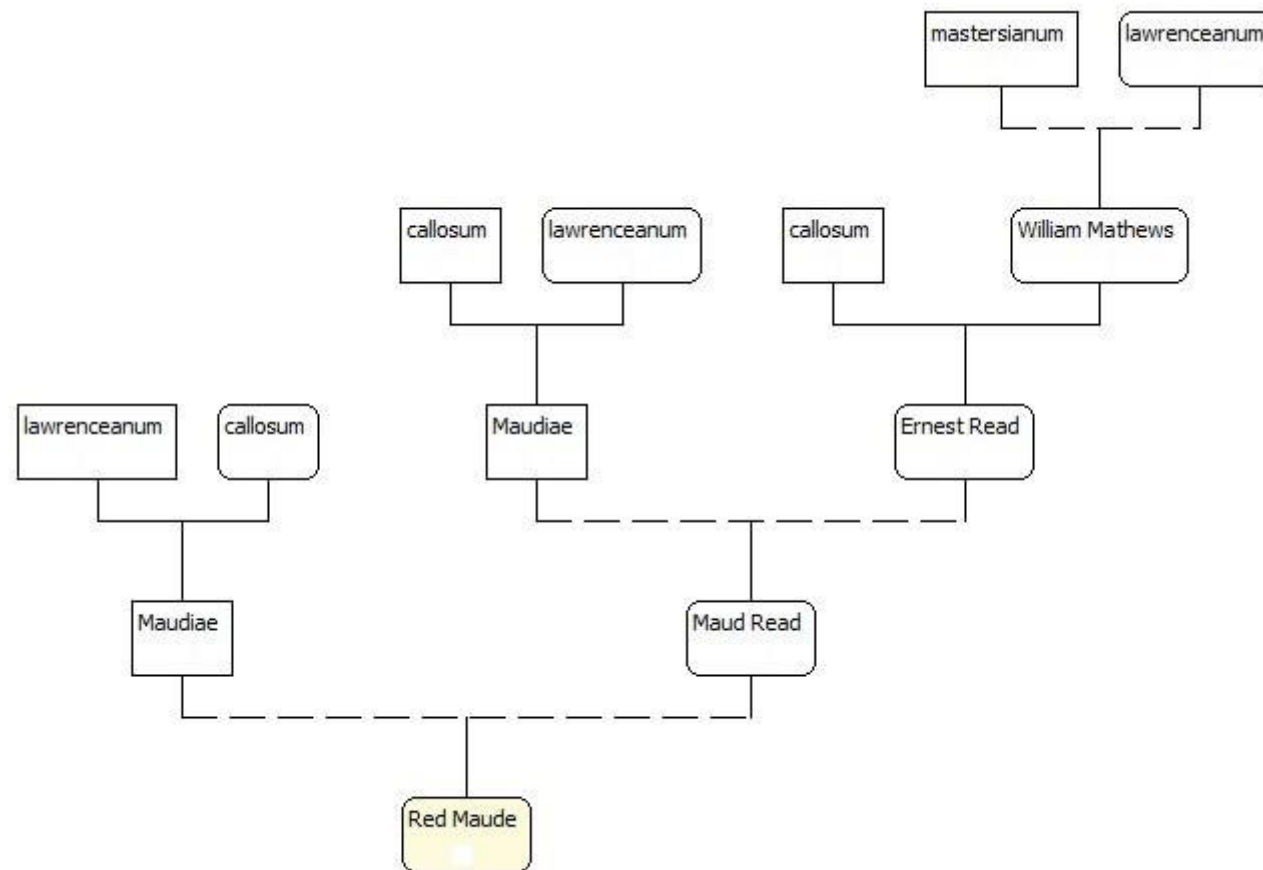
Příloha 7. Obecné schéma šlechtitelských postupů pro hybrid *Paphiopedilum* Pulsar x Hsinying Redjo



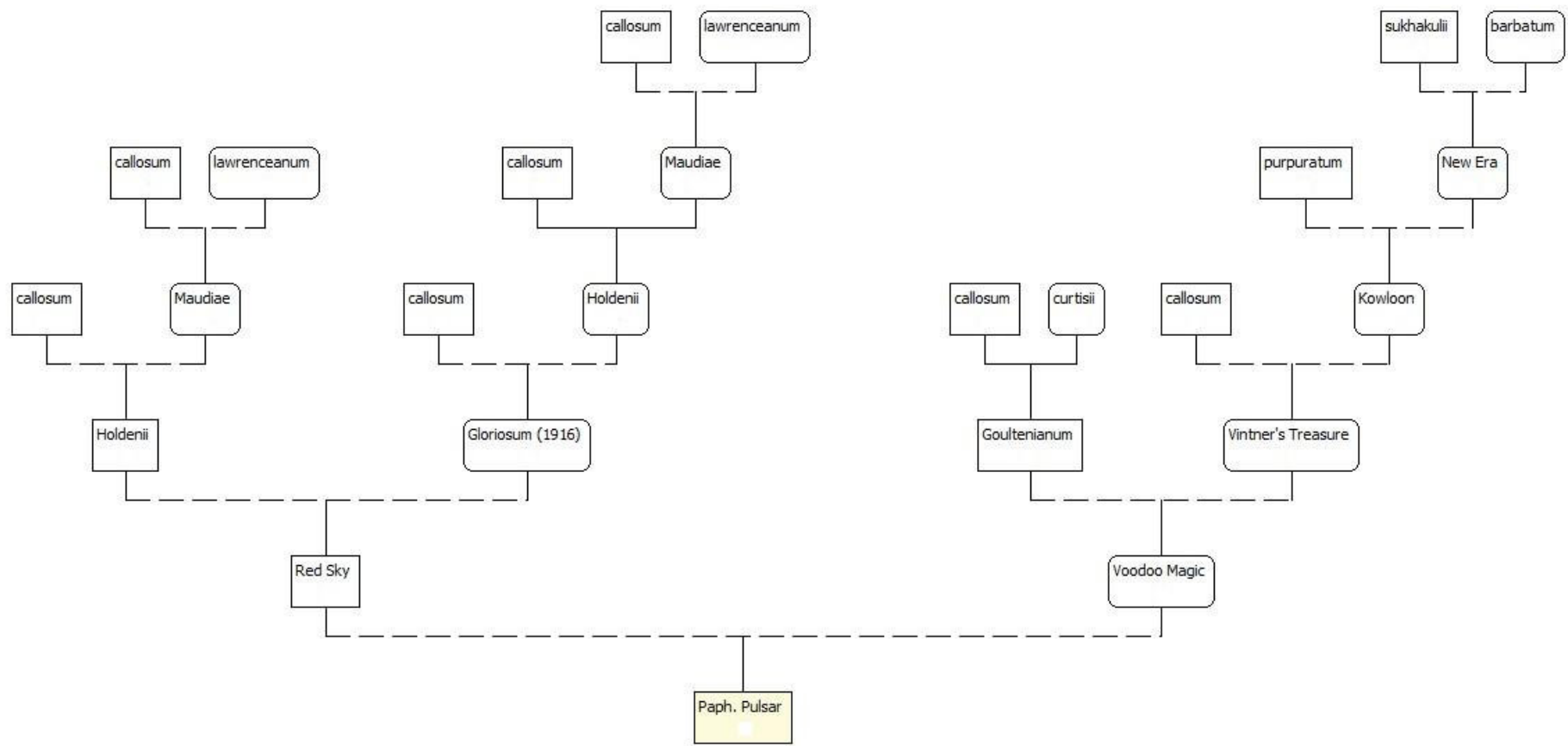
Příloha 8. Část F ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Pulsar* x *Hsinying Redjo*



Příloha 9. Část **G** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum* Pulsar x Hsinying Redjo



Příloha 10. Část **H** ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum* Pulsar x Hsinying Redjo



Příloha 11. Část I ze schématu pro hybrid *Paphiopedilum Pulsar* x *Hsinying Redjo*

Příloha 12. Kontrola pokusu č. I 1. 9. 2011

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace expl., **N** – nekrotizující expl.

Vzorek	Obsah TDZ (mg)				
	konc. 0mg/l	2mg/l	4mg/l	6mg/l	10mg/l
HPA 2951	0	0	0	0	N
PA 6747	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.
PA 6759	0	0	0	0	0
PA 6801	0	0	0	0	0
PA 6905	0	0	0	0	0
PA 6922	0	0	0	0	0
PA 7071	0	0	0	0	0

Příloha 13. Kontrola pokusu č. I 30. 9. 2011

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace expl., **N** – nekrotizující expl.

Vzorek	Obsah TDZ (mg)				
	konc. 0mg/l	2mg/l	4mg/l	6mg/l	10mg/l
HPA 2951	0	0	0	0	N
PA 6747	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.
PA 6759	0	0	0	0	0
PA 6801	0	0	0	0	0
PA 6905	0	0	0	0	0
PA 6922	0	0	0	0	0
PA 7071	0	0	0	0	0

Příloha 14. Kontrola pokusu č. I 31. 10. 2011

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace expl., **N** – nekrotizující expl.

Vzorek	Obsah TDZ (mg)				
	konc. 0mg/l	2mg/l	4mg/l	6mg/l	10mg/l
HPA 2951	0	0	0	0	N
PA 6747	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.
PA 6759	0	0	0	0	0
PA 6801	0	0	0*	0	0
PA 6905	0	0	0	0	0
PA 6922	0	0	0	0	0
PA 7071	0	0	0	0	0

Příloha 15. Kontrola pokusu č. I 30. 11. 2011

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace expl., **N** – nekrotizující expl.

Vzorek	Obsah TDZ (mg)				
	konc. 0mg/l	2mg/l	4mg/l	6mg/l	10mg/l
HPA 2951	ok	0	0	ok	N
PA 6747	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.
PA 6759	0	0	0	0	0
PA 6801	0	0	ok	0	0
PA 6905	0	0	0	ok	ok
PA 6922	0	0	0	0	0
PA 7071	0	0	0	0	0

Příloha 16. Kontrola pokusu č. I 3. 1. 2012

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace expl., **N** – nekrotizující expl.

Vzorek	Obsah TDZ (mg)				
	konc. 0mg/l	2mg/l	4mg/l	6mg/l	10mg/l
HPA 2951	ok	0	0*	ok	N
PA 6747	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.
PA 6759	0	0	0	0	0
PA 6801	0	0	ok	0	0
PA 6905	0	0	0	ok	ok
PA 6922	0	0	0	0	0
PA 7071	0	0	0	0	0

Příloha 17. Kontrola pokusu č. I 31. 1. 2012

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace expl., **N** – nekrotizující expl.

Vzorek	Obsah TDZ (mg)				
	konc. 0mg/l	2mg/l	4mg/l	6mg/l	10mg/l
HPA 2951	ok	0	ok	ok	N
PA 6747	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.
PA 6759	0	0	0	0	0
PA 6801	0	ok	ok	0	0
PA 6905	0	0	0	ok	ok
PA 6922	0	0	0*	0*	0
PA 7071	0	0	0	0	0

Příloha 18. Kontrola pokusu č. I 5. 3. 2012

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace expl., **N** – nekrotizující expl.

Vzorek	Obsah TDZ (mg)				
	konc. 0mg/l	2mg/l	4mg/l	6mg/l	10mg/l
HPA 2951	ok	0	ok	ok	N
PA 6747	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.	Kontam.
PA 6759	0	0	0	ok	0
PA 6801	0	ok	ok	0	0
PA 6905	0	0	0	ok	ok
PA 6922	0	0	ok	ok	0
PA 7071	0	0	ok	ok	ok

Příloha 19. Kontrola pokusu č. II 6. 2. 2012

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace explantátu

druh/ hybrid	číslo lahve	konc. 2mg/l	4mg/l	6mg/l
HPA 2951	1	0	0	0
	2	0	0*	0*
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	5	0	kontam.	0
PA6801	1	0	0	0
	2	0	0*	0
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	5	0	0	0
PA6905	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
	4	0	0*	0
	5	0	0	0

Příloha 20. Kontrola pokusu č. II 29. 2. 2012

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace explantátu

druh/ hybrid	číslo lahve	konc. 2mg/l	4mg/l	6mg/l
HPA 2951	1	kontam.	0	0*
	2	0	ok	ok
	3	0	0	0
	4	0	0	0*
	5	0	kontam.	0
PA6801	1	0	0	0
	2	0	ok	0
	3	0*	ok	0*
	4	0	0	ok
	5	ok	0	ok
PA6905	1	0	0	0
	2	ok	0	0
	3	0	ok	0
	4	0	ok	0
	5	0	0	0

Příloha 21. Kontrola pokusu č. II 20. 3. 2012

Legenda: **0** – explantát bez reakce, **0*** - náznak proliferace, **ok** – proliferující jedinec, **kontam.** – kontaminace explantátu

druh/ hybrid	číslo lahve	konc. 2mg/l	4mg/l	6mg/l
HPA 2951	1	kontam.	0	ok
	2	0	ok	ok
	3	0	0	0
	4	0	0	ok
	5	0	kontam.	0
PA6801	1	0	0	0
	2	0	ok	0
	3	ok	ok	ok
	4	0	ok	ok
	5	ok	0	ok
PA6905	1	0	0	ok
	2	ok	ok	ok
	3	0	ok	0
	4	0	ok	0
	5	0	0	ok