

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

katedra biologických disciplín

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Provozně podnikatelský



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Možnosti kultivace orchideje *Macodes petola* technikami *in vitro*

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE:

Ing. Karel Suchý, Ph.D.

VYPRACOVALA:

Simona Svobodová

2007

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma "Možnosti kultivace orchideje *Macodes petola* technikami *in vitro*" vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 30. dubna 2007

Podpis

Simona Štokodová

Česká univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská
Katedra ekologie
Akademický rok: 2004/2005

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMELECKÉHO DÍLA, UMELECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Simona SVOBODOVÁ
Studijní program: M410: Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Provozně podnikatelský obor
Název tématu: Možnosti kultivace orchideje *Macodes petola* technikami *in vitro*

Zásady při vypracování:

- 1. Vypracování literární referace problematiky kultivace orchidejí *in vitro*.
- 2. Ověření účinnosti metody oděru primárního explantátu a jeho přerost na agar.
- 3. Ověření účinnosti regeneračních částí rostlinného materiálu k různým metodám sterilizace a jeho přerost na agar.
- 4. Ověření vlivu rozdílné teploty a osmotického složení kultivačního média a optimalizace podmínek kultivace.

Děkuji Ing. Karlu Suchému, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí zázemí k realizaci mé diplomové práce, neboť všechny pokusy probíhaly v prostoru laboratoře katedry biologických disciplín. Také děkuji Mgr. Bohumilu Vondrušovi z firmy Explantex a doc. RNDr. Ing. Josefu Rajchardovi, Ph.D. za odborné rady. Poděkování patří hlavně mým rodičům, kteří mi umožnili studovat na vysoké škole.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská
Katedra ekologie
Akademický rok: 2004/2005

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Simona SVOBODOVÁ

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Provozně podnikatelský obor

Název tématu: Možnosti kultivace orchideje *Macodes petola* technikami *in vitro*

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracování literární rešerše problematiky kultivace orchidejí *in vitro*.

Ověření různých metod odběru primárního explantátu a jeho převod na agar.

Ověření citlivosti vegetativních částí rostlinného materiálu k různým metodám sterilizace a jeho převod na agar.

Ověření vlivu rozdílného fytohormonálního složení kultivačního média a optimalizace diferencovaných kultivačních podmínek.

Rozsah práce: 40 stran textu vč.tab.a fot.
Rozsah příloh: grafy, fotografie
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

- Taiz L., Ziegler E. 2002: Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland
Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. 1998: Fyziologie rostlin. Academia, Praha
Novák F. J. 1990: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. - Academia, Praha
Votruba M. 1987: Explantátové techniky. Skriptum, VŠZ Praha

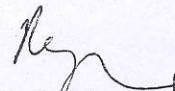
Vedoucí diplomové práce: Ing. Karel Suchý, Ph.D.
Katedra ekologie

Datum zadání diplomové práce: 14. února 2005
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2007

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení ⑤
Studentská 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.
děkanka

L.S.


doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 18. února 2005

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
2.1 Charakteristika čeledi Orchidaceae.....	3
2.1.1 Historie pěstování	3
2.1.2 Druhy orchidejí	4
2.1.3 Využití orchidejí	4
2.1.4 Ohrožení a ochrana	5
2.2 Charakteristika modelového druhu	5
2.2.1 Rod <i>Macodes</i>	5
2.2.2 <i>Macodes petola</i>	7
2.3 Orchideje a obchod	8
2.3.1 Okrasné zahradnictví.....	9
2.3.1.1 Společná organizace trhu EU	9
2.3.1.2 Květinářství v ČR.....	9
2.3.1.2.1 Spotřeba a užití květin v ČR	10
2.3.1.3 Zahraniční obchod ČR květinami	12
2.4 Generativní množení	13
2.4.1 Způsoby generativního množení	14
2.5 Vegetativní množení	15
2.5.1 Explantátové kultury rostlin.....	15
2.5.1.1 Historie a principy problematiky	15
2.5.1.2 Výživa explantátových kultur	17
2.5.1.2.1 Živná média.....	17
2.5.1.2.2 Složky médií	18
2.5.1.3 Fyzikální podmínky kultivace.....	20
2.5.1.4 Převod <i>in vitro</i> rostlin do půdy	21
2.5.1.5 Využití explantátových kultur.....	21
3 MATERIÁL A METODIKA.....	23
3.1 Rostlinný materiál.....	23
3.2 Příprava živného média.....	23
3.3 Postup kultivace	25
3.3.1 Možnosti převodu	27
4 VÝSLEDKY	31
4.1 Metoda I: Dezinfekce 70% etanolem.....	31
4.2 Metoda II: Opláchnutí 95% etanol.....	31
4.3 Metoda III: Opláchnutí 80% etanol	31
4.4 Metoda IV: Opláchnutí 90% etanol	32
5 DISKUZE.....	33
6 ZÁVĚR	35
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	37

1 ÚVOD

V posledních letech si orchideje získávají stále více příznivců – pěstitelů. Jejich pověst jako velmi obtížně pěstovaných rostlin zaniká a stále více milovníků exotické květeny je začíná s úspěchem pěstovat i v bytě.

V rostlinné říši tvoří orchideje jednu z nejbohatších čeledí – *Orchidaceae* (vstavačovitě), která obsahuje kolem 30000 druhů, dělících se do více než 500 rodů. Orchideje patří k vývojově nejmladším rostlinám a jsou často úzce specializované na určité prostředí. Mnoho z nich je endemických – tj. rostoucích pouze na jediném místě na světě, často velmi malém (např. na svazích jediné hory). Některé druhy tak zničením dané lokality z přírody nenávratně zmizí a mnohdy přežívají jen ve sbírkách pěstitelů.

V současné době stojí terestrické orchideje v popředí ochranných zájmů v souvislosti s druhovou ochranou a jejich citlivou reakcí na rušivé vlivy vnějších faktorů na původní prostředí. Z důvodu ničení deštných pralesů a přirozených stanovišť dochází k vyhynutí spousty vzácných taxonů. Značné nároky terestrických orchidejí na nenarušená stanoviště souvisí s jejich mykotrofním způsobem, tzn. vazbou na symbiotické houby v půdním humusu. K vývoji mykorhizních hub v půdním prostředí dochází pouze za dostatečného zásobení kyslíkem, vodou a živinami.

Škodu způsobují také obchodníci, kteří protizákonně drancují jejich stanoviště a prodávají hlízy "milovníkům" orchidejí. Právě kvůli ohrožení jsou v mnoha státech vydávány zákony na ochranu orchidejí. Zákony jsou nutné a v případě tropických orchidejí, s nimiž se především obchoduje, bezprostředním předpokladem pro zachování druhů.

Jednou z nejslibnější se rozvíjejících oblastí zemědělské biotechnologie je manipulace s vyššími rostlinami na úrovni izolovaných buněk, pletiv a orgánů. Komplex metod založený na kultivaci *in vitro* – explantátové kultury – představuje v současné době možnost záchrany, jak pro ohrožené rostliny, tak také pro jejich přirozená stanoviště.

Cílem práce je vypracování postupu vegetativního množení pro tropický druh orchideje *Macodes petola* v podmínkách *in vitro*. Byl sledován vliv složení živného média (koncentrace solí, vitamínů, růstových regulátorů a ostatních organických složek na iniciaci explantátu, multiplikaci - zmnožení výhonů a zakořenění *in vitro* kultur) a vliv způsobu a délky povrchové sterilizace explantátů.

Mikropropagační techniky jsou nejvhodnější použitelnou metodou pro rychlou multiplikaci a zachování cenných genotypů. Tyto metody jsou rovněž hojně využívány v systému šlechtění rostlin, při získávání nových odrůd, ale také záchranu ohrožených odrůd, ozdravování rostlin, klonové množení cenných genotypů, genobanky.

Klasifikace jsou různé po celé zeměkouli vyrostle kvůli rozdílnosti polítek oblastí, použití a rozloze moře a oceány (JAKUBOVÁ a ŠMÍDÁK 1996). Někteří druzi rostlin ze severních polárních kruhů a jiné i v horských oblastech Himalájí ve výškách nad 2000 m (JAKUBOVÁ). Největší část světě došlo a současně téměř všechny orchideje austrálních částí a sklenků jsou orchideje subtropického a tropického pásma. Na orchideje nejbohatší oblastí je Asie, pak Amerika, méně orchidejí roste v Africe a v severní části Austrálie. I na našem námi republiky se ve volné přírodě vyskytuje asi 70 druhů orchidejí mnoha přímek (JAKUBOVÁ 1997).

Orchideje patří ke vývojově mladá skupina: nejstarší fosilní nálezy, který se s určitou pravděpodobností může pokládat za orchidej, pochází z miocénu a je starý asi 15 milionů let. Uvažuje se na poměrně nízké fylogenetické úrovni (JAKUBOVÁ 2000).

2.1.1 Historie pěstování

Historie pěstování orchidejí začíná téměř před 200 lety, kdy byly z domů neporokovovaných anglických a nizozemských oblastí dovozeny do Evropy první exotické druhy (RUTENHAUSEN a OAKLEY G. & D. a SUTHERLAND 1995).

První tropické orchideje přivezl do Evropy Španěl ze západních ostrovů. Po dohod významných rostlinářů se postupně vytvořila silná poptávka. Začátky pěstování orchidejí však byly provázány četnými neúspěchy, protože všechny dovezené druhy byly vázány do normální zahradnické půdy země, v níž přirozeně hynuly. Teprve objev kultivačních nároků orchidejí otevřel dveře jejich hravému pěstování. Zahradnické podmínky i bohatí sponzorovali (včetně z Anglie) vydali do tropů všech světadílů "lovce orchidejí", kteří přiváželi celé lodní náklady nahraných rostlin.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Charakteristika čeledi Orchidaceae

Čeď vstavačovitých (Orchidaceae) – vžitějším názvem orchideje – jsou co do četnosti a rodů i druhů nejbohatší čeledí v říši vyšších rostlin (JATIOVÁ a ŠMITÁK 1996). Tato čeď čítá na 30000 druhů (DYKYJOVÁ 2003). Proto jsou orchideje botanicky neobyčejně zajímavé (BUTTLER 2000).

Rozšířeny jsou téměř po celé zeměkouli vyjma trvale zaledněné polární oblasti, pouště a světová moře a oceány (JATIOVÁ a ŠMITÁK 1996). Některé druhy rostou za severním polárním kruhem a jiné i v horských oblastech Himalájí ve výškách nad 2000 m (SYROVÁTKA). Největší část celé čeledi a současně téměř všechny orchideje amatérských sbírek a skleníků jsou orchideje subtropického a tropického pásma. Na orchideje nejbohatší oblastí je Asie, pak Amerika, méně orchidejí roste v Africe a v severní části Austrálie. I na území naší republiky se ve volné přírodě vyskytuje asi 70 druhů orchidejí mírného pásma (GOTHARDOVÁ 1992).

Orchideje patří za vývojově mladou skupinu: nejstarší fosilní nález, který se s určitou pravděpodobností může pokládat za orchidej, pochází z miocénu a je starý asi 15 miliónů let. Ukazuje to na poměrně nízké fylogenetické stáří (BUTTLER 2000).

2.1.1 Historie pěstování

Historie pěstování orchidejí začíná téměř před 200 lety, kdy byly z dosud neprozkoumaných tropických a subtropických oblastí dovezeny do Evropy první exotické druhy (RITTERSHAUSEN a OAKLEY G. & D. a SUTHERLAND 1995).

První tropické orchideje přivezli do Evropy Španělé ze západoindických ostrovů. Po dosud neznámých rostlinách se postupně vytvořila silná poptávka. Začátky pěstování orchidejí však byly provázeny četnými neúspěchy, protože všechny dovezené druhy byly sázeny do normální zahradnické půdní směsi, v níž přirozeně hynuly. Teprve objev kultivačních nároků orchidejí otevřel dveře jejich hromadnému pěstování. Zahradnické podniky i bohatí soukromníci (vesměs z Anglie) vysílali do tropů všech světadílů “lovce orchidejí“, kteří přiváželi celé lodní náklady nasbíraných rostlin.

Nový impuls dostalo pěstování orchidejí objevem jejich soužití s houbami, možností jejich křížení a šlechtění a hlavně objevem symbiotického množení. V padesátých letech 20. století došlo k dalšímu světovému objevu – množení orchidejí pomocí explantátových kultur (všeobecně nazvaného meristémová kultura). Všechny vědecky propracované metody jejich pěstování snížily cenu orchidejí natolik, že je bylo možno zpřístupnit jako tržní zahradnické zboží co nejširší veřejnosti (DUŠEK a KRÍSTEK 1986).

2.1.2 Druhy orchidejí

Obecně můžeme orchideje rozdělit na druhy epifytické, které žijí na jiných rostlinách a využívají je pouze jako podkladu a terestrické (geofyty), rostoucí v zemi (PROCHÁZKA a VELÍSEK 1983).

Četnost zastoupení druhů vstavačovitých klesá od rovníku k pólům. Zatímco v tropech výrazně převažují epifytní druhy nad terestrickými, se vzrůstající zeměpisnou šířkou klesá počet druhů osidlujících stromy, přes subtropy, kde se jejich poměr vzájemně vyrovnává, až do mírného pásma, kde jsou domovem již výhradně jen zemní – terestrické druhy orchidejí (JATIOVÁ a ŠMITÁK 1996).

2.1.3 Využití orchidejí

Širší praktické použití má pouze původně mexický druh vanilka plocholistá *Vanilla planifolia*. Její válcovité dlouhé tobolky v nedozrálém stavu obsahují vanilin, který je jedním z nejrozšířenějších aromat (PROCHÁZKA a VELÍSEK 1983). Vzhledem k vysoké ceně přírodního koření je vyráběn jako náhrada také synteticky, je však proti přírodnímu aromatu, které obsahuje mnoho desítek dalších organických látek, méně lahodný a má ostřejší chuť (<http://encyklopedie.seznam.cz>, 10. 4. 2007).



Obr. č. 1: *Vanilla planifolia*
(<http://vanilka.navajo.cz>)

Zahradnický využívány jsou především tropické druhy, pěstované pro svou mimořádnou krásu, půvab, neobvyklost a poměrně snadné množení (POTŮČEK a ČAČKO 1996).

V Evropě i jiných částech světa měl v minulosti rozsáhlé použití salep, dodnes velmi žádaný především v Malé Asii. Jedná se o sušené hlízy orchidejí sbírané během květu nebo těsně po odkvětu. Pro značný obsah slizových látek se využívá v lékařství (PROCHÁZKA 1980).

2.1.4 Ohrožení a ochrana

Celá čeleď náleží ke skupině “bezprostředně ohrožených vyhubením“. Ohrožení orchidejí je v první řadě zapříčiněno omezením jejich životního prostoru. Vhodné biotopy se vyskytují stále řidčeji. Orchideje nesnášejí zvýšené a velkoplošné hnojení, odvodňování a průmyslové využívání půdy, jež se dnes provádí v mnoha místech. Škodu způsobují také obchodníci, kteří protizákonně drancují jejich stanoviště a prodávají hlízy “milovníkům orchidejí“ (BUTTLER 2000).

Lze konstatovat, že pokud zmizí deštné pralesy, zanikne s nimi 90% druhů orchidejí na Zemi. Neusměrníme-li explozi a rozvoj průmyslu, mající za následek všeobecné zhoršování životního prostředí, čeká podobný osud i orchideje mírných pásů (JATIOVÁ a ŠMITÁK 1996).

Právě kvůli ohrožení byly v mnoha státech vydány zákony na ochranu orchidejí. Kromě toho jsou orchideje zahrnuty do Washingtonské dohody o ochraně druhů, která reguluje mezinárodní obchodování se zvířaty a rostlinami (BUTTLER 2000).

ČR rovněž přijala a respektuje např. Úmluvu o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin CITES. Předmětem ochrany je v současné době asi 2000 druhů zvířat a 35000 druhů rostlin. Mezi druhy kriticky ohrožené vyhubením patří také tyto druhy orchidejí: *Aerangis ellisii*, *Cattleya trianaei*, *Dendrobium cruentum*, *Laelia jongheana*, *Laelia lobata*, *Paphilopedilum spp.*, *Peristeria elata*, *Phragmipedium spp.*, *Renanthera imschootiana*, *Vanda coerulea* (www.zoopraha.cz, 5. 3. 2007). Zákony jsou nutné a v případě tropických orchidejí, s nimiž se především obchoduje, bezprostředním předpokladem pro zachování druhů (BUTTLER 2000).

2.2 Charakteristika modelového druhu

2.2.1 Rod *Macodes*

Orchideje rodu *Macodes* jsou typickými rostlinami tropického deštného lesa, popř. mlžného lesa, v nadmořských výškách od 300 do 1400 m. Zde rostou terestricky v bylinném

patře v zástinu vyšších pater vegetace, někdy i epifyticky na kmenech stromů porostlých mechy a další vegetací, jsou však schopny růst i na skalách, po nichž stéká voda, vždy v podmínkách trvalé vlhkosti vzduchu a nízké intenzity rozptýleného osvětlení (BALOUNOVÁ a RAJCHARD 2001).

Všechny druhy vyžadují silné stínění a teplo. Jako půdní substrát se osvědčuje směs sphagna s listovkou, rašelinou a pískem. Rod *Macodes* Lindl. 1840 zahrnuje 7-10 druhů:

- | | |
|-------------------------|---------------------------------|
| - <i>M. argyroneura</i> | - <i>M. petola</i> (Bl.) Lindl. |
| - <i>M. cominsii</i> | - <i>M. rollinsoni</i> |
| - <i>M. dendrophila</i> | - <i>M. sanderiana</i> |
| - <i>M. javanica</i> | - <i>M. lowii</i> |
| - <i>M. marmorata</i> | |

(DUŠEK a KRÍSTEK 1986).

Uvedené druhy rostou v Malajsii, na Sumatře, Jávě, Borneu, Nové Guineji a na Šalamounových ostrovech (RICHTER 1965). Taxonomicky je rod *Macodes* řazen do subtribu *Physurinae*, zahrnujícího rostliny s dužnatými, vzpřímenými, popř. poléhavými stonky.

Orchideje rodu *Macodes* jsou rostliny drobného vzrůstu s ojedinělou kresbou listů. (BALOUNOVÁ a RAJCHARD 2001). Růžicovitě uspořádané listy na krátké dužnaté lodyze jsou sametově zelené nebo bronzové se světlou, stříbrnou nebo nazlátlou nervaturou (RICHTER 1965). Žilnatina ohraničuje na ploše listové čepele políčka, červenavě nebo červenohnědě zbarvená. Na lícni straně listu je toto zbarvení zpravidla překryto zelení, lépe je patrné na spodní straně listů, kde tmavší políčka tvoří jakousi mozaiku na velmi světle zbarveném (téměř bílozeleném) podkladu. Zbarvením listů se řadí mezi nejkrásnější rostliny. (BALOUNOVÁ a RAJCHARD 2001).

Blízké rody podobné vzhledem i biologií jsou *Anoectochilus*, *Haemaria*, *Ludisia*, *Eucosia* a *Goodyera* (<http://www.cloudsorchids.com>, 5. 3. 2007).

2.2.2 *Macodes petola*



Obr. č. 2: *Macodes petola*

Nejčastěji pěstovaným druhem je právě druh *Macodes petola* (Bl.) Lindl., která je známa z Jávy, Malakky, Sumatry a Filipín. Je to drobná rostlina se vzpřímenými nebo mírně poléhavými lodyhami o průměru do 5 mm (RICHTER 1965). Oválné, mírně zašpičatělé listy mají rozměry cca 6x3–4 cm. Listy jsou sametově světle zelené, protkané zlatavě lesklými podélnými i příčnými nervy, a bronzově skvrnité (DUŠEK a KŘÍSTEK 1986).

V nodech stonků vyrůstají krátké a silné vzdušné kořeny, ve vlhkém prostředí hustě porostlé kořenovým vlášením. Kořen vyráží vždy na straně protilehlé k listové pochvě. Rostliny rostoucí v podmínkách nadbytku světla mají listy zbarveny jednotvárně žlutozeleně s málo výraznou a nelesklou žilnatinou. Internodia těchto rostlin jsou kratší, krátké, kolíkovité mají i vzdušné kořeny, listy jsou tužší a tlustší, pokud kvetou mají kratší květní lodyhy s méně květy.

Květenství tvoří vzpřímený hrozen s květy o velikosti 7–10 mm. Střední sepal a petaly tvoří přilbovitý útvar. Drobné, nevýrazné květy jsou hnědavé s bílými špičkami tepalů. Květů bývá na lodyze 5–10. Trvanlivost květů je přibližně 2 týdny. Rostliny kvetou každoročně (BALOUNOVÁ a RAJCHARD 2001).



Obr. č. 3: Kvetoucí *Macodes petola*
(<http://i25.photobucket.com>)

V tropické zóně nejsou roční doby, ale je tam více nebo méně vytvořeno období sucha a období dešťů. Orchideje vykvétají většinou v období sucha, kdy je poněkud kratší den, málo

srážek, ale velmi intenzivní sluneční svit. Rostliny z těchto oblastí kvetou v našich podmínkách od podzimu do počátku jara, tedy v období, kdy je nejmenší intenzita slunečního svitu.

Nároky na vláhu odpovídají vlhkostním poměrům míst, na nichž v přírodě rostou. Substrát tedy udržujeme stále vlhký, zásadně však nesmí být trvale podmáčený (DUŠEK a KRÍSTEK 1986).

Nejlépe rostou v podmínkách trvalé vysoké vlhkosti vzduchu (70-80%), denních teplot v rozmezí 21-27°C, v noci klesajících na 16-18°C a nízké intenzity rozptýleného osvětlení (<http://orchidlady.com>, 2. 4. 2007). Často jim neublíží, když krátkodobě stoupne teplota vysoko nad 30°C, ale pokles pod 15°C, zvláště jsou-li mokré, může být smrtelný (DUŠEK a KRÍSTEK 1986). Vzhledem k podmínkám s minimem světla rostou velmi pomalu a vystačí s minimem přístupných živin.

Přestože se jedná o rostliny z vyhraněných stanovišť deštných lesů, je možné jejich úspěšné pěstování i v bytových podmínkách (<http://orchidlady.com>, 2. 4. 2007).

2.3 Orchideje a obchod

Každého nadšence a začínajícího pěstitele orchidejí zajímají nejen možnosti kultivace, ale také možnosti jejich získání i jejich cena (GOTHARDOVÁ 1992).

Řezané květy orchidejí se začaly používat až ve 20. století (RITTERSHAUSEN a OAKLEY G. & D. a SUTHERLAND 1995). Ještě v 70. letech bylo shánění orchidejí spojeno s nadlidským úsilím, k řezu je pěstovalo jen málo zahradnických provozoven a rovněž amatérské pěstování orchidejí nebylo zdaleka rozšířeno tak jako v posledních letech. Od té doby se však situace radikálně zlepšila (MUŽÍK 1992).

Orchideje se většinou prodávají ve specializovaných obchodech, kde je možnost vybrat si nejen z rozsáhlé nabídky, ale zároveň získat rady od odborníků. Také zahradnictví a jednotliví pěstitelé čas od času prodávají přebytky, ale jejich nabídka není příliš rozmanitá (RITTERSHAUSEN a OAKLEY G. & D. a SUTHERLAND 1995).

Největší výběr rostlin za rozumné ceny však mají bezesporu kluby pěstitelů orchidejí. Tyto organizace nejen poskytují svým členům za přijatelný poplatek mnoho užitečných informací, ale také pořádají burzy rostlin. Mezi největší kluby u nás patří například Orchidea klub Praha, nebo Orchidea – Klub ČZS Brno (MUŽÍK 1992).

Orchideje se prodávají buď jako mladé rostliny, které kvetou až po několika letech nebo téměř dospělé rostliny, poprvé kvetoucí či plně rozvinuté (RITTERSHAUSEN a OAKEY G. & D. a SUTHERLAND 1995). Stále častěji je možné setkat se při nákupu rostlin s podstatně levnějšími mladými rostlinkami ještě v láhvích na živné agarové půdě (MUŽÍK 1992).

Okouzlující barvy a nápadné tvary květů činí orchideje ideálními objekty pro aranžování (RITTERSHAUSEN a OAKEY G. & D. a SUTHERLAND 1995). Květy orchidejí vynikají také rozsáhlou škálou nejrozličnějších vůní, od omamných parfémů tropických druhů i některých našich druhů (DYKYJOVÁ 2003).

I přes dlouhou dobu transportu ke konečnému zákazníkovi zůstávají orchideje v dobré kvalitě, trvanlivost orchidejí je tedy naprosto srovnatelná s jinými skupinami rostlin (RITTERSHAUSEN a OAKEY G. & D. a SUTHERLAND 1995).

Ceny rostlin jednotlivých firem jsou rozdílné, avšak konkurence je stlačuje do určitých mezí. Mezi známé zahraniční firmy patří firma Green Orchids z Thajska, kde se teplomilné rody pěstují jen pod přístřeškem s minimálními energetickými nároky, firma Orchids by Hausermann z USA poblíž Chicaga, firma Yamamoto, Hawai, USA (GOTHARDOVÁ 1992). Ceny importovaných květů se většinou odvíjí od cen na burzách - v Nizozemsku VBA Aalsmeer nebo FLORA Holland, Naaldwijk a v Německu VBA/VBN v Porýní (SITUAČNÍ a VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA – OKRASNÉ ROSTLINY 2005). Ceny jsou sice poměrně vysoké, ale sortiment kvalitních rostlin je velký (MUŽÍK 1992).

2.3.1 Okrasné zahradnictví

2.3.1.1 Společná organizace trhu EU

V rámci Společné zemědělské politiky je pro produkty okrasného zahradnictví a další živé rostliny vymezena Společná organizace trhu s květinami a živými rostlinami. Organizace trhu stanovuje jakostní standardy a opatření pro ochranu trhu EU. Statistikou vnitřního obchodu se zabývá systém INTRASTAT.

2.3.1.2 Květinářství v ČR

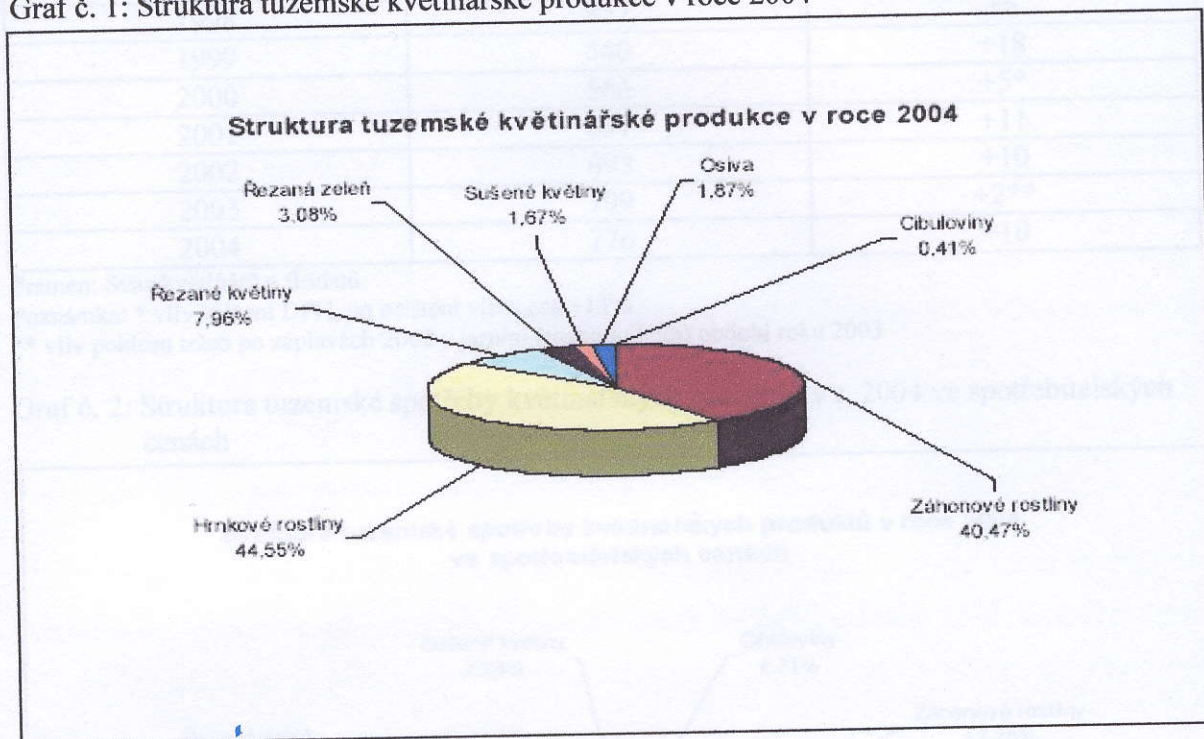
Trend vzestupu produkce květin, který tuzemské květinářství zaznamenává od roku 1997 (SITUAČNÍ a VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA – OKRASNÉ ROSTLINY 2005).

Tab. č. 1: Produkce květinářství v ČR (v mil. Kč)

1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
650	650	640	660	740	840	1011	1162	1322	1423	1495

Pramen: Svaz květinářů a floristů

Graf č. 1: Struktura tuzemské květinářské produkce v roce 2004



(SITUAČNÍ a VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA – OKRASNÉ ROSTLINY 2005).

2.3.1.2.1 Spotřeba a užití květin v ČR

Spotřeba květin v ČR se na rozdíl od většiny evropských zemí neustále zvyšuje. Dlouhotrvající trend růstu poptávky po produktech květinářství v ČR je důsledkem zájmu spotřebitelů a rostoucí kupní síla obyvatelstva, které okrasné rostliny stále více vnímá jako dárkový předmět nebo sezónní dekoraci, ale také jako trvalou a příjemnou součást svého životního prostředí (SITUAČNÍ a VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA – OKRASNÉ ROSTLINY 2005).

Tab. č. 2: Spotřeba květin v ČR ve spotřebitelských cenách v Kč/os./rok

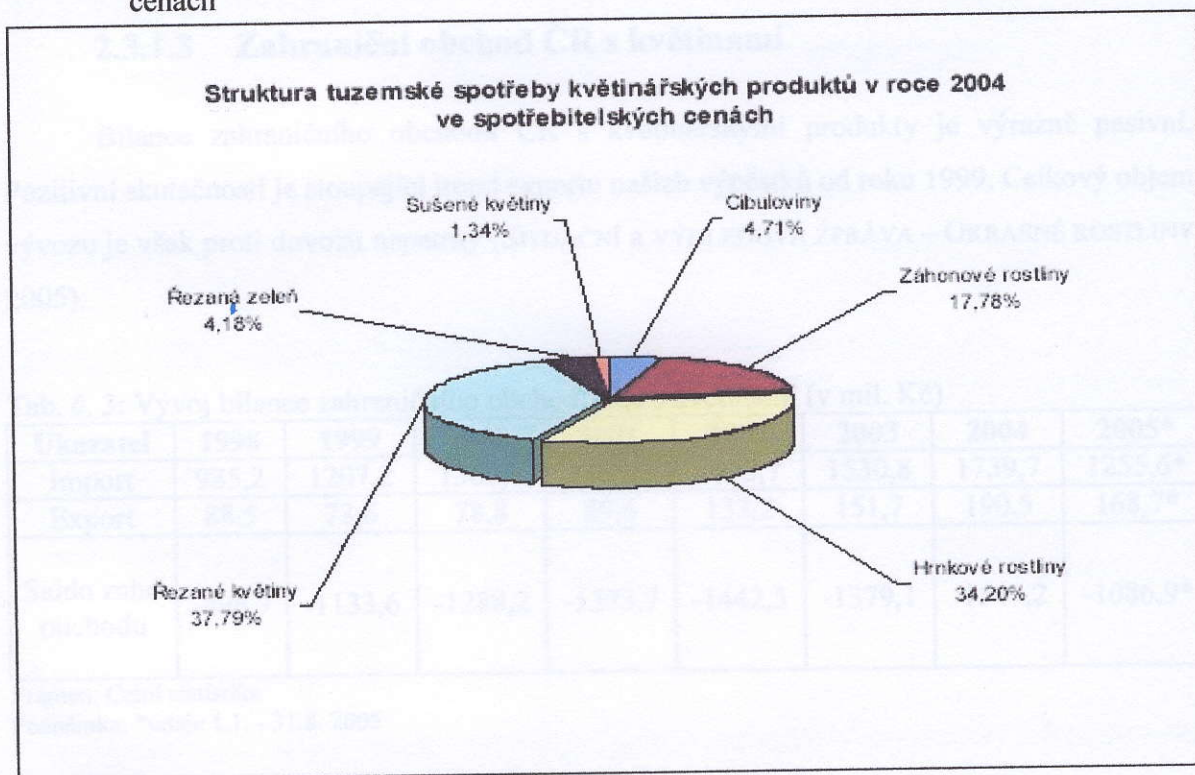
Rok	Spotřeba květin	Meziroční přírůstek (%)
1994	288	
1995	316	+10
1996	332	+5
1997	433	+30
1998	457	+6
1999	540	+18
2000	566	+5*
2001	631	+11
2002	693	+10
2003	709	+2**
2004	776	+10

Pramen: Svaz květinářů a floristů

Poznámka: * vliv snížení DPH, po očištění vlivu cca +13%

** vliv poklesu tržeb po záplavách 2002 v jarním (rozhodujícím) období roku 2003

Graf č. 2: Struktura tuzemské spotřeby květinářských produktů v r. 2004 ve spotřebitelských cenách



(SITUAČNÍ a VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA – OKRASNÉ ROSTLINY 2005).

Odbyt produktů zabezpečují odbytové organizace CZ-FLORA, odbytové družstvo a CZ VITA PLANT, odbytové družstvo. Odborné svazy sektoru reprezentují Svaz květinářů a floristů ČR a Svaz školkařů ČR.

2.3.1.2.2 Cenový vývoj

Spotřebitelské ceny květin se v ČR meziročně neustále zvyšují. V zimních měsících jsou v ČR ceny květin vyšší než v měsících letních, což mimo jiné souvisí s vyššími náklady na jejich pěstování v zimním období. Tento výkyv není příliš znatelný například u karafiátů nebo orchidejí, jejichž ceny jsou v průběhu roku více méně stálé.

Ceny importovaných květin se většinou odvíjí od cen na burzách. Tyto ceny vykazují výrazné sezónní výkyvy (zvyšují se zvláště v období svátků – Valentýn, Den matek, Velikonoce apod.)

Od dubna 2004 podléhají živé rostliny základní sazbě (19%) daně z přidané hodnoty. Tato skutečnost se v roce 2004 promítla na zvýšení cen především živých rostlin a na mírném zpomalení růstu prodeje.

2.3.1.3 Zahraniční obchod ČR s květinami

Bilance zahraničního obchodu ČR s květinářskými produkty je výrazně pasivní. Pozitivní skutečností je stoupající trend exportu našich výpěstků od roku 1999. Celkový objem vývozu je však proti dovozu nepatrný (SITUAČNÍ a VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA – OKRASNÉ ROSTLINY 2005).

Tab. č. 3: Vývoj bilance zahraničního obchodu ČR s květinami (v mil. Kč)

Ukazatel	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005*
Import	985,2	1207,2	1367,0	1463,3	1575,7	1530,8	1739,7	1255,6*
Export	88,5	73,6	78,8	89,6	133,2	151,7	190,5	168,7*
Saldo zahr. obchodu	-896,7	-1133,6	-1288,2	-1373,7	-1442,5	-1379,1	-1549,2	-1086,9*

Pramen: Celní statistika

Poznámka: *údaje 1.1. - 31.8. 2005

Tab. č. 4: Vývoj bilance zahraničního obchodu ČR s řezanými orchidejemi (v tis. Kč)

Operace	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005*
dovoz	59789	57950	55607	52469	50857	41579	37475	23830*
vývoz	233	119	205	177	187	38	286	2145*

Pramen: Celní správa

Poznámka: *údaje 1.1. - 31.8. 2005

Tab. č. 5: Dovoz orchidejí do ČR podle států (v tis. Kč)

Země	Rok 2003	Rok 2004	Rok 2005 do 31.8. 2005
Ekvádor	5	-	-
Jihoafrická rep.	47	15	10
Keňa	-	-	1
Mauritius	217	237	61
Německo	305	107	4
Nizozemsko	22396	25540	16398
Rakousko	6	-	-
Tanzánie	-	2	-
Thajsko	18600	11548	7353
USA	1	4	-

Pramen: Celní statistika

Tab. č. 6: Vývoz orchidejí z ČR podle států (v tis. Kč)

Země	Rok 2003	Rok 2004	Rok 2005 do 31.8. 2005
Polsko	-	7	-
Rusko	-	-	1720
Slovensko	38	279	425

Pramen: Celní statistika

V roce 2005 dle vývoje do 31. 8. 2005 dochází k výraznému nárůstu exportu, důvodem je především významný podíl spekulativních reexportů zboží do Ruska.

Tab.č. 7: Výtah z kapitoly 06 celního sazebníku pro dovoz zboží pro rok 2005

KN - kód	Název zboží	Celní sazba pro 3. země	Obchodně politická opatření	
			dovoz	vývoz
0601 2030	Orchideje	9,6%	CITES	CITES
0603 1030	Čerstvé orchideje	(1)	-	-

Pramen: Nařízení Komise (ES) č. 1719/2005, Český integrovaný tarif 2005

Poznámka: (1) od 1.1. do 31.5. = clo 8,5%, od 1.6. do 31.12. = clo 12%, od 1.11. do 31.12. = clo 8,5%

2.4 Generativní množení

Všechny naše druhy orchidejí jsou dokonale uzpůsobeny k pohlavnímu (generativnímu) rozmnožování. Mezi nejčastější způsob opylování patří přenos pylu blanokřídlým hmyzem (včely, vosy, čmeláci) či motýly (můry, lišaji). Některé druhy orchidejí jsou schopny fakultativního samosprašení (JERSÁKOVÁ A KINDLMANN 2004). Cizosprašení a na ně navazující oplodnění cizím pylem je u orchidejí rozšířená forma pohlavního rozmnožování (BUTTLER 2000).

Generativním množením může vznikat zcela nový genotyp i fenotyp a lze jím namnožit rostliny velice rychle (DUŠEK a KŘÍSTEK 1986). Semena orchidejí jsou velmi malá a neobsahují žádné zásobní látky. Klíčení v přirozených podmínkách závisí na kolonizaci houbami rodu *Rhizoctonia*, které dodávají zárodku potřebnou výživu. Jedinec, který se s hyfami příslušné houby nestřetne, je odsouzený k zániku. Proto příroda poskytla orchidejím velký počet semen, dosahujících u některých druhů až miliónových počtů. Existují však také bakterie a parazitické houby, které klíčivost semen inhibují. Semeno má proto ve volné přírodě velice malou šanci na přežití (ZÁKREJS 1980).

2.4.1 Způsoby generativního množení

Generativní množení je možné třemi způsoby:

- 1) výsevem k matečným rostlinám
- 2) symbiotickou metodou
- 3) asymbiotickou metodou

Výsev semene k matečným rostlinám je možný pouze v případě, že substrát obsahuje symbiotickou houbu.

Výsev symbiotický je rovněž opuštěn. Z kořenů orchidejí se nejdříve izoluje čistá kultura a houby a k ní se vysejí semena orchidejí (DUŠEK a KŘÍSTEK 1986). Z hlediska rozmnožování je při této metodě problém s udržováním optimální koncentrace houby (ZÁKREJS 1980). Houba pomůže semenům vyklíčit a dát vznik semenáčům, ale často se zvrhne v parazita a klíčící semena zničí (DUŠEK a KŘÍSTEK 1986). Proto je tato metoda, vycházející z teoretických poznatků o klíčení v přírodě, nevhodná (PROCHÁZKA A VELÍSEK 1983).

Princip asymbiotického způsobu generativního množení orchidejí spočívá na poznatku, že houbu, která pomáhá při klíčení semen a výživě semenáčů, lze nahradit různými chemickými látkami (DUŠEK a KŘÍSTEK 1986). Významný objev učinil v roce 1922 při pokusech s tropickými orchidejemi Američan L. KNUDSON. Dezinfikoval semena a vyséval je do skleněných nádob na agar s minerálními solemi a roztokem maltózy. Dokázal, že ke klíčení není nutná přítomnost houby, ale jen dostatečného množství organických látek. Později bylo zjištěno, že maltózu v živných půdách mohou zastoupit i jiné glycidy (glukóza, fruktóza, sacharóza), které představují v přírodě pro obligátně mykotrofní stádium klíčících orchidejí zdroj uhlíku (PROCHÁZKA A VELÍSEK 1983).

2.5 Vegetativní množení

U četných druhů orchidejí se vyvinula značná schopnost nepohlavního (vegetativního) rozmnožování, která může hrát větší roli než rozmnožování pohlavní (JERSÁKOVÁ A KINDLMANN 2004). Tuto metodu lze používat pouze u orchidejí s oddenkou (PROCHÁZKA 1980). Větvením oddenků se může rozmnožit počet pupenů a výhonků (BUTTLER 2000). Vegetativně namnožené rostliny mají stejný genotyp a fenotyp.

Mikropropagace je *in vitro* metoda vegetativního množení rostlin. V padesátých letech 20. století došlo k světovému objevu – množení orchidejí pomocí explantátů z meristémových pletiv (tzv. meristémové kultury). Autorem byl francouzský fyziolog a virolog J. MOREL. Tato metoda umožnila radikální snížení ceny velkého počtu komerčních kultivarů orchidejí, zejména oceněných klonů (JERSÁKOVÁ A KINDLMANN 2004).

2.5.1 Explantátové kultury rostlin

2.5.1.1 Historie a principy problematiky

Někteří badatelé považují teoretický počátek kultur rostlinných explantátů *in vitro* u německého rostlinného fyziologa KLEBSE (1887), který studoval životní projevy jednotlivých buněk vláknitých řas izolovaných z vlákna plazmatickou macerací. Přitom vyslovil domněnku, že podobné pokusy by se také snad mohly podařit na materiálu z vyšších rostlin semenných (PETRŮ a ŘETOVSKÝ 1956).

RECHINGER (1893) uveřejnil výsledky pokusů s pěstováním fragmentů různých částí rostlin v umělých podmínkách a jako první použil živného roztoku v kulturách *in vitro* (HRADILÍK 2005).

HABERLANDT (1902) dokazoval na základě pokusů, že neexistuje spodní hranice velikosti fragmentu podmiňující růst v kultuře *in vitro* a že bude možné zvolit k pokusům jedinou buňku (PETRŮ a ŘETOVSKÝ 1956).

První dlouhodobé kultury kořenových špiček klíčnic rostlin rajčete se podařily udržet WHITEOVI (1934). Ve stejné době se také WHITEOVI a současně francouzům GAUTHERETOVÍ (1934) a NOBÉCOURTOVI (1937) podařilo úspěšně množit explantátové kultury rostlin.

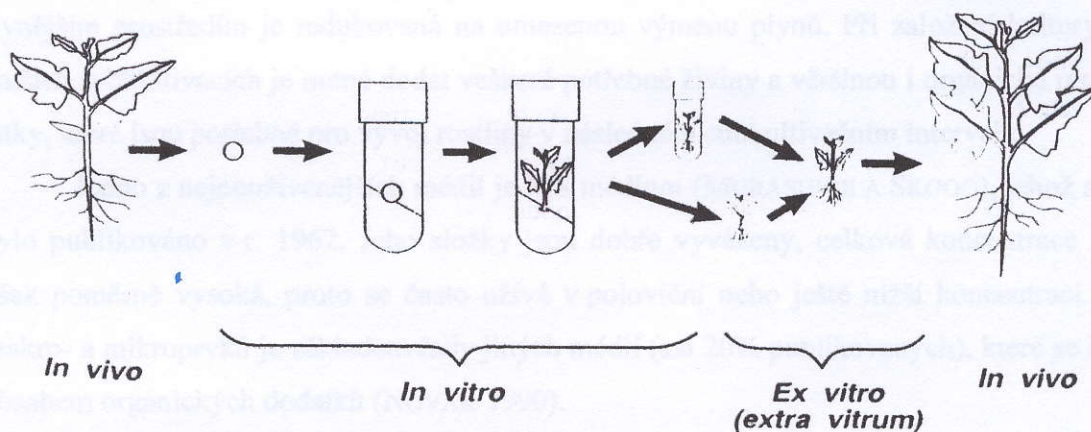
V roce 1985 na vědeckém sympóziu o mikropropagaci uvedl PROF. MURASHIGE, že v roce 1968 byla explantátová technika používána jen asi u třiceti druhů, zatím co o deset let

později to bylo již 300 druhů a za dalších deset let stoupl počet explantovaných rostlin na 3000 druhů. V současnosti počet explantovaných rostlin můžeme odhadovat na 5000 druhů.

Explantací se rozumí aseptická kultivace rostlin, nebo jejich částí v kontrolovaných podmínkách na sterilních živných půdách. Jedná se většinou o části rostlin uměle od celistvé rostliny oddělené a pěstované v podmínkách "*in vitro*", tedy ve skleněné, nebo plastové nádobce (HRADILÍK 2005).

Vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty mohou být krátkodobě kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny. To umožňuje uskutečnění cyklu rostlina – explantát – kultura *in vitro* – organogeneze nebo embryogeneze – intaktní rostlina.

matečná rostlina → explantát → mikropropagace → zakořeňování → aklimatizace → intaktní rostlina



Obr. č. 4: Schéma kultivace *in vitro* (KOVÁČ 1995)

Diferenciace rostlin *in vitro* probíhá v těchto různých systémech:

- 1) organizované struktury – meristémy a zygotická embrya
- 2) diferenciovaná pletiva resp. komplexy pletiv
- 3) pletiva na různém stupni dediferenciace, zejména ve formě kalusu
- 4) izolované buňky a protoplasty

(NOVÁK 1990).

Základní podmínkou úspěšného pěstování rostlinných explantátů *in vitro* je splnění požadavku sterility (RAKOUSKÝ 2000). Z tohoto důvodu je nezbytné zabývat se sterilitou

rostlinného materiálu používaného jako explantát, sterilitou kultivačních médií a sterilitou prostředí, ve kterém jsou tkáňové kultury realizovány. Při nedodržení sterility v některém stupni kultivace dojde ke kontaminaci kultur plísněmi či bakteriemi (KOVÁČ 1995).

2.5.1.2 Výživa explantátových kultur

Pokroky v explantátové technice jsou dány v neposlední řadě i realizací chemických podmínek nutných pro zdárný růst, reprodukci a diferenciaci rostlinné buňky *in vitro*. Fyzikální podmínky a kultivační technika mohou výsledky kultivace podstatně ovlivňovat, neúspěchy však obvykle spadají na vrub nevhodné nebo neúplné živné půdy (RAKOUSKÝ 2000).

2.5.1.2.1 Živná média

V podmínkách *in vitro* žije rostlina v uzavřeném prostoru nádoby a látková výměna s vnějším prostředím je redukována na omezenou výměnu plynů. Při založení kultury a při dalších subkultivacích je nutné dodat veškeré potřebné živiny a většinou i organické regulační látky, které jsou potřebné pro vývoj rostliny v následném subkultivačním intervalu.

Jedno z nejpoužívanějších médií je MS médium (MURASHIGE A SKOOG), jehož složení bylo publikováno v r. 1962. Jeho složky jsou dobře vyváženy, celková koncentrace solí je však poměrně vysoká, proto se často užívá v poloviční nebo ještě nižší koncentraci. Směs makro- a mikroprvků je základem řady jiných médií (asi 20% publikovaných), které se liší jen obsahem organických dodatků (NOVÁK 1990).

Dalšími běžně používanými jsou LINDSMAIER AND SKOOG (1965) (LS), GAMBÓRG ET. AL. (1968) (B5), CHU (1978) (N6), NITSCH AND NITSCH (1969), VPM LLOYD AND MC COWN (1980) (HRADILÍK 2005).

Většina médií byla však vytvářena pro určitý druh orchidejí, a proto klíčení jiných druhů na tomtéž médiu nemusí být úspěšné (DUŠEK A KŘÍSTEK 1986). V dnešní době existují četné komerčně distribuované tekuté či práškové koncentráty živných médií a to nejen tzv. "běžných" typů, ale i mnohých dalších. Jsou dodávány nejen v základní formě (v komponentech je např. zahrnuta jen minerální složka) či úplné formě (včetně cukrů, vitamínů a růstových látek), ale i v mnoha modifikacích a podsložkách, umožňujících poměrně rychlou optimalizaci chemických podmínek kultivace.

2.5.1.2.2 Složky médií

Základními složkami živné půdy jsou:

- a) anorganické látky
- b) organické sloučeniny
- c) chemicky určené směsi látek přírodního původu
- d) interní nosič pro zpevnění půdy

(RAKOUSKÝ 2000).

- **Anorganické látky**

Základní složkou všech médií a zdrojem vodíku a kyslíku je **voda**. Používá se vždy destilovaná (NOVÁK 1990). Rostlinné buňky jsou na kvalitu vody méně citlivé, přesto se pro přípravu živných půd musí používat voda připravená dvoj- až trojnásobnou destilací v aparatuře z tvrdého skla. Doba skladování nemá být dlouhá, neboť i v destilované vodě vegetují kromě řas i některé druhy bakterií (RAKOUSKÝ 2000).

Makroelementy dodávané do kultivačních médií zahrnují šest nejdůležitějších prvků: N, P, K, Ca, Mg a S (KOVÁČ 1995). Dusík se do živných médií dodává ve formě NO_3^{-1} a NH_4^{+1} i vázaný v aminokyselinách. Při nízké teplotě je preferován příjem NH_4^{+1} , což vede k okyselení média a k následnému zvýšení příjmu NO_3^{-1} . Okyselení může způsobit řidnutí médií ztužených agarem (NOVÁK 1990). Nedostatek fosforu v médiu se projeví okamžitě sníženou intenzitou růstu pletivových kultur. Kultury rychle rostoucí nárokují více fosforu než kultury s pomalou proliferací (RAKOUSKÝ 2000). Draslík se do médií dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu v koncentraci 20-30 mM. Optimální koncentrace fosforu, hořčíku, síry a vápníku se pohybuje v rozsahu 1-3 mM (KOVÁČ 1995).

Mezi **mikroelementy** používané pro kultivaci rostlinných explantátů řadíme Fe, které z fyziologického hlediska patří mezi makroelementy, dále pak Mn, Zn, B, Cu, Co a Mb. Koncentrace těchto prvků v živném médiu se pohybuje v rozmezí od 0,1 μM do 100 μM (HRADILÍK 2005).

- **Organické sloučeniny**

Organické sloučeniny jsou součástí živných půd, fungují jednak jako živiny, jednak působí jako faktory, které specifickým způsobem regulují růst a metabolismus pěstované

buňky. Každá půda proto obsahuje vedle značného množství sacharidů i velmi nízké koncentrace fytohormonů (auxinů, cytokininů a giberelinů), vitamínů a aminokyselin (RAKOUSKÝ 2000).

Jako nejčastější **zdroj uhlíku** a energie je používána sacharóza. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů (KOVÁČ 1995).

Vitamíny mohou být pro rostlinné buňky, pletiva nebo orgány limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi nejčastěji používané patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin, myo-inositol, v malých dávkách se někdy přidává i kyselina askorbová (i jako antioxidant), kyselina pantotenová, biotin, kyselina listová a riboflavin (HRADILÍK 2005).

Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Dusík se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát). Velmi často se používá také L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin (KOVÁČ 1995).

Růst, dělení i diferenciaci rostlinné buňky jsou řízeny komplexem činitelů, mezi nimiž zauímají **růstové látky** (fytohormony) klíčové postavení (RAKOUSKÝ 2000). Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová (KOVÁČ 1995).

Auxiny jsou používány především k stimulaci růstu kalusu a buněk, k indukci tvorby adventivních kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu apikálních meristémů. Využívá se např. kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), 2,4-D, NAA. Účinnost uvedených auxinů je různá a je závislá na typu explantátu v růstových podmínkách (HRADILÍK 2005).

Cytokininy jsou potřebné nejen pro indukci kalogeneze, ale též k udržování mitotické aktivity kalusových a suspenzních kultur. Neméně významná je jejich role při vyvolávání morfogenních změn v těchto kulturách. Cytokininy fungují v přítomnosti auxinu (RAKOUSKÝ 2000). Do skupiny cytokininů přidávaných do kultivačních médií patří BAP, kinetik, TDZ, zeatin a také adenin, který sice nevykazuje fytohormonální aktivitu, ale zvyšuje účinnost cytokininů.

Z dostupných **giberelinů** je využíván giberelin GA₃ a GA₇ (HRADILÍK 2005). Gibereliny podporují kvetení, prodlužování stonků a překonávání klidového stádia rostlin

(dormance) semen, pupenů a hlíz (RAKOUSKÝ 2000). Většina explantátů giberelin pro svůj růst v médiu nevyžaduje.

Abcisová kyselina je přidávána výjimečně pro indukci somatických embryí, květní indukci, navození dormance nebo k zbrzdění růstu explantátu (HRADILÍK 2005).

- **Chemicky neurčené směsi látek přírodního původu**

Největšího rozšíření doznalo kokosové mléko, méně se využívá kvasničný a bramborový extrakt, sladový výtažek a kukuřičná voda, případně extrakty z nezralých obilí, především kukuřičných (RAKOUSKÝ 2000). Extrakt z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Použití těchto nedefinovaných směsí je však lépe pokud možno vynechat právě z důvodu jejich nedefinovaného složení. Do médií se také někdy dodává aktivní uhlí. Připisují se mu tři základní funkce v živném médiu: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média (KOVÁČ 1995). Optimální dávka aktivního uhlí v médiu je 0,5-3,0 % (HRADILÍK 2005).

- **Interní nosič pro zpevnění půdy**

Nejčastěji používaným ztužovacím agens je agar. Agar je polysacharid s vysokou molekulovou hmotností. Jedná se o stélky mořské řasy rodu *Gelidium* (ZÁKREJS 1980). Agar má vhodné fyzikální vlastnosti: při pokojové teplotě přijímá značné množství vody, při teplotách kolem 80°C tvoří koloidní roztok, který chladnutím přechází v elastický gel (RAKOUSKÝ 2000).

Tuhost agarového gelu je možné regulovat obsahem agaru v médiu (0,8-1,0 %), druhem agaru a pH média (HRADILÍK 2005).

Kontaminace a skutečnost, že běžné komerční produkty jsou různé kvality, vyžadují, aby před použitím byl běžný vláknitý i mletý agar čištěn. Koncentrace 0,5 až 1,5% v médiu se považuje za optimální (RAKOUSKÝ 2000).

Vedle agaru je možné pevné médium vytvořit pomocí dalších látek jako např. Agarózy, Phytagelu a Gerlite, které se používají v koncentraci 1,25-2,50 g.l⁻¹ (HRADILÍK 2005).

2.5.1.3 Fyzikální podmínky kultivace

Důležité jsou zejména: teplota, světlo, vzdušná vlhkost, aerace a fyzikální stav živné půdy. Běžně se explantátové kultury pěstují při konstantní teplotě, jejíž optimum je určováno typem kultury a genotypem. Pro většinu kalusových a suspenzních kultur je optimum

v rozmezí 24-27°C, pro protoplasty 25-28°C. Růst a morfogenní reakce kultur jsou ovlivněny intenzitou, kvalitou a dobou osvětlení. Relativní vlhkost je velmi důležitá pro kultury *in vitro*. Nejčastěji je atmosféra nad objekty, jež jsou umístěny na agarové půdě nebo vhodném nosiči, sycena pouze odpařováním vody z živné půdy. Protože uzávěry kultivačních nádobek neoddělují hermeticky vnitřní atmosféru od vnější, doporučuje se udržovat relativní vzdušnou vlhkost v kultivační místnosti na hodnotě 80-85% (RAKOUSKÝ 2000).

2.5.1.4 Převod *in vitro* rostlin do půdy

Zakořeňováním *in vivo* se rozumí zakořeňování prýtů odvozených *in vitro* v nesterilních podmínkách na substrátech, jiných než jsou kultivační média. Jedná se o různé umělé půdy popř. porézní materiály. Příkladem mohou být perlit, vermikulit, směsi obsahující písek, rašelinu, čedičová vata atd. Substrát používaný k zakořeňování *in vivo* by měl být slabě kyselé až neutrální, měl by zajišťovat dostatečnou aeraci a měl by mít vysokou vodní kapacitu (KOVÁČ 1995).

Namnožené rostliny je nutno převádět do nesterilních podmínek s mimořádnou péčí. Při převodu do půdy (nesterilních podmínek) jsou rostliny vystaveny abnormálnímu stresu. Samotný převod je proto kritickou fází množení *in vitro*. U většiny převodů je nezbytnou podmínkou převodu přítomnost dostatečně vyvinutého kořenového systému.

Nároky při převodu *in vitro* rostlin do půdy jsou: zpočátku (první dny) – cca 100% vlhkost vzduchu a částečné stínění, adaptace (několik týdnů) – snížení relativní vlhkosti na 70-80%, případně i níže, postupné zvyšování intenzity osvětlení.

Komerční firmy zabývající se masovým množением rostlin obvykle mají k uvedenému účelu speciálně upravené skleníky s programovatelným automatickým režimem stínění, vlhčení, zálivky, osvětlení a teploty. U zavedených technologií převodu bývají ztráty materiálu minimální. Adaptované rostliny jsou do doby distribuce pečlivě kontrolovány a preventivně ošetřovány proti nejzávažnějším škůdcům a patogenům (RAKOUSKÝ 2000).

2.5.1.5 Využití explantátových kultur

Rostlinné explantáty, zejména techniky, které jsou orientovány na mikropropagaci, nacházejí stále širší využití v zahradnické praxi (HRADILÍK 2005). V posledním desetiletí se explantátové kultury rostlin staly nepostradatelnou součástí celé řady biologických oborů

zabývajících se studiem rostlin, využívají se k biotechnickým, fyziologickým, morfologickým a genetickým studiím. V řadě vyspělých zemí se staly nedílnou součástí zemědělské produkce rostlin (KOVÁČ 1995).

Některé specifické rysy mikropropagace:

- rychlé namnožení druhů obtížně množitelných konvenčními postupy
- namnožení nově vyšlechtěných odrůd (často okrasných rostlin) – umožňuje rychlé uvedení velkého počtu jedinců na trh a z ekonomického hlediska rychlý návrat vložených prostředků
- ozdravování rostlin
- ve šlechtění rychlé namnožení vybraných nově vytvořených linií
- možnost zachrany ohrožených planě rostoucích rostlin i cenných genotypů
- nezávisí na ročním období

Ve velkém měřítku jsou asepticky množeny různé druhy: *Anthurium*, *Begonia*, *Gerbera*, *Philodendron*..., četné druhy orchidejí (*Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Vanda*,...) a jejich hybridů, bromelií (*Ananas*, *Dracena*). Úspěšně byly rozpracovány projekty na záchranu některých ohrožených druhů rostlin jako hořců, vstavačů, hmyzožravých druhů, sukulentů atd.

Je třeba si uvědomit, že vegetativní množení *in vitro* je cenově nákladné a stává se rentabilním pouze v případě "ekonomicky zajímavých objektů či aplikací" a masové produkce - často statisíce jedinců (RAKOUSKÝ 2000).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Rostlinný materiál

Pro mikropropagaci *in vitro* byly použity komerčně získané rostliny *Macodes petola* (Bl.) Lindl. a *Erythroides nobilis*. Aby bylo pro práci zajištěno dostatečné množství rostlinného materiálu, byly rostliny předpěstovány do kelímků na podzim v roce 2005. Rostliny byly zasazeny do směsi rašeliny, rašeliníku, perlitu a mulčovací kůry a poté umístěny do skleněného boxu. Teplotu v boxu reguloval termostat na 25-27 °C. Vlhkost vzduchu byla udržována okolo 90% neustálým doplňováním vody na dno boxu.



Obr. č. 5: Předpěstované rostliny ve skleněném boxu



Obr. č. 6: *Macodes petola* a *Erythroides nobilis*

3.2 Příprava živného média

Pro pěstování rostlinného materiálu byly použity čtyři druhy kultivačních médií: AK množivé, AKB množivé s přidavkem banánového extraktu, AK TDZ supermnoživé a NAM kořenící a růstové médium. Základní složkou uvedených médií bylo MS (MURASHIGE a SKOOG 1962) médium v plné nebo 1/2 koncentraci.

Tab. č. 8: Složení média MS (MURASHIGE a SKOOG 1962)

Složky živného média	ml, mg.l ⁻¹ média
NH ₄ NO ₃	1650 mg
KNO ₃	1900 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg
Fe ³⁺ komplexované EDTA	43 mg
Scharóza	30000 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O (zásobní roztok)	2,9 ml
MS-mikroelementy (zásobní roztok)	1 ml
MS-vitamíny (zásobní roztok)	1 ml
KI Jodid draselný	0,83 mg

Zdroj: VOTRUBA M. a kolektiv (1987): Explantátové techniky, VŠZ Praha

AK množivé médium

Tab. č. 9: Standardní složky AK množivého média

Složky živného média	mg.l ⁻¹ média
MS 1/2	
Inositol	100
Glycin	10
Thiamin	5
Pyridoxin	1,667
Adenin sulfát	5
BAP	4,667
NAA	0,467
Scharóza	20000
Glukóza	10000
Maltóza	3333
L-cystein	0,667

Zdroj: VŠ 1998, 2003

Chemické názvy: BAP (benzyladenin), NAA (kys. 1-natylactová)

AKB množivé médium

Ke složkám množivého média AK bylo přidáno 16666,7 mg.l⁻¹ banánového extraktu.

AK TDZ supermnoživé médium

Složky zůstávají stejné jako u AK množivého média, sníží se pouze množství BAP na 2,33 mg.l⁻¹ a navíc médium obsahuje 2,33 mg.l⁻¹ růstového regulátoru TDZ (thidiazuron).

NAM kořenící a růstové médium

Tab. č. 10: Standardní složky NAM kořenícího a růstového média

Složky živného média	mg.l ⁻¹ média
MS (100%)	
Inositol	1500
Glycin	150
Thiamin	75
NAA	50
IAA	25
BAP	5
Scharóza	300000
L-cystein	10
Aktivní uhlí jemné	8000

Zdroj: VŠ 1992

Chemické názvy: NAA (kys. 1-natyloctová) BAP (benzyladenin), IAA (kys. 1-indolyloctová)

3.3 Postup kultivace

1) Před vlastní kultivací byla provedena sterilizace:

a) *prostředí*



Obr. č. 7: Flow-box

Pro dosažení sterilního prostředí byly použity flow-boxy Fatran československé výroby, které postačují pro běžnou práci. Vnitřní strany flow-boxu bylo nutné vytřít desinfekčním roztokem (70% etanol). Box byl spuštěn asi 15 min před zahájením práce, aby došlo k ustálení proudu vzduchu a současně na kultivační prostor působilo UV záření germicidní lampy.



Obr. č. 8: Sušárna

b) nástrojů

Do sušárny byly umístěny laboratorní nástroje potřebné k odběru explantátů (kádinky, Petriho misky, pinzety, preparační jehly, skalpely).

c) destilované vody

Převařená destilovaná voda byla rozlita do kádinek, které byly vysterilizovány v sušárně. Kádinky se ihned překryly Petriho miskami, aby voda nebyla kontaminována mikroorganismy.

2) Preparace rostlinného materiálu

Byl vybrán rostlinný materiál dobré kvality i po stránce zdravotního stavu. Mladý výhon velikosti 5-10 cm byl oddělen ostrým skalpelem od matečné rostliny nebo byla použita celá rostlina. Odebraný materiál byl v nesterilním prostředí umyt vodou a očištěn. Umytá rostlina se přenesla do aseptického boxu, kde se již prováděly veškeré další pracovní úkony. Výhon byl preparován ostrým sterilním skalpelem na několik explantátů tak, aby obsahoval 1-3 listové základy (primordia) a 2-4 viditelné základy listů.



Obr. č. 9: Příprava na preparaci



Obr. č. 10: Vypreparované explantáty

Vypreparované explantáty byly proplachovány v různých dezinfekčních roztocích v závislosti na zvolené metodě kultivace. Sterilovaný explantát musí být zcela ponořen v dezinfekčním roztoku a to nejlépe tak, aby hladina roztoku byla asi 2 cm nad sterilizovaným objektem. Po vyjmutí z dezinfekčního roztoku byl opláchnut 2-3x sterilní destilovanou vodou.



Obr. č. 11: Dezinfekce explantátů v aseptickém prostředí boxu

3) Sterilizace rostlinného materiálu

3.3.1 Možnosti převodu

Pro ověření možnosti kultivace byly vyzkoušeny 4 metody, které byly založeny na uvedeném postupu, ale lišily se v použití dezinfekčních roztoků, v době jejich působení a v použití různých kultivačních médií. U každé metody byly pokusy několikrát opakovány.

metoda I: Dezinfekce 70% etanolem

1. pokus – 17. 1. 06

2 explantáty *Macodes petola* byly ponořeny na 20 sekund do 70 % ETOH a následně opláchnuty ve sterilní destilované vodě. Pak byly explantáty umístěny do skleněných nádobek, na povrch agarového média AK a pečlivě uzavřeny.

2. pokus – 31. 1. 06

K pokusu byl použit 1 explantát rostliny *Erythroides nobilis* a 1 explantát *Macodes petola*. Rostliny byly při tomto pokusu dezinfikovány po dobu 1 minuty v 70% ETOH. Ke kultivaci bylo použito AK množivé médium.

metoda II: Opláchnutí 95% etanol, dezinfekce v destilované vodě se Savem (9:1) + 2-3 kapky smáčedla

1. pokus – 18. 4. 06

V aseptickém prostředí boxu byla celá rostlina *Erythroides nobilis* propláchnuta nejprve v destilované vodě s 2-3 kapkami smáčedla (Jar), pak v samotné destilované vodě, následovalo ponoření na 15 sekund do 95 % etanolu a nakonec opět namočení do destilované vody.

Na Petriho misce byla rostlina rozdělena na 4 explantáty. Každý byl vydezinfikován v roztoku destilované vody se Savem (9:1) s 2-3 kapkami smáčedla. Doba dezinfekce byla postupně prodlužována. 1. explantát byl v roztoku dezinfikován 16 minut, další 18, 19 a poslední 20 minut. Po vyjmutí z roztoku byly explantáty 3x opláchnuty ve sterilní destilované vodě a přeneseny na tuhé AK kultivační médium.

2. pokus – 9. 5. 06

Postup dezinfekce byl stejný jako při 1. pokusu této metody, ale byla použita rostlina *Macodes petola*, z níž byly získány 3 explantáty. Dezinfikovány byly 16, 18 a 20 minut a umístěny na množivé médium AK.

3. pokus – 16. 5. 06

Celkem 8 explantátů bylo dezinfikováno v délce 26, 28, 30 a 32 minut. Ke kultivaci bylo použito AK médium.

metoda III: Opláchnutí 80% etanol, dezinfekce v destilované vodě se Savem (9:1) + 2-3 kapky smáčedla

1. pokus - 30. 5. 06

Celé rostliny *Erythroides nobilis* a *Macodes petola* byly propláchnuty nejprve v destilované vodě s 2-3 kapkami smáčedla, v samotné destilované vodě, poté 15 sekund v 80 % etanolu a nakonec opět v destilované vodě. Následně byla každá rostlina rozdělena na 4 explantáty, takže dohromady vzniklo 8 explantátů. Každý byl namočen do roztoku destilované vody se Savem (9:1) s 2-3 kapkami smáčedla postupně na 32; 33,5; 34,5 a 36 minut. Explantáty byly 3x opláchnuty ve sterilní destilované vodě a umístěny na povrch agarového média AK.

2. pokus – 18. 10. 06

Celkem 11 explantátů bylo postupně dezinfikováno 26, 28, 30, 32, 34 a 36 minut. 5 explantátů bylo kultivováno na množivé médium AK a 6 na růstové (kořenící) NAM médium.

3. pokus – 8. 11. 06

Doba dezinfekce u 8 explantátů se pohybovala od 26 minut do 31 minut. Byly použity AK i NAM média.

metoda IV: Opláchnutí 90% etanol, dezinfekce v destilované vodě se Savem (9:1) + 2-3 kapky smáčedla

1. pokus – 4. 12. 06

Rostliny byly postupně propláchnuty v těchto roztocích:



Obr. č. 13: Oplachovací roztoky

Po preparaci byly vzniklé explantáty dezinfikovány v roztoku destilované vody a Sava (9:1) s 2-3 kapkami smáčedla od 30 do 34 minut. Pro kultivaci bylo použito množící médium AK.

2. pokus – 13. 3. 07

Postup se opakoval, doba dezinfekce byla zvolena od 27 do 35 minut a tentokrát byly pro kultivaci použity supermnoživé médium AK TDZ a množivé s extraktem banánu AKB.

3. pokus – 26. 3. 07

Doba dezinfekce byla prodloužena na 35 až 41 minut. Explantáty byly přeneseny na AK TDZ kultivační médium.

4) Kultivace

Vypreparovaný a dezinfikovaný explantát byl přenesen na tuhé kultivační médium. Během dvou až tří dní se objevila případná infekce, která mohla být důsledkem nedokonalé sterilizace nebo kontaminace. Naopak růst se projevil v průběhu tří týdnů až několika měsíců.



Obr. č. 12: Explantáty na agarovém médiu ve skleněných nádobkách

Připravené, nově založené a uzavřené explantáty byly přeneseny z aseptického boxu do nesterilního prostředí kultivační místnosti, kde byly ponechány při teplotě 25-27°C při zářivkovém osvětlení, nastaveném světelném režimu, intenzitě osvětlení a vysoké vzdušné vlhkosti.

4 VÝSLEDKY

4.1 Metoda I: Dezinfekce 70% etanolem

Cílem metody I bylo ověřit možnost kultivace v podmínkách *in vitro* při dezinfekci rostlinného materiálu 70% etanolem. U 1. pokusu byly 2 explantáty *Macodes petola* ponořeny na 20 sekund do 70% etanolu a při 2. pokusu byla doba sterilizace prodloužena na 1 minutu. Po několika týdenním sledování explantátů umístěných ve skleněných nádobkách na AK množivé médium nebyla zaznamenána kontaminace u žádného z nich, avšak nedošlo ani k jejich růstu.

4.2 Metoda II: Opláchnutí 95% etanol, dezinfekce v destilované vodě se Savem (9:1) + 2-3 kapky smáčedla

Při metodě II byly v jednotlivých pokusech rostliny nejprve postupně oplachovány: destilovaná voda + 2-3 kapky smáčedla → destilovaná voda → 15 sekund v 95% etanolu → destilovaná voda. Po opláchnutí byly dezinfikovány v destilované vodě se Savem (9:1) a s 2-3 kapkami smáčedla, přičemž byla měněna doba působení (tab. č. 11). Ke kultivaci bylo použito AK množivé médium.

Tab. č. 11: Výsledek kultivace podle jednotlivých pokusů u metody II

Pokus	Typ explantátu	Doba působení (minuty)	Kontaminovány	Bez kontaminace
1	<i>Erythroides nobilis</i>	16, 18, 19, 20	19, 20	16, 18
2	<i>Macodes petola</i>	16, 18, 20	20	16, 18
3	<i>Erythroides nobilis</i>	26, 28, 30, 32	26, 32	28, 30
	<i>Macodes petola</i>	26, 28, 30, 32	-	Všechny

4.3 Metoda III: Opláchnutí 80% etanol, dezinfekce v destilované vodě se Savem (9:1) + 2-3 kapky smáčedla

Metoda III byla svým postupem obdobná metodě II, ale při oplachování byl použit méně koncentrovaný 80 % etanol a výrazně byla prodloužena doba dezinfekce. U této metody byly u 2. pokusu využity jako výchozí rostlinný materiál pro kultivaci zkontaminované

(zplesnivělé) explantáty, proto musely být před zahájením vlastní práce důkladně očištěny. Explantáty byly kultivovány na množivé médium AK i na růstové (kořenící) NAM médium.

Tab. č. 12: Výsledek kultivace podle jednotlivých pokusů u metody III

Pokus	Typ explantátu	Doba působení (minuty)	Typ média	Kontaminovány	Bez kontaminace
1	<i>Macodes petola</i>	32; 33,5; 34,5; 36	AK	32	33,5; 34,5; 36
	<i>Erythrodes nobilis</i>	32; 33,5; 34,5; 36		34,5	32; 33,5; 36
2	<i>Macodes petola</i>	30, 34	AK	30, 34	-
		26, 28, 32,	NAM	-	26, 28, 32
	<i>Erythrodes nobilis</i>	26, 28, 30	AK	28, 30	26
		32, 34, 36	NAM	32, 34	36
3	<i>Macodes petola</i>	26	AK	-	26
		28	NAM	-	28
	<i>Erythrodes nobilis</i>	27, 28, 29, 30, 31	AK	Všechny	-
		31	NAM	-	31

4.4 Metoda IV: Opláchnutí 90% etanol, dezinfekce v destilované vodě se Savem (9:1) + 2-3 kapky smáčedla

Při metodě IV byly rostlinné explantáty proplachovány v tomto pořadí:

destilovaná voda + 2-3 kapky smáčedla → destilovaná voda → 15 sekund v 90% etanolu → destilovaná voda. Následovala dezinfekce v destilované vodě se Savem (9:1) a s 2-3 kapkami smáčedla, doba působení byla postupně prodloužena až na 41 minut. Explantáty byly přenášeny na množící AK médium, supermnoživé AK TDZ a množivé s extraktem banánu AKB.

Tab. č. 13: Výsledek kultivace podle jednotlivých pokusů u metody IV

Pokus	Typ explantátu	Doba působení (minuty)	Typ média	Kontaminovány	Bez kontaminace
1	<i>Macodes petola</i>	30, 31, 32, 33, 34	AK	31, 34	30, 32, 33
	<i>Erythrodes nobilis</i>	32, 33, 34		32, 33, 34	-
2	<i>Macodes petola</i>	27, 28, 30, 35	AK TDZ	28, 35	27, 30
		32, 33, 34, 35	AKB	32, 34, 35	33
	<i>Erythrodes nobilis</i>	27, 30	AK TDZ	-	27, 30
		30	AKB	30	-
3	<i>Macodes petola</i>	35, 37, 39, 41	AK TDZ	39	35, 37, 41
		35, 37, 39, 41	AKB	35, 39, 41	37

5 DISKUZE

Cílem předložené diplomové práce bylo ověření možnosti kultivace u tropické orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl. v podmínkách *in vitro*. Testovaná orchidej je vhodným modelovým objektem pro obecné řešení problematiky geneticky ohrožených druhů rostlin, neboť pasivní ochrana je nedostačující. Mikropropagační techniky jsou nejvhodnější použitelnou metodou pro rychlou multiplikaci a zachování cenných genotypů.

Odvození kultury *in vitro* znamená převedení rostlinného materiálu z přirozeného prostředí do sterilních podmínek *in vitro*. Udržení sterilního prostředí je základním předpokladem kultivace a přežívání kultury. Zdrojem infekce mohou být špatně sterilovaná nebo špatně uchovávaná média, nesterilní pracovní nástroje, vzduch a pracovní prostředí při manipulacích s kulturami, pracovník i sám rostlinný materiál. Sterilizace rostlinných explantátů je většinou velmi obtížná, protože na rostlinách rostoucích v přirozeném prostředí bývá zachyceno velké množství plísní a bakterií, které jsou často dosti odolné proti chemickým sterilizačním prostředkům. Stanovení doby působení nutné ke zničení patogenů, aby nedošlo k poškození explantátu, závisí na druhu explantátu.

Pro testování možnosti kultivace byly při výzkumu vyzkoušeny 4 metody, které se lišily v použití dezinfekčních roztoků, v době jejich působení a v použití různých kultivačních médií. U každé metody se pokusy několikrát opakovaly.

U metody I bylo při sterilizaci explantátu *Macodes petola* jako sterilizační agens použito krátké opláchnutí (nejprve 20 sekund a při 2. pokusu 1 minutu) v 70% etanolu. Sterilizaci 70% etanolem doporučují také NORTON A NORTON (1989). PIERIK (1987) uvádí, že více procentní etanol (96%) je příliš koncentrovaný, při jeho použití by došlo k nadměrné dehydrataci pletiva.

Po důkladném opláchnutí 3x ve sterilní destilované vodě ve flow boxu byly explantáty umístěny na agarové živné prostředí AK množivého média, jehož základem je médium sestavené MURASHIGEM A SKOOGEM (MS-médium 1962) pro tkáňové kultury tabáku, bohatého na anorganické látky. Složky MS-média jsou velmi dobře vyváženy, celková koncentrace solí je však poměrně vysoká. Proto se často používá v poloviční nebo ještě nižší koncentraci.

Explantáty byly několik týdnů sledovány, zda nedojde ke kontaminaci. Všechny explantáty byly úspěšně kultivovány, neobjevila se infekce, avšak etanol je až příliš vysušil, rostliny byly spálené a nerostly.

Při metodě II byly v jednotlivých pokusech rostliny nejprve postupně oplachovány: destilovaná voda + 2-3 kapky smáčedla → destilovaná voda → 15 sekund v 95% etanolu → destilovaná voda. Pro kvalitní povrchovou sterilizaci bylo nutné použití smáčedla (Jar), které snižuje povrchové napětí a sterilizační roztok tak lépe proniká k povrchu rostliny (PIERIK, 1987). CHALUPA A DURZAN (1973) uvádějí, že z chemických sterilizačních agens se osvědčili chlornan vápenatý, chlornan sodný, peroxid vodíku a etylalkohol, přičemž nejčastěji se podle nich používá 1,5% chlornan sodný NaClO ve formě komerčního přípravku SAVO nebo chlornan vápenatý $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. VEJSADOVÁ, BUSINSKÝ, ŠEDIVÁ A DOSTÁLEK (2000) doporučují nechat působit aktivní chlór na rostlinný materiál 15-20 minut s přidáním několika kapek smáčedla. Proto byly explantáty po opláchnutí dezinfikovány v destilované vodě se Savem (9:1) a s 2-3 kapkami smáčedla. Doba působení se pohybovala od 16 do 32 minut. Sterilizační činidla je nutno pečlivě odstranit omýtím 2 až 3x sterilní vodou (NORTON A NORTON, 1989). Explantáty pak byly přeneseny na tuhé AK kultivační médium.

Výsledkem kultivace bylo poznání, že kontaminovány byly u 1. a 2. pokusu explantáty, na které působil dezinfekční roztok nejdéle, tzn. při 19 a 20 minutách dezinfekce. 3. experiment byl proveden na 8 explantátech, z nichž byly infikovány pouze 2, a sice při 26 a 32 minutách sterilizace. Kontaminace, ke které došlo celkem u 4 explantátů lze přisoudit na vrub znečištěné sterilované vody, která byla použita k odstranění sterilizačního činidla již u prvních explantátů nebo také samotné práci. Ukázalo se tedy, že metoda II je jednou z možných cest k úspěšné kultivaci orchideje *Macodes petola*.

Metoda III byla svým postupem obdobná předchozí metodě. Pro oplachování byl zvolen méně koncentrovaný 80 % etanol a výrazně byla prodloužena doba dezinfekce. Explantáty byly umístěny na množivé médium AK i na růstové (kořenící) NAM médium. Zakořeňovací média obsahují méně solí než indukční, která podporují růst prýtlů. Podle NORTONA A NORTONA (1989) je v některých případech vhodné použít médium bez makroelementů. Jak uvádí CHALUPA (1975) schopnost buněk vytvářet kořenová primordia závisí na přítomnosti auxinu (IAA), látek fenolického typu a enzymů. Dle SKOOGA (1954) je tvorba kořenů indukována při nízkém poměru cytokininu k auxinu v živném médiu.

Koncentrace cukrů v zakořeňovacím médiu činí obvykle podíl 2-4 % glukózy nebo sacharózy. Explantáty bez přítomnosti cukrů v médiu černají nebo u nich nedochází ke tvorbě kořenů (NORTON A NORTON, 1989). Pro stimulaci tvorby kořenů se do média obvykle přidává aktivní uhlí v koncentraci 600 mg.l⁻¹ (MARKS, 1991). Aktivní uhlí stabilizuje pH (FAST, 1980) a zvyšuje aeraci média (ARDITTI A ERNST, 1984). Způsobuje ztmavnutí média, které stimuluje přirozené prostředí.

Pro 1. pokus bylo použito pouze AK médium. Infekce byla pozorována pouze u 2 testovaných explantátů. Ve 2. a 3. experimentu bylo při práci vyzkoušeno i NAM (růstové a kořenící) médium a jako výchozí rostlinný materiál byly využity zkontaminované (zplsnivělé) explantáty, které musely být důkladně očištěny. Převážná většina vzorků umístěných na AK médium byla kontaminována, naopak explantáty na NAM médiu byly kromě 2 zdravé. Za hlavní příčinu kontaminace byl považován vybraný rostlinný materiál, který byl špatné kvality po stránce zdravotního stavu. Při metodě III byla kontaminace minimální, ale přesto nebyla zaznamenána tvorba kořene. Jak uvádí CHALUPA (1975), k indukci kořenových primordií je pravděpodobně zapotřebí tzv. kofaktoru, jehož působení společně s auxinem může indukovat tvorbu kořenů.

Metoda IV se odlišovala v použití 90% etanolu při oplachování rostlin. Explantáty byly kultivovány na 3 druhy médií: množící AK, supermnoživé AK TDZ a množivé s extraktem banánu AKB. Fytohormon TDZ (thidiazuron) rovněž využívali ve svých pracích např. ETtinger A PREECE (1985), PREECE A IMEL (1991), IAPICHINO A CHEN (1995) a HSIA A KORBAN (1997). Nejhojnější regenerace byla pozorována právě na médiu s přídavkem TDZ.

STUDNÍČKA (1984) doporučuje jiný způsob povrchové dezinfekce explantátů, a sice roztokem, který se připraví smícháním 1 litru vody s 200 mg jodu a 400 mg jodidu draselného a přidáním několika kapek smáčedla, při době dezinfekce 20 minut. Tato metoda nebyla na *Macodes petola* vyzkoušena.

Někteří autoři podpořili regeneraci listových explantátů střídáním intenzity osvětlení (HSIA A KORBAN, 1998; ECONOMON A READ, 1988; VEJSADOVÁ, 1997) nebo působením určité teploty na kultivované explantáty (NORTON A NORTON, 1989; HSIA A KORBAN, 1989; MERTENS ET AL., 1996). Tyto varianty nebyly při práci testovány.

6 ZÁVĚR

Kultivace a rozmnožování orchidejí metodou „*in vitro*“ patří nepochybně mezi progresivní biotechnologické metody, které již v minulosti umožnily v rámci komerční sféry saturovat poptávku po těchto atraktivních rostlinách a zároveň do určité míry chránit jejich ohrožené přírodní zdroje. Pěstování některých druhů pomocí rostlinných explantátů je z technologického hlediska již velmi dobře zvládnuto, u jiných druhů jsou metody převodu a kultivace teprve hledány.

Cílem práce bylo ověřit některé možnosti převodu rostlin orchideje *Macodes petola* (Bl.) Lindl. na agarové médium a jejich reakci na různé složení tohoto média. Tohoto cíle bylo dosaženo pouze částečně. Ačkoliv byla nalezena vhodná doba sterilizace rostlin v použitém sterilizačním činidle, která zabránila kontaminaci vložených explantátů, došlo zřejmě zároveň i k poškození citlivých pletiv rostliny. Rostliny v kultivačních nádobách nebyly tedy napadeny žádným infektans, na druhou stranu však ani po poměrně dlouhé době sledování nevykázaly zřetelné známky růstu bez ohledu na složení použitého média z hlediska obsahu fytohormonů a řada z nich postupně nekrotizovala. Určitý vliv mohlo mít i použité vybavení laboratoře, které i při použití flow-boxů nemohlo zcela garantovat absolutní sterilitu okolního prostředí při převodu rostlin na agar. Pro orchideje rodu *Macodes* a podobné rostliny se značně nesmáčivým povrchem a jemnými pletivy budou zřejmě vhodnější metody sterilizace využívající např. bromových par, nebo desinfekčních účinků jódu a jeho sloučenin. Tyto metody však v průběhu práce nebyly zkoušeny.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- ARDITTI, J., ERNST, R. 1984: Physiology of germinating orchid seeds. In: Orchid biology. Rewies and perspectives III., J. Arditti (eds.) Ithaca. USA: Cornell University Press, pp. 197-200.
- BALOUNOVÁ Z., RAJCHARD J. (2001): *Macodes petola* (Bl.) Lindl., ekologie a kultivace. Interorchid 2001, sborník referátů z mezinárodní konference, Brno 16. 3. - 17. 3. 2001, s. 89 - 94.
- BUTTLER K. P. (2000): Orchideje – Planě rostoucí druhy a poddruhy Evropy, Přední Asie a severní Afriky. Ikar, Praha.
- DUŠEK J., KRÍSTEK J. (1986): Orchideje – Academia Praha.
- DYKJOVÁ D. (2003): Ekologie středoevropských orchidejí. České Budějovice: Biologická fakulta Jihočeské univerzity.
- ECONOMON, A. S. – READ, P. E.: Azalea regeneration from callus culture Acta Horticultural, 226, 1988, s. 209-216.
- FAST, G. 1980: Vermehrung und Anzucht. In: Fast, G. (ed.) Orchideenkultur, Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen. Stuttgart: Ulmer. Pp. 207-223.
- GOTHARDOVÁ J. (1992): Pěstujeme orchideje – MK Plus/Brno.
- HRADILÍK J. (2005): Rostlinné explantáty – MZLU Brno.
- HSIA C. N., KORBAN S. S. (1998): Effect of growth regulators, dark treatment and light intensity on shoot organogenesis from leaf tissues of evergreen azalea. – J. Hort. Sci. Biotechno., 73: 53-60.
- CHALUPA V.: Tkáňové kultury lesních dřevin. Lesnictví, 1975, 5-84, ÚVTI, Praha). (SKOOG, F.: Chemical regulations of growth in plants. In: Dynamics of growth processes, 1954: 148-182.
- CHALUPA V., DURZAN D. J.: Growth and development of resting buds of conifers in vitro. Canad. Jour. Forest Res., 1973, 196-208.
- JATIOVÁ M., ŠMITÁK J. (1996): Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a ve Slezsku. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky.
- JERSÁKOVÁ J., KINDLMANN P. (2004): Zásady péče o orchidejová stanoviště.
- KOVÁČ J. (1995): Explantátové kultury rostlin – Univerzita Palackého, přírodovědecká fakulta, Olomouc.
- MARKS, T. R.: Rhododendron cuttings. Improved rooting following rejuvenation *in vitro*. Journal of Horticultural Science, 66, 1991, č. 1, s. 103-111.
- MERTENS et al.: *In vitro* regeneration of evergreen Azalla from leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45, 1996, s. 231-236.
- MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ ČR (2005): Situační a výhledová zpráva – Okrasné rostliny.
- MUŽÍK V. (1992): Orchideje pro každého – Základy pěstování exotických orchidejí v bytě a

na zahradě. Nakladatelství Květ ČZS.

- NORTON, C. R., - NORTON, M. E.:** Rhododendrons. Biotechnology in agriculture and forestry 5. Springer-Verlag Berlín, 1989, s. 428-451.
- NOVÁK F. J. (1990):** Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. – Academia Praha.
- PETRŮ E., ŘETOVSKÝ R. (1956):** Rostlinné explantáty – Nakladatelství Československé Akademie věd, Praha.
- PIERIK, R.L.M.:** In vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers Boston, 1987.
- POTŮČEK O., ČAČKO L. (1996):** Všechno o orchidejích. – Slovart s. r. o., Praha.
- PROCHÁZKA F. (1980):** Naše orchideje. – Krajské muzeum východních Čech, Pardubice.
- PROCHÁZKA F., VELÍSEK V. (1983):** Orchideje naší přírody – Academia, Praha.
- RAKOUSKÝ S. (2000):** Rostlinné explantáty – texty přednášek a návody cvičení. České Budějovice: Biologická fakulta Jihočeské univerzity.
- RICHTER W. (1965):** ...die schönsten aber sind ORCHIDEEN. Knihovna ekonomické fakulty VŠZ, Č. Budějovice.
- RITTERSHAUSEN W., OAKLEY G. & D., SUTHERLAND N. (1995):** Orchideje – Pěstování, aranžování.
- STUDNIČKA M. (1984):** Masožravé rostliny – Academia, Praha.
- SYROVÁTKA T. (datum neznámé):** Snadné pěstování květin, zeleniny a hub pro každého.
- VEJSADOVÁ, H.:** Regeneration of Rhododendron L. from excised leaves in vitro. Biological and Technical development in Horticulture, s. 363. Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, 1997.
- VEJSADOVÁ H., BUSINSKÝ R., ŠEDIVÁ J., DOSTÁLEK J. (2000) -** Zachování genových zdrojů ohroženého druhu Pinus rotundata Link a jeho reprodukce metodou in vitro).
- VOTRUBA M. a kolektiv (1987):** Explantátové techniky (pro biotechnology a šlechtitele), VŠZ Praha.
- ZÁKREJS J. (1980):** Orchidey. – Příroda, Bratislava.
- <http://vanilka.navajo.cz>, 5.3. 2007
- <http://www.cloudsorchids.com>, 5. 3. 2007
- <http://orchidlady.com>, 2. 4. 2007
- <http://i25.photobucket.com>, 2. 4. 2007
- <http://encyklopedie.seznam.cz>, 10. 4. 2007
- www.zoopraha.cz, 5. 3. 2007