



Agronomická  
fakulta

Mendelova  
univerzita  
v Brně



**Srovnání asymbiotických kultur *in vitro* zástupců rodu**  
***Cypripedium***  
Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. Helena Vlašínová, Ph.D.

*Vypracoval:*  
Martin Vetter

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Srovnání asymbiotických kultur *in vitro* zástupců rodu *Cypripedium* vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 29. 4. 2015

.....

Martin Vetter

## **PODĚKOVÁNÍ**

Upřímně děkuji paní Ing. Heleně Vlašínové, PhD., za všestrannou, ochotnou pomoc při vedení mé práce a cenné rady, které mi pomohly k jejímu vypracování. Další poděkování patří paní laborantce Martině Jůzové, za pomoc při práci v laboratoři a za příjemné pracovní prostředí. Děkuji rovněž panu Ing. Jiřímu Obdržálkovi, CsC., který mi poskytl semena orchidejí ze svých sbírek a dodal mi tak potřebný materiál pro pokusy.

## **ABSTRAKT**

Martin Vetter: Srovnání asymbiotických kultur *in vitro* zástupců rodu *Cyripedium*.

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou asymbiotických výsevů *in vitro* u rodu *Cyripedium*. Jsou zde shrnuty informace o rodu *Cyripedium* včetně charakteristiky vysévaných druhů. Je zde řešeno složení kultivačních médií pro asymbiotické výsevy, vliv kinetinu a 6-benzylaminopurinu na klíčivost a vliv přidaných organických složek, jako jsou endosperm z kokosových ořechů, kvasniční extrakt a mrkvový extrakt. S asymbiotickými výsevy se rovněž váže problematika sterility prostředí a metodika povrchové sterilizace semen rodu *Cyripedium*, která zároveň slouží k vyplavení látek, inhibujících klíčení. Výsledky by měly přispět k rozšíření metodiky pro asymbiotické výsevy o vliv použitých složek organického původu na klíčivost a vývoj protokormů u studovaných druhů rodu *Cyripedium*.

**Klíčová slova:** *Cyripedium*, *in vitro* kultivace, asymbiotický výsev, povrchová sterilizace semen

## **ABSTRACT**

Martin Vetter: Comparing asymbiotic cultures *in vitro* species of the genus *Cyripedium*.

The bachelor thesis deals with asymbiotic sowing *in vitro* in the genus *Cyripedium*. There are completed information about the genus *Cyripedium* including the characteristics of sown species. There is solved composition of culture media for asymbiotic sowing influence of kinetin and 6-benzylaminopurine to germination and influence of added organic constituents such as coconut endosperm, yeast extract and carrot extract. With asymbiotic sowing also binds problems of sterility environment and methodology of surface sterilization of *Cyripedium* seeds. This treatment is also important for removing of germination inhibiting substance. The results should contribute to enhancing the methodology of asymbiotic sowing and the influence of organic ingredients used for germination and protocorm development in the studied species of the genus *Cyripedium*.

**Key words:** *Cyripedium*, *in vitro* cultivation, asymbiotic sowing, surface sterilization of seeds

## OBSAH

1	ÚVOD.....	7
1.1	cíl práce .....	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	9
2.1	Morfologie a biologie orchidejí .....	9
2.1.1	Způsob růstu orchidejí dle typu stanoviště .....	9
2.1.2	Způsob růstu orchidejí dle dělení stonku .....	11
2.2	Rod <i>Cypripedium</i> .....	11
2.2.1	Historie.....	11
2.2.2	Taxonomické zařazení rodu <i>Cypripedium</i> .....	12
2.2.3	Morfologie a biologie rodu <i>Cypripedium</i> .....	13
2.3	Charakteristika vysévaných druhů rodu <i>Cypripedium</i> .....	16
2.3.1	<i>Cypripedium reginae</i> .....	16
2.3.2	<i>Cypripedium fasciolatum</i> .....	17
2.3.3	<i>Cypripedium flavum</i> .....	17
2.3.4	<i>Cypripedium macranthos</i> .....	18
2.4	Mykorrhiza.....	20
2.4.1	Definice mykorrhizy .....	20
2.4.2	Orchideoidní mykorrhiza .....	20
2.4.3	Klíčení semen orchidejí a vliv mykorrhizy.....	21
2.5	Vegetativní rozmnožování orchidejí .....	22
2.5.1	Řízkování .....	22
2.5.2	Oddělování dceřiných rostlin.....	22
2.5.3	Dělení trsů.....	22
2.6	Generativní rozmnožování .....	23
2.6.1	Umělé opylení rostlin na přirozeném stanovišti .....	23
2.6.2	Umělé opylení s dozráním semen v laboratoři .....	24
2.7	<i>In vitro</i> kultivace .....	24
2.7.1	Symbiotické výsevy <i>in vitro</i> .....	24
2.7.2	Asymbiotické výsevy <i>in vitro</i> .....	25
2.8	Kultivační média pro asymbiotické výsevy .....	25
2.8.1	Komponenty kultivačních médií.....	25
2.8.2	Sterilizace médií .....	29

3	MATERIÁL A METODIKA .....	31
3.1	Rostlinný materiál .....	31
3.2	Uchovávání semen .....	31
3.3	Povrchová sterilizace semen .....	31
3.3.1	Použití desinfekčních roztoků.....	32
3.3.2	Vlastní postup při povrchové sterilizaci .....	32
3.4	Výsevy na jaře roku 2014 .....	33
3.4.1	Cíl výsevů .....	33
3.4.2	Rostlinný materiál.....	33
3.4.3	Použitá média.....	33
3.4.4	Příprava média .....	34
3.4.5	Výsev semen .....	35
3.4.6	Kultivace semen.....	35
3.5	Výsevy na podzim 2014.....	37
3.5.1	Cíl výsevů .....	37
3.5.2	Rostlinný materiál.....	37
3.5.3	Použitá média.....	37
3.5.4	Příprava médií.....	38
3.5.5	Výsev semen .....	40
3.5.6	Kultivace semen.....	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
4.1	Povrchová sterilizace semen .....	41
4.2	Výsev jaro 2014 .....	42
4.3	Výsev podzim 2014.....	43
5	ZÁVĚR.....	47
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	48
6.1	Online publikace .....	50
6.2	Zdroje obrázků .....	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	52
8	SEZNAM TABULEK .....	53
9	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	54
10	PŘÍLOHY .....	55
10.1	Seznam příloh.....	55

# 1 ÚVOD

Navzdory zvukomalebnosti je původ názvu čeledi *Orchidaceae* poněkud přízemní. Pochází totiž z řeckého slova *Orchis*, což znamená v překladu varle. Tohoto tvaru jsou totiž podzemní hlízy rodu *Orchis*, v češtině vstavač, a v dobách dávno minulých se věřilo v afrodisiakální účinky této rostliny, právě na mužskou potenci. Z toho důvodu zní i český název, pro čeleď *Orchidaceae*, symbolicky, tedy vstavačovitě.

V dnešní době jsou orchideje zapsány na seznamu ohrožených a kriticky ohrožených druhů a mezinárodně chráněny. Některé druhy jsou již registrovány jako vyhynulé. Důvodů jejich úbytku z přirozených lokalit je více.

Nebyly to jen údajné afrodisiakální účinky, ale i hospodářské využití některých zástupců této čeledi, ku příkladu rod *Vanilla*, a především postupná přeměna původních přírodních biotopů díky zvětšujícím se zemědělským plochám, přeměně luk a úbytku přirozených lesních porostů výměnou za lesy kulturní, či plochy odlesněné. Nesmím opomenout ani zvyšující se oblibu těchto rostlin jako rostlin, které nesmí chybět na našich zahradách.

Aby se zabránilo drancování zbylých přírodních lokalit, začalo se přemýšlet nad způsobem, jakým orchideje lidem dodat, ale neodebrat je z přírody, a zároveň je moci i zpětně dosazovat na jejich původní lokality.

Postupem času se vyvinulo několik metod, využívaných jak na produkci komerční, tak při záchranných programech. Jde především o *in vitro* kultury, tedy pěstování za uměle vytvořených podmínek, ve sterilním prostředí kultivačních nádob, v kultivačních místnostech. Existují zde různé způsoby kultivace, díky symbiotickým výsevům, asymbiotickým výsevům a kulturám vzniklých *Ex plantare*, tedy množением z celých orgánů, či částí rostlin.

Dnes se dostávají do popředí chladnomilné terestrické střešníky z oblastí Severní Ameriky a z hornatých oblastí Číny, které právě díky jejich odolnosti vůči nižším teplotám lze pěstovat i v našich podmínkách. Ve své práci se proto věnuji právě kultivaci rodu *Cypripedium* při asymbiotických výsevech, protože díky absenci houbového symbionta je nutné upravit kultivační médium tak, aby obsahovalo všechny látky, které v přírodě rostlině dodává symbiotická houba, což u některých druhů doposud činí potíže.

## **1.1 cíl práce**

Zpracováním dostupné literatury o studovaných druzích rodu *Cypripedium* a prostudováním aspektů, týkajících se asymbiotických výsevů, se pokusit optimalizovat kultivační médium pro klíčení semen, vybraných zástupců rodu *Cypripedium*, bez mykorrhizní symbiózy.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Morfologie a biologie orchidejí

Čeleď *Orchidaceae* patří z hlediska vývoje k nejmladším v rostlinné říši. Aby obstály v konkurenčním boji mezi ostatními rostlinnými druhy, musely svůj způsob života i stavbu přizpůsobit podmínkám prostředí.

Většina z orchidejí se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech. Na rozdíl od orchidejí, vyskytujících se v mírném pásmu, se jedná převážně o epifytické druhy. Na území České Republiky rostou zase výhradně terestrické druhy (Martiško a Martišková, 2012).

#### 2.1.1 Způsob růstu orchidejí dle typu stanoviště

Orchideje lze rozdělit podle různých kritérií. Nejčastěji se však uvádí jejich rozdělení do skupin na základě toho, na jakém stanovišti se nacházejí. Jsou to: epifytické, litofytické, podzemní, saprofytické a terestrické (Nash a La Croix, 2007).

##### 2.1.1.1 Epifytické orchideje

Většina epifytických orchidejí roste v horních patrech tropických lesů. Ke svému přežití vyžadují oblasti bez mrazu (Ježek, 2010).

Rostou přichycené svými kořeny na nějakém pevném podkladu, který je tvořen nejčastěji kmeny a větvemi stromů. Nejedná se o parazity, Kořeny nepronikají do pletiv hostitele. Jsou silné, hladké, dlouhé, bílo-stříbrné barvy a jejich povrch tvoří velamen.

Velamen je několik vrstev mrtvých buněk, chrání rostlinu před vysušením. Slouží i k nasávání vody a jako opora. Nasáklý vodou pak tvoří tlustou, průhlednou vrstvu, díky čemuž přes něj proniká světlo až k povrchovým buňkám kořene, které obsahují chlorofyl. Proto se kořeny takto jeví, jako zelené. Díky přítomnosti chlorofylových buněk pak v kořenech probíhá fotosyntéza (Röllke, 2007).

Rostlina také využívá mikroklimatu, které jí hostitel může nabídnout. Je to z důvodu rozdílné potřeby slunečního světla, tepla, či vlhka. Podle toho, v jakém prostředí se rostliny vyvinuly (Šafránková a kol., 2013).

### **2.1.1.2 Litofytické orchideje**

Litofytické druhy orchidejí rostou na exponovaných skalách, kamenech či ve skalnatých oblastech.

Jedná se o přechodný typ mezi epifytickými a terestrickými druhy. Jejich kořeny, taktéž pokryté velamenem, jsou zapuštěné do skalních puklin a ukryté před přímým slunečním světlem se tak brání před nadměrnou ztrátou vody. Živiny pak musí získávat z okolního mechu, dešťové vody, jiných organických zbytků, zachycených na kamenech, či vlastních již odumřelých pletiv.

Další způsob obrany proti slunečním paprskům je červená pigmentace rostlin a tuhé listy, rostoucí vzhůru (Nash a La Croix, 2007).

Nash a La Croix (2007) také uvádějí, že litofytické druhy orchidejí vznikly sekundárně, z původních epifytických druhů. Podle Zouna (2008), vznikly litofytické druhy orchidejí nejen z epifytických, ale i původně terestrických druhů.

### **2.1.1.3 Podzemní orchideje**

Jedná se o rostliny, které rostou skoro celé pod zemí a pouze jejich některé květy se objevují nad úrovní povrchu země (Nash a La Croix, 2007). Procházka (1980) k tomuto uvádí, že některé druhy orchidejí pod povrchem země nejen rostou, ale i kvetou.

### **2.1.1.4 Saprofytické orchideje**

Saprofytické orchideje jsou vlastně podskupina terestrických orchidejí, které neobsahují chlorofyl. Nazývány jsou pak také jako mykotrofní. Tyto orchideje mají mykorhizní vztah k určitým druhům hub, jejichž prostřednictvím přijímají výživu a energii z odumřelých částí organické hmoty (Zoun, 2008).

### **2.1.1.5 Terestrické orchideje**

Vyvinuly se v oblastech, kde bylo dostatek prostoru ve spodních patrech vegetace. Jejich kořeny rostou zapuštěny v půdě a z ní také získávají většinu potřebných živin.

Dle Zouna v tropických oblastech rostou terestrické orchideje v lehčích půdách smíchaných s lesním humusem. Jejich kořeny jsou tedy silnější a mají i husté kořenové vlášení.

Většina terestrických orchidejí mírného pásu roste ve středně těžkých a těžkých půdách. Jejich kořeny jsou proto tenké, svazčité a barvy hnědé (Zoun, 2009).

Růst terestrických druhů orchidejí je také nejvíce spojen s mykorrhizní symbiózou, o které se blíže mluví v kapitole 2.4 této práce.

Nepříznivé období roku, a s tím spojené období vegetačního klidu, pomáhá přežít terestrickým orchidejím fakt, že jejich kořeny také bývají často metamorfovány v hlízy. Stonky mohou být přeměněny v pahlízy, které fungují jako zásobárna živin a vody (Zoun, 2008).

## **2.1.2 Způsob růstu orchidejí dle dělení stonku**

Růst stonku u orchidejí se obecně dělí na monopodiální růst a sympodiální růst.

### **2.1.2.1 Monopodiální dělení stonku**

Monopodiální dělení je vývojově starší, rostliny mají pouze jeden stonek a nové části přirůstají vždy pouze jedním směrem (Ježek, 2010). Listy na monopodiálních stoncích rostou proti sobě. Stonek u těchto orchidejí bývá krátký, prodloužený či popínavý (Röllke, 2007).

### **2.1.2.2 Sympodiální dělení stonku**

Sympodiálně rostoucí stonek nemá jednu dělicí se pahlízu, ale více rovnocenných pahlíz. Ty mají různou velikost a tvar. Listy rostou po celé délce či jen na vrcholu. Nepříznivé období roku přežívá rostlina shozením listů z pahlíz. Nové pahlízy pak vyrůstají z pupenů těch starých (Zoun, 2009).

## **2.2 Rod *Cypripedium***

### **2.2.1 Historie**

Původ jména *Cypripedium* je podle ostrova Kypr, na němž se podle mytologie narodila bohyně Afrodita (či Venuše), a také podle latinského *pedilum*, což v překladu znamená dámský střevíc.

Jako první použil název *Cypripedium* roku 1737 německý botanik Carl von Linné, ve své knize *Flora Laponica*. Hovořil zde o evropském druhu *Cypripedium foliis ovatolanceolatis*. Později, roku 1753 popsal a pojmenoval další dva druhy *Cypripedium calceolus* a *Cypripedium bulbosum*. Myslel tím nejen v Evropě nejznámější střevíčník pantoflíček (*Cypripedium calceolus*), ale i druhy ze Severní Ameriky, nyní již známé jako *Cypripedium parviflorum*, *Cypripedium acaule* a *Cypripedium guttatum* (Cribb, 1997).

Linné však nebyl první, kdo se zabýval popisem střevíčníků. Již roku 1561 Conrad Gessner, ve své knize *Horti Germaniae* hovoří o: „*Alismatis species, ut quidam putant, Calceolus diuae virginis vulgo dicitus...*“ První ilustraci pak roku 1568 ve své knize *Florum, et coroniararium odoratarumque nonnullarum herbarium historia* publikoval Rembert Dodoens a jednalo se o kompletní nákres jednokvětého střevíčnicku *Cypripedium calceolus*, včetně kořenů (Cribb, 1997).

Dle Cribba (1997), prvním, kdo spojil rod *Cypripedium* s orchidějemi, byl John Parkinson, když roku 1629 nedaleko hranic Yorkshiru, v Anglii, vyséval do přírody *Cypripedium calceolus* a zároveň jako první popsal jeho semena jako: „Very small, very like unto the seede of the Orchides or Satyrions, and contained in such like long pods, but bigger.“ Do třídy Orchideje ovšem střevíčnický formálně zařadil až botanik Michel Adanson roku 1763 (Cribb, 1997).

### 2.2.2 Taxonomické zařazení rodu *Cypripedium*

Zařazení střevíčníků do systému rostlin je z hlediska jeho vývoje uvnitř třídy *Orchidaceae* velmi složité a systematika jednotlivých druhů bývá často přepracována. Během posledních sta let se zařazením střevíčníků zabývalo hned několik botaniků (Eccarius, 2009). Proto pro přehlednost a jasnost uvádím jen souhrn tohoto vývoje.

Po Linném přišel roku 1840 John Lindley, který, jakožto největší odborník na orchideje své doby, rod *Cypripedium* rozdělil na sekce (Eccarius, 2009).

V roce 1854 H. G. Reichenbach zavedl samostatný rod *Selenipedium*. Sem řadil některé tropické americké druhy střevíčníků (Cribb, 1997). Podtřída *Cypripedioideae*, kterou od roku 1831, kdy ji zavedl český botanik V. F. Kosteletzky, reprezentoval jen rod *Cypripedium*, se tím rozrostla. R. A. Rolfe následně oddělil od rodu *Cypripedium* další rod, *Phragmipedium*.

Rolfe, ani Lindley následně přestali dělit čeleď *Orchidaceae* na podčeledě, ale namísto nich používali skupiny (Tribus), což se dnes bere jako stupeň mezi podčeledí a rodem. Od roku 1896 Rolfe rozlišoval rody *Selenipedium*, *Phragmipedium*, *Cypripedium*, *Paphilopedilum* (Eccarius, 2009).

F. W. L. Kraenzelin, Berlínský gymnaziální profesor, roku 1901 všechny vzniklé rody opět spojil do jednoho, protože považoval za nelogické, aby rostliny, které dle jeho názoru měly monotónní vzhled, byly v různých rodech. Rozdělil však rod *Cypripedium*

na 6 sekcí, 5 podsekcí, které ještě někdy rozdělil na série, a do každé rozepsal tehdy známé druhy střevíčníků.

Již roku 1903 však přišel E. H. H. Pfitzer s dalším rozdělením, kdy rod *Cypripedium* rozdělil primárně na 3 série, které dále členil na sekce, podsekce a v nich jednotlivé druhy.

Další výrazná změna přišla roku 1973, kdy F. G. Brieger rod *Cypripedium* rozdělil na 6 podrodů a v podrodech vytvořil ještě skupiny.

Sching-Chi Chen však v roce 1987 přišel s další strukturou, tentokrát opět s rozdělením na sekce, podsekce a jednotlivé druhy (Eccarius, 2009).

Dle Cribba (1997) lze rod *Cypripedium* rozdělit na 11 sekcí:

*Subtropicum*, *Irapeana*, *Obtusipetala*, *Retinervia*, *Cypripedium* (2 podsekce-*Cypripedium*, *Macrantha*), *Enantiopedilum*, *Arietinum*, *Flabellinervia*, *Acaulia*, *Bifolia*, *Trigonopedia*.

Pánové Pridgeon, Cribb a Rasmussen pak v roce 1999 převzali rozdělení třídy *Orchidaceae* dle Dresslera (1981), který v ní vytvořil 5 podtříd, a v podtřídě *Cypripedioideae* rozčlenili dalších 5 rodů. Byly to rody: *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Mexipedium*, *Selenipedium* (Eccarius, 2009).

Eccarius (2009) rod *Cypripedium* rozděluje na podrod *Cypripedium* se sekcemi *Cypripedium*, *Acaulia*, *Arietinum*, *Bifolia*, *Enantiopedilum*, *Flabellinervia*, *Macrantha*, *Retinervia*, *Sinopedilum*, *Trigonopedia* a na podrod *Irapeana* se sekcemi *Irapeana*, *Obtusiflora*, *Subtropica*.

U nás se můžeme v praxi setkat s několika posledními členěními, pro úplnost dodávám, že pan J. Zákrejs ve své knize *Orchidey* (1980) hovoří o podčeledi *Cypripedioideae*, která se člení na dvě skupiny: 1. *Apostasieae* s rody *Apostasia*, a *Neuwiedia* a 2. *Cypripedieae* s rody *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmopedilum* a *Selenipedium* (Zákrejs, 1980).

### 2.2.3 Morfologie a biologie rodu *Cypripedium*

Střevíčníky patří mezi terestrické orchideje. Rostou nejčastěji na místech bez přímého slunečního svitu, od prosvětlených po stinné oblasti. *Cypripedium tibeticum* může růst i na přímém slunci, v kontrastu s např. *Cypripedium acaule*, který zase roste jen v hlubokém stínu.

Nejčastěji se jedná o okraje lesů, jako jsou dubohabřiny, květnaté a okroticové bučiny, vzácně i suťové lesy. Rostou však i na lučních stanovištích, jako jsou vlhčí širokolisté trávníky, střídavě vlhké bezkolencové louky a další oblasti s mírně vlhkou, přes léto i vysychající půdou (Cribb, 1997).

Všechny střešníky mírného pásu rostou v oblastech se střídáním teplot a ročních období. Proto na jaře vyrůstají z pupenů rašících na podzemních oddencích, od začátku do půlky léta kvetou a semena dozrávají na podzim. Zimní období přetrvávají v dormantním stavu s našetřenými zásobami v podzemních oddencích. Jde o vytrvalou, dlouhověkovou bylinu, která může žít i několik desetiletí (Cribb, 1997).

Pokud necháme jejich semena dozrát, nevyklíčí nám díky přítomnosti inhibičních látek do doby, než projdou procesem vernalizace. Tato část, kdy na semeno působí chladné teploty, se dá uměle navodit působením nízkých teplot v chladničce, po dobu dvou až čtyř měsíců (Cribb, 1997).

Další možností je inhibiční látky, za pomoci kombinace působení 70% ethanolu a 7% roztoku chlornanu vápenatého, vymýt ze semínka během povrchové sterilizace, čemuž se blíže věnuji v kapitole 3.3 této práce. Při výsevu nám pak pomohou i růstové regulátory (Vejsadová, 2006).

Při ideálních podmínkách nám vyklíčené semeno vyrostе v kvetoucí rostlinu za dobu zhruba tři let. Obvyklá je však doba pěti let. Je to zhruba stejný čas, po který trvá střešníkům ve volné přírodě, než začnou kvést. Ve starší literatuře se můžeme dočíst i o době 12 let. Jedná se však jen o odhady, nezaložené na výsledcích kultivačních pokusů (Cribb, 1997).

### **2.2.3.1 Kořeny**

Jejich hnědé, svazčité kořeny, mají bílou kořenovou špičku a jsou vždy zapuštěny do substrátu. *Cypripedia* nemají vzdušné kořeny.

Funkce kořenů jsou uchycení rostliny k podkladu či v substrátu. Důležitý je také příjem vody a živin, ale i jejich ukládání v zásobních orgánech (Šafránková a kol., 2013).

Zajímavý je fakt, že z oddenku dospělých střešníků vyrůstají i kořeny bez mykorhizy a dospělá rostlina je na houbové symbióze mnohem méně závislá, až

nezávislá, protože látky, získávané mykorrhizou, si dovede syntetizovat díky fotosyntéze sama (Dykyjová, 2003).

### **2.2.3.2 Stonek**

Střevičníky mají vzpřímenou lodyhu, dosahující různé výšky, dle druhu, avšak nejčastěji v rozmezí 15-85 cm. Bývá buď lysá, či různoměrně ochlupená, ale vždy je bohatě pokryta listy. Na konci lodyhy roste nejčastěji po jednom až dvou květech (Eccarius, 2009).

### **2.2.3.3 Listy**

Listy střevičníků jsou vždy celokrajné, velikostně od pár centimetrů, až po 1 metr. Rostou po celé délce lodyhy. Tvarem jsou kopinaté, obvejčité až vejčité, některé mohou být redukovány v úzkou listovou pochvu. Mají rovnoběžnou žilnatinu a mohou být u některých druhů pokryty chloupky (Cribb, 1997).

### **2.2.3.4 Květy**

Tvar pysku a srostlých spodních sepalů u všech zástupců rodu *Cypripedium* připomíná střevíc. Tímto se ostře vzhledově ohraničují od ostatních Orchidejí.

Avšak stejně jako u ostatních druhů orchidejí, jsou zrcadlově souměrné, podle jedné osy, mají 3 vnější okvětní lístky (*sepaly*) a 3 vnitřní (*petaly*).

Souborné označení, které se pro ně používá jsou pak *tepaly*. Jedná se však o nesprávné označení, protože těmito slovy se označují okvětní lístky dvouděložných rostlin, kde se liší i morfologicky. U Orchidejí se však *sepalů* a *petalů* používá běžně, kvůli ulehčení popisu květů (Dušek a Křístek, 1986).

Vnější lístky jsou uspořádány do trojúhelníku a vytváří svým tvarem krásné obrazce. Z vnitřních lístků je pak jeden, většinou ten prostřední, přeměněn v nápadný pysk (*labellum*).

Uprostřed květu, nad pyskem, se nachází sloupek (*kolumna*), který nese bliznu a prašníky.

Semeník je spodní a tvořen 3 plodolisty. U téměř všech orchidejí se v průběhu vývoje květu otáčí o 180°. Část květu, která se zdá být dolním pyskem, je ve skutečnosti pyskem horním (Charles L. Argue, 2011).

## 2.3 Charakteristika vysévaných druhů rodu *Cypripedium*

### 2.3.1 *Cypripedium reginae*

Jedna z nejatraktivnějších orchidejí v rodě, přezdívána též „The Queen“, nebo „Showy lady’s slipper orchid“. Kvůli svému atraktivnímu vzhledu je ve volné přírodě drancována, což má za následek postupné zmenšování oblastí jejího výskytu. Roste v jižní a jihovýchodní části Kanady a na severozápadě U.S.A., v nadmořských výškách do 500 metrů.

Úspěšné výsledky její kultivace se datují do roku 1731, kdy ji Philip Miller zasadil v Chelsea. V Evropě ovšem byla známa již daleko dříve, roku 1635 ji jako *Calceolus marianus canadensis* pojmenoval J. P. Cornut (Cribb, 1997).

Rostlina je 35-85 cm vysoká, vzpřímená a její lodyha i listy jsou hustě pokryté chloupky. Vyrůstá z krátkého tmavého rhizomu a tvoří trsy. Listy mají silné žilkování, jsou vejčitého tvaru o šířce 6-15 cm a dorůstají délky 10-24 cm.

Kvete v období od května do srpna, velkými působivými květy, které se na rostlině nejčastěji vyskytují po jednom, ojediněle po dvou až čtyřech. Jsou bílé a jejich pysk má nádech do růžova, přičemž existují i čistě bílé formy květů (Cribb, 1997).



Obrázek 1, *Cypripedium reginae*

zdroj: <http://www.planteck.com/ben/wp-content/uploads/2011/01/Cyp-reginae007.jpg>



### 2.3.2 *Cypripedium fasciolatum*

Rostlina se přirozeně vyskytuje v Číně, avšak pouze v oblastech Sichuan a Hubei v nadmořských výškách 1650-2500 metrů. Objevena byla francouzským misionářem otcem Fargesem roku 1894 (Cribb, 1997).

Jedná se o terestrickou orchidej s velkými žlutými nepříjemně vonícími květy, na jejichž baňatém pysku jsou tmavě červené tečky.

Rostlina dorůstá výšky 30-45 cm, Roste vzpřímeně, na lodyze je 6 listů, přičemž spodní bývá redukován v úzkou pochvu. Horní tři listy jsou oválné až zakulacené 8-17,3 cm dlouhé a 4,5-11,5 cm široké.

Kvete v období od dubna do začátku června a na každé rostlině bývá jeden, či ojediněle dva květy. Spolu s americkou orchidejí *Cypripedium kentuckiense* mají největší květy z rodu (Cribb, 1997).



Obrázek 2, *Cypripedium fasciolatum*

zdroj: [http://www.floralpin.de/images/cypripedium-fasciolatum-06\\_1.jpg](http://www.floralpin.de/images/cypripedium-fasciolatum-06_1.jpg)

### 2.3.3 *Cypripedium flavum*

Objevení tohoto střevíčníku se připisuje dalšímu z francouzských misionářů, otcem Davidem, v oblasti západního Sichuanu, v Číně roku 1869.

Jde o jeden z nejrozšířenějších druhů střevíčníků, vyskytujících se v pohoří západní a jihozápadní Číny v nadmořských výškách 2700-3700 metrů na mírně zastíněných stanovištích.

Je však zajímavé, že mimo Čínu je tato orchidej relativně málo známá (Cribb, 1997).

Rostlina, s osamocenými či shluknutými, vzpřímenými a krátce ochlupenými olistěnými stonky, je vysoká 17-60 cm. Má krátké, či delší, tmavé kořeny.

Listy rostou pravidelně rozmístěné po celé délce lodyhy a to po 6-10 kusech. Jsou dlouhé 9-17,5 cm a široké 4,2-12 cm, krátce ochlupené na obou stranách.

Kvete světlou, máslově žlutou barvou a mívá na zadní straně sepalů, petalů i pysku červené skvrnky (Cribb, 1997).



Obrázek 3, *Cyripedium flavum*

zdroj:

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/98/Cyripedium\\_flavum\\_Orchi\\_010.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/98/Cyripedium_flavum_Orchi_010.jpg)

#### **2.3.4 *Cyripedium macranthos***

Rostlina je charakteristická svým velkým fialovým či tmavě růžovým pyskem, vzácně se vyskytujícím i v bílé formě. Ta je pak nazývána *Cyripedium macranthos albiflorum*.

Lodyhu má vzpřímenou, 15-40 cm vysokou a olistěnou 3-5 listy vejčitého tvaru, dlouhými 10-14 cm a širokými 4-6,5 cm. Na konci lodyhy je vždy jeden květ, jehož sepaly i petaly mají žilkování zbarvené tmavším odstínem fialové, než je zbytek květu.

Výskyt této rostliny je poměrně širší, od evropské části Ruska, přes jižní část Sibíře, Kamčatku, Sakhalin Island, Koreu, Severovýchodní Čínu, Japonsko až po Taiwan. Roste na vlhkých stanovištích a v polostínu, od luk přes křoviny až po lesy často na svažitém terénu a na návrších. Vyskytuje se do nadmořské výšky 2400 metrů (Cribb, 1997).

*Cypripedium macranthos* var. *hotei-atsumorianum* je další z forem tohoto střevíčníku, pojmenovaná podle budhistického boha štěstí a spokojenosti, Hotei. Nachází se v oblastech poblíž japonského Nagana a má výrazně tmavě fialový květ (Eccarius, 2009).

Další z druhu *Cypripedium macranthos*, se kterým jsem pracoval, byla verze z lokality Arshan u Bajkalu, na internetu nazývaná obchodníky podle této oblasti *Cypripedium macranthos* Arshan. Avšak v odborné literatuře se o žádné takové speciální formě nehovoří.



Obrázek 4, *Cypripedium macranthos*  
zdroj: <http://www.cypripedium.cz/Images/cyps/macranthos0.jpg>

## 2.4 Mykorrhiza

### 2.4.1 Definice mykorrhizy

Mykorrhiza je asociace kořenů vyšších rostlin s myceliem půdních hub. Často bývá označována jako symbióza (Charles L. Argue, 2011). Obecně se vyskytuje přibližně u 90% všech rostlinných druhů na naší planetě. Rozvoj houbového symbionta je zaměřen pouze na primární kořenovou kůru, mykorrhizní houby se nikdy nerozrůstají ve středním válci s cévními svazky (Mejstřík, 1988).

### 2.4.2 Orchideoidní mykorrhiza

Jedná se o jeden z typů endomykorrhizní symbiozy a celkově jde o evolučně nejmladší ze všech mykorrhizních symbióz. U žádné další čeledi, kromě *Orchidaceae*, tento druh mykorrhizy pozorován nebyl (Sally, 2010).

Transport sacharidů je zcela opačný, než u ostatních mykorrhizních symbióz, a to z houby do hostitele. Tím se tento druh mykorrhizy zásadně fyziologicky odlišuje, protože standardně probíhá transport sacharidů z hostitele do hyf symbionta (Mejstřík, 1988).

Symbiotické houby jsou nejčastěji z třídy *Basidiomycetes*, méně často pak z třídy *Ascomycetes* a pro jiné rostlinné druhy mohou být patogenní (Gryndler a kol., 2004).

Orchideoidní mykorrhizu poprvé popsali na začátku 20. století pánové Bernard a Burgeff (1909). Jimi popsána morfologická forma byla tzv. tolypofágie. Tato forma je nejrozšířenější a v minulosti se výzkum věnoval zejména jí. Později byla popsána i daleko vzácnější, tzv. ptyofágní forma orchideoidní mykorrhizy (Burgeff, 1936), jenž je zatím pozorována jen u několika málo tropických druhů orchidejí (například rod *Gastrodia*) a znalosti o ní prozatím nejsou velké (Klepetková, 2006).

Hlavní rozdíl mezi tolypofágním a ptyofágním morfotypem je ve způsobu růstu hyf.

Zatímco u ptyofágní formy prorůstají jednotlivé hyfy buňkami kořene, u tolypofágní formy vytváří hyfy uvnitř buněk klubička, tzv. pelotony.

Pelotony se vyskytují ve všech vývojových stádiích rostliny a dochází v nich ke zprostředkování výměny živin mezi hostitelem a symbiontem. Po určité době podlehnou degradaci. Důvody degradace však nebyly doposud objasněny (Gryndler a kol., 2004).

### 2.4.3 Klíčení semen orchidejí a vliv mykorrhizy

Semena orchidejí jsou redukována pouze na nepatrné embryo, chráněné osemením bez zásobních látek. Velikostně jsou do 1 mm. Díky své velikosti blízké prachové částici se mohou velmi dobře šířit prostředím pomocí větru. Protože však obsahují jen velmi málo živin, nemůže se z nich vyvinout zárodek, dokud nezíská z okolního prostředí dostatek energie, kterou získávají právě prostřednictvím mykorrhizní symbiózy.

Všechny druhy orchidejí musí při klíčení nejprve procházet vývojovým stádiem protokormu.

Jako první s tímto termínem přišel Melchior Treub v roce 1890. U orchidejí jej použil Noël Bernard mezi léty 1899 a 1910. Označoval tím malé kulovité, hlízám podobné útvary, tvořené klíčením semen orchidejí. Termín protokorm se nesmí používat pro označení podobných subjektů, vzniklých z explantátů, či jiných tkáňových kultur *in vitro*.

Pro útvary, vzniklé z explantátů a tkáňových kultur či kalusu se používá termín „protocorm-like body“, psáno zkratkou PLB. Název vytvořil George Morel roku 1960 (Arditti, 2009).

Protokorm vzniká postupným bobtnáním semene, kdy zvětšující se embryo protrhne obalové vrstvy. Jde o kulovitý útvar bílé barvy, ze kterého postupně vyrůstají drobné rhizoidy a postupně vytvoří první pravé orgány rostliny.

Stádium protokormu bývá u jednotlivých druhů různě dlouhé, avšak žádná z orchidejí nemůže v tomto období asimilovat. Během této fáze vývoje musí dojít k infekci houbou, která bude následně předávat rostlině sacharidy, aby mohla pokračovat ve vývoji a v růstu (Mejstřík, 1988).

K infekci rostliny houbou dochází z půdy. Hyfy pak prorůstají epidermis kořenů a jako hostitelské buňky jim slouží korové buňky parenchymu.

V průběhu růstu orchideje se její vztah s houbovými symbionty mění. Zatímco během klíčení jsou orchideje na houbě zcela závislé a čerpají z nich veškeré živiny, z důvodu absence vlastního asimilačního aparátu, v průběhu dospívání se tato závislost zmenšuje a rostlina z hyf čerpá pouze některé minerální látky, či se na mykorrhize stává zcela nezávislá (Mejstřík 1988).

Existují také orchideje, které jsou na mykorrhizní symbióze závislé po celý život. Jedná se o skupinu saprofytických orchidejí, jako například *Neottia nidus-avis* (Dušek a Křístek, 1986).

## **2.5 Vegetativní rozmnožování orchidejí**

Vegetativní rozmnožování orchidejí je jejich rozmnožování nepohlavní cestou a to několika způsoby. Řízkováním, oddělováním dceřiných rostlinek a dělením trsů (Zoun, 2009).

### **2.5.1 Řízkování**

Klasické stonkové či vrcholové řízky jsou dle Zouna (2009) použitelné jen u několika druhů orchidejí, jako například *Dendrobium*.

Nejčastěji při řízkování ze spících pupenů oddělené části vyroste nová rostlina, nebo řízek zapustí kořeny a jeho nadzemní část pokračuje v růstu.

Abychom zajistili dostatečný růst kořenů, je vhodnější použít méně výživný a vzdušnější substrát. Nedostatek živin pak rostlinu donutí vytvořit větší kořenový systém.

Nově vytvořený řízek kvůli absenci kořenů je silně vázán na vzdušnou vlhkost. Z toho důvodu je nutné zajistit vlhké prostředí. Za tímto účelem se nejčastěji používá mikrotenových sáčků, či přenosných inkubačních skleníků, nebo uzavřených akvárií (Zoun, 2009).

### **2.5.2 Oddělování dceřiných rostlin**

Dceřiné rostliny jsou odnože vytvořené na stoncích, pahlízách, či květenství starších rostlin. Většinou mají vytvořený kořenový systém a lze je tak snadno odlomit a zasadit do substrátu stejného složení, jako rostliny mateční. Získáme tak rovnou dospělou rostlinu (Zoun, 2009).

### **2.5.3 Dělení trsů**

Některé druhy orchidejí vytvářejí nové odnože z pupenů na oddencích, kořenech a na bázi starších pahlíz. Ze začátku s mateční rostlinou pevně spjaté odnože postupem času vytvoří kořeny a jsou tak plně soběstačné. V tento moment je lze opět oddělit od mateční rostliny a samostatně zasadit.

Je však nutné zajistit, aby nový oddenek měl dostatek vlastních kořenů a nedošlo k poškození rostliny mateční. Počet pahlíz, či listových růžic, na tomto odděleném kusu by měl být v rozmezí minimálně 3-5, aby se zajistila dostatečná vitalita rostliny a její schopnost dalšího růstu a vývoje.

Oddělením pouze jedné pahlízy, či starých pahlíz bez listů a kořenů, dochází k tomu, že veškerá energie této oddělené části rostliny jde do tvorby vegetativních částí a zpozdí se tím tvorba květů, popřípadě se vůbec nevzpamatují a odumřou (Zoun, 2009).

## **2.6 Generativní rozmnožování**

Generativní množení orchidejí je časově mnohem náročnější. Rostlina produkuje velké množství semen, které však rovněž potřebují ke svému vyklíčení symbiotickou houbu, z důvodu absence výživových látek v endospermu.

V přírodě tedy nejčastěji ze semen orchideje klíčí v blízkosti mateřské rostliny, kde je přítomnost symbiotických hub spolehlivá.

Jelikož většina orchidejí jsou rostliny cizosprašné, doporučuje se pro spolehlivé opylení a tvorbu klíčivých semen opylovat pylem z jiné rostliny. Po určité době od opylení se vytvoří na rostlině semeník, který má tvar tří až šestihranné tobolky. Ten v době plné zralosti praskne a semena se začnou volně sypat ven. Mají žlutavou, či hnědou barvu. (Zoun, 2009).

Dle Vlašínové (1988), se při umělém opylování používá dvou postupů, jak získat semena v potřebném stupni zralosti.

### **2.6.1 Umělé opylení rostlin na přirozeném stanovišti**

Předpokladem zachycení co největší variability v rámci populace se opylování provádí způsobem, kdy každý květ opylíme pylem z jiné rostliny. Pyl odebíráme z rostlin nacházejících se v různých částech lokality, nikoliv z rostlin v blízkosti rostliny opylované.

Následně se opylené rostliny nenápadně označí štítkem, aby bylo zřejmé, které semeníky byly opyleny za účelem sběru a z jaké rostliny pyl pocházel.

Následnými terénními kontrolami pak sledujeme, jak semeníky zrají a v potřebnou dobu je můžeme sklízet (Vlašínová, 1988).

## 2.6.2 Umělé opylení s dozráním semen v laboratoři

Druhou možností, jak získat semena orchidejí je rostlinu odříznout a přenést do laboratoře. Seřízneme konec lodyhy a nadbytečné listy. Poté se umístí rostlina do sklenice s destilovanou vodou.

Aby se podpořil vývoj semeníků, je dobré ponechat jen některé květy a horní část květenství úplně odstranit.

Výhodou této metody je možnost sledovat stav vývoje semeníků mnohem jednodušeji, než neustále navštěvovat přírodní lokality, a vyšet tak semena v optimální době zralosti. Problémem však je snadná možnost kontaminace rostliny a samotný fakt, že musíme rostlinu fyzicky odebrat z prostředí (Vlašínová, 1988).

## 2.7 *In vitro* kultivace

Kultivace *in vitro* je velmi důležitou metodou při záchranných programech po celém světě. (McKendrick, 2000).

Na rozdíl od přírodních podmínek, mají v laboratorních podmínkách všechna semena stejnou šanci na vyklíčení, protože jim můžeme zajistit ideální klimatické podmínky, a také dodat dostatek živin, pomocí přípravy vhodných kultivačních médií (Ježek, 2010).

### 2.7.1 Symbiotické výsevy *in vitro*

Aplikací houbových endofytů do médií můžeme účinně stimulovat klíčivost a další růst rostlin. Díky mykorrhizním houbám se proces růstu také výrazně zrychlí a převod rostlin do podmínek *ex vitro* je mnohem snazší, než při asymbiotickém výsevu. Rostliny totiž díky již vzniklé symbióze s houbami mají větší pravděpodobnost přežití.

Média, připravená pro symbiotické výsevy obsahují jako zdroj uhlíkatých látek i nerozpustné polysacharidy, jako celulóza, či škrob. Tyhle polysacharidy slouží k růstu mykorrhizní houby, která následně mykoheterotrofně vyživuje klíčící orchidej.

Problematické ovšem může být udržet vztah obou symbiontů v rovnováze a optimalizovat podmínky tak, aby houba protokormy orchidejí nepřerostla, protože tím dojde k jejich zahubení (Dušek a Křístek, 1986). Vliv mykorrhizní symbiózy na klíčící semeno byl popsán v kapitole 2.4.3 této práce.



### 2.7.2 Asymbiotické výsevy *in vitro*

Asymbiotické výsevy orchidejí jsou výsevy v *in vitro* podmínkách a jedná se o jejich kultivaci ze semínek na médiu bez přirozeného houbového symbionta. Kvůli absenci symbiotických hub je důležité správné složení kultivačního média (McKendrick, 2000).

## 2.8 Kultivační média pro asymbiotické výsevy

Principem tvorby kultivačních médií, pro aseptické asymbiotické výsevy, je snaha dodat klíčovému semenům orchidejí veškeré látky, které v přírodě získávají od symbiotických hub (Dušek a Křístek, 1986).

### 2.8.1 Komponenty kultivačních médií

Součástí živných půd pro asymbiotické výsevy jsou anorganické i organické látky, z nichž jsou nejdůležitější cukry, zejména glukóza a sacharóza, dále minerální látky a látky hormonální, jako růstové regulátory, a látky vitamínové povahy (Dušek a Křístek, 1986).

Aby byla uměle připravená látka tuhá, přidává se do ní agar, což je gel, získaný z mořské řasy (Ježek, 2010).

#### 2.8.1.1 Makroelementy

Šest nejdůležitějších minerálních prvků, čili dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a železo, musí být obsaženo ve všech kultivačních médiích, protože rostlina je ke svému správnému růstu a vývoji potřebuje ve větším množství. Rostlinám jsou dodávány nejčastěji ve formě solí (Arditti, 2009).

#### Dusík (N)

Dusík potřebuje rostlina pro tvorbu vegetačních orgánů. Jako anorganický se dodává se do média ve formě amoniakální ( $\text{NH}_4^+$ ) nebo nitrátové ( $\text{NO}_3^-$ ), (Hradilík, 2005).

Rychlost, s jakou rostliny dusík přijímají, se lineárně odvíjí na základě přítomnosti, či absence cukru v médiu. Rychleji také přijímají amoniakální dusík (Arditti, 2009). O dusíku v jeho organické formě bude pojednáno dále.

### Fosfor (P)

Tento prvek se do médií obecně přidává ve formách fosfátových, či amonných solí, avšak v nepříliš vysokých koncentracích (Arditti, 2009).

Podílí se na pochodech v buňkách, zejména na tvorbě energeticky využitelných sloučenin (Dušek a Křístek, 1986). Dle Ardittiho (2009) se do médií přidává kombinace dvou různých fosfátových solí jako pufru. Jako první tohoto využil Hans Burgeff (1936). Avšak dodnes není prokázáno, že by pufrování médií pro klíčení semen, pomocí fosfátových solí bylo nezbytné (Arditti, 2009).

### Vápník (Ca)

Ionty vápníku se mohou občas vysrážet v médiu ve formě fosfátových solí. Tento fakt je nejspíše způsoben tím, že hlízy a semena orchidejí samy o sobě z média čerpají, a samy obsahují, jen velmi malé množství vápníku, takže se nadbytek vysráží právě formou fosfátových solí (Arditti, 1967).

### Hořčík (Mg)

Přítomnost hořčíku v kultivačním médiu je nezbytná zejména v pozdějších fázích kultivace, kdy se podílí na správné tvorbě chlorofylu (Dušek a Křístek, 1986).

### Draslík (K)

Draslík je důležitý pro vyrovnávání osmotického tlaku a bobtnání plazmy. V pozdějších fázích má vliv na správnou tvorbu květů a činnost fotosyntézy (Dušek a Křístek, 1986).

### Železo (Fe)

Železo, dodávané do médií formou chelátu v zásobním roztoku, má vliv na aktivaci enzymů a metabolismus rostlin (Dušek a Křístek, 1986).

#### **2.8.1.2 Mikroelementy**

Základní mikroprvky v kultivačních médiích jsou mangan, zinek, bór, měď, kobalt, a molybden (Hradilík, 2005). Mikroelementy jsou nazývány z toho důvodu, že rostlina je ke svému růstu sice potřebuje, avšak v mnohem menším množství, než makroprvky (Arditti, 2009).

### **2.8.1.3 Zdroj uhlíku a energie**

Klíčící semena orchidejí neobsahují chlorofyl a z toho důvodu je nutné mít v médiu dostatek zdrojů energie a uhlíku pro jejich heterotrofní výživu. Nejčastějším komponentem je glukóza, sacharóza či fruktóza (Dušek a Křístek, 1986).

Sacharóza je teplem při sterilizaci v autoklávu částečně rozkládána na glukózu a fruktózu, což nám umožňuje použít při přípravě média více sacharózy, nedostává-li se nám samotné glukózy.

Právě přítomnost cukrů v médiu však umožňuje při špatně provedené sterilizaci rychlé rozmnožení nežádoucích mikroorganismů (Hradilík, 2005).

### **2.8.1.4 Vitamíny**

Celkové množství vitamínů, přidaných do médií ke kultivaci orchidejí, není doposud přesně stanoveno a u jednotlivých médií se jejich počet a množství liší.

Většina médií však obsahuje niacin (kyselina nikotinová), pyridoxin a thiamin. V menším množství se pak do některých médií přidávají i biotin, kyselina pantothenová, kyselina listová a jiné.

Každý vitamín má svou specifickou úlohu při klíčení semen i při následné kultivaci klíčících rostlin a nelze je vzájemně zaměňovat. Při nedostatku vitamínů pak může dojít ke zpomalení růstu, či jeho úplné inhibici (Arditti, 2009).

### **2.8.1.5 Zdroje organického dusíku a aminokyseliny**

Operativním zdrojem dusíku, který může klíčící rostlina snadno a rychle využít, jsou aminokyseliny. Ve vyšších koncentracích však mohou růst inhibovat.

Nejpoužívanější aminokyselinou v médiích pro kultivaci orchidejí je pak glycin, jelikož je součástí média připraveného dle Murashige a Skoog (1962).

Neznamená to však, že by ostatní aminokyseliny v médiích obsaženy nebyly, jen nejsou přítomny v takové koncentraci.

Chceme-li aminokyseliny z média vynechat, měli bychom postupovat uvážlivě a připravit si speciální verzi média zvlášť, protože nevíme, jaké to bude mít následky.

V případě přidávání aminokyselin do média je třeba mít také nastudovanou problematiku jejich tepelné degradace a sterilizaci média pak řešit případnou kombinací autoklávování a studené filtrace (Arditti, 2009).

Hydrolyzát kaseinu, či jiné bílkovinné hydrolyzáty, pak také fungují jako zdroj organického dusíku (Hradilík, 2005).

#### **2.8.1.6 Ostatní organické složky médií**

Složka, která pozitivně ovlivňuje růst a prodlužuje dobu, kdy je nutné klíčit rostlinu přemístit na jiné médium, je aktivní uhlí. Důležitá je jeho absorpční schopnost, kdy absorbuje různé fenolické látky, které klíčití rostlina produkuje a jejichž oxidační produkty jsou pro ni toxické.

Do skupiny ostatních organických složek pak patří i kvasniční extrakt, sladový extrakt, kokosové mléko, homogenáty z banánů, rajčatová šťáva, mrkvová šťáva a jiné (Hradilík, 2005).

Kokosové mléko je vlastně tekutý endosperm kokosových ořechů a v médiích pro výsev orchidejí bylo poprvé použito roku 1951 panem Mariatem. V množství do 2% z objemu média má stimulační účinky na klíčení semen, zejména na proliferaci protokormů, avšak protokormy bývají nažloutlé. Při vyšších koncentracích pak spíše klíčení inhibuje, či způsobí ztrátu vitality semen. Někteří vědci tvrdí, že účinnost endospermu z kokosových ořechů spočívá v přítomnosti cytokininu zeatinu (Arditti, 2009).

Jelikož v našich podmínkách se tekutý endosperm z nezralých kokosových ořechů shání velice obtížně, bývá nahrazován kokosovým mlékem z ořechů zralých, což jsem učinil i během své práce.

Pro svůj stimulační účinek na klíčení semen orchidejí bývá využívána u některých druhů i rajčatová šťáva, ta však konkrétně u rodu *Cypripedium* žádné účinky na indukcii klíčení dle Ardittiho (1967) nemá.

Kvasniční extrakt obsahuje širokou škálu vitamínů skupiny B, z nichž mají některé klíčový vliv na vývoj protokormu (Arditti, 2009).

#### **2.8.1.7 Růstové regulátory**

Fytohormony jsou rostlinné hormony, které každá rostlina přirozeně produkuje v jedné části a transportuje do druhé části. Zde pak vyvolají fyziologickou odpověď. Fyziologická odpověď bývá ve formě stimulačních, či inhibičních účinků.

Látky obdobných účinků, jako fytohormony, jsou růstové regulátory. Rozdíl mezi těmito skupinami je ten, že růstové regulátory jsou látky uměle syntetizované

a přidávané do médií, aby se navodily obdobné účinky, jako mají nativní fytohormony. Obojí se však shrnuje do jednotlivých skupin jako auxiny, cytokininy, giberiliny a další, v závislosti na svém účinku (Pandey a Sinha, 2009).

#### 6-Benzylaminopurin (BAP)

Jedná se o jeden z nejpoužívanějších syntetických cytokininů, za účelem indukce tvorby prýtu a navození buněčného dělení při klíčení semen.

#### Kinetin (6-furfurylaminopurin)

Kinetin taktéž není obecně přijímán jako cytokinin, přirozeně se vyskytující v rostlinách (Pandey a Sinha, 2009). Má obdobné účinky, jako BAP.

#### **2.8.1.8 Látky pro zpevnění médií**

Rozpuštěné minerální a organické složky média je třeba převést do pevného stavu, aby mohly být použity pro výsev. Stabilizační složkou je pak nejčastěji agar, získaný z vláken mořských řas.

Ztuhnutím média zajistíme, že vysetá semena zůstanou na jeho povrchu a budou tak mít i kontakt se vzduchem

Kromě agaru se při přípravě médií jako jeho zpevňující složky používají i látky jako agaróza, phytigel a Gelrite (Hradilík, 2005).

#### **2.8.2 Sterilizace médií**

Nezbytnou součástí aseptických výsevů je dokonalá sterilita všech používaných nástrojů, kultivačních nádob, médií i povrchu samotných semen.

Kultivační média díky svému vysokému obsahu živin velice snadno podléhají různým kontaminacím. Abychom tomu zabránili, je nutné zajistit jejich sterilitu pomocí sterilizace v autoklávu.

Po určitý čas (obvykle 15-20 minut) je vystavíme vysokým teplotám (121°C) a určitému tlaku (105 kPa), což zničí všechny vegetativní i generativní formy mikroorganismů, které se v médiu potenciálně mohou vyskytovat (McKendrick, 2000).

Nemáme-li k dispozici autokláv, je možné kultivační nádoby sterilizovat v zavařovacím či tlakovém hrnci, kdy proces působení vysoké teploty a tlaku po 48 hodinách opakujeme ještě jednou (Dušek a Křístek, 1986).

### **2.8.2.1 Sterilní prostředí pro výsev**

Problematika sterilního prostředí je v současné době řešena pomocí aseptických laminárních boxů, zvaných též „flow box“. Zařízení filtruje nasávaný vzduch a zbavuje jej tak mikroorganismů i spor. Takto upravený vzduch pak proudí horizontálně ve směru ven z boxu, čímž omývá pracovní plochu a zabraňuje tak přístupu mikroorganismů z okolního prostoru.

Před zahájením práce v laminárním boxu je nutné nechat po určitý čas, zhruba 15 minut, působit UV záření a následně box desinfikovat roztokem 70% ethanolu. Díky tomu můžeme v boxu pracovat s rostlinným materiálem téměř bez rizika kontaminace. (Hradilík 2005).

## **3 MATERIÁL A METODIKA**

### **3.1 Rostlinný materiál**

Pro své vysévací pokusy jsem používal semena terestrických orchidejí rodu *Cypripedium*. Konkrétně se jednalo o druhy: *Cypripedium reginae*, ze semínek rostlin zakoupených od dvou různých firem a označených dle nich jako *Cypripedium reginae (Vermont)* a *Cypripedium reginae (Van Tubergeen)*. Dále se jednalo o druhy *Cypripedium flavum*, *Cypripedium fasciolatum*, *Cypripedium macranthos* ve formách *macranthos*, *macranthos-albiflorum*, *macranthos hotei-atsumorianum* a *macranthos-arshan*.

Všechna semena jsem získal od pana Ing. J. Obdržálka, CSc., z Výzkumného Ústavu Silva Taroucy Průhonice, který se pěstování střevočniců věnuje řadu let.

Jednalo se o semena ze soukromé kolekce střevočniců, kterou pan Obdržálek vlastní. Sklizená byla na podzim, roku 2013 (*Cypripedium reginae Vermont a reginae Van Tubergeen*) a na podzim roku 2014 (Všechny vysévané druhy). Získána byla z nezralých, zelených a prasklých semeníků. Sypala se volně ven a měla světle, až středně hnědou barvu.

### **3.2 Uchovávání semen**

Abych zabránil tvorbě inhibičních látek v semenech, které by vedly ke znemožnění klíčení, umístil jsem označené papírové pytlíky se semeny do chladničky, kde jsem je od jejich získání skladoval při teplotě 3-5°C po dobu 2 měsíců, pro navození chladné periody roku.

### **3.3 Povrchová sterilizace semen**

Podmínkou úspěšného asymbiotického výsevu orchidejí je sterilita. Jelikož jsem semínka pro svou práci obdržel samostatně, nikoliv v celém, nepoškozeném semeníku, byla nutná jejich povrchová sterilizace. Použil jsem metodu, využívající mikrozkmavku, injekční stříkačku a pasturovu pipetu.

### **3.3.1 Použití desinfekčních roztoků**

Jako desinfekční roztoky jsem použil 70% ethanol a nasycený roztok chlorového vápna, vzniklý rozpuštěním 7,2g  $\text{CaOCl}_2$  ve 100ml destilované vody, za stálého míchání.

Následně jsem roztok chlorového vápna nechal 60 minut odstát v kádince, přikryté fólií, z důvodu uvolňování chloru do prostor laboratoře. Po odstátí jej bylo nutno ještě přefiltrovat přes filtrační papír a zbavit ho tím pevných usazenin.

### **3.3.2 Vlastní postup při povrchové sterilizaci**

Mikrozkumavka mi sloužila jako nádoba, v níž jsem sterilizaci prováděl, a její uzavíratelné víčko, spolu s průhlednou stěnou, mi umožnily sledovat celý proces pod lupou a lépe tak odhadnout dobu, kdy dojde k vybělení semen.

Nejdříve jsem do ní nasypal semínka, která byla následně propláchnuta roztokem 70% ethanolu, působícího po dobu 1 minuty a 30 vteřin. Tím se stala semínka smáčivými a částečně se odbarvila.

Následně jsem injekční jehlou, jejíž horní konec byl vybaven vatou, aby případná nasátá semínka neskončila v tubusu, vyměnil ethanol v mikrozkumavce za roztok chlorového vápna.

Chlorové vápno jsem ponechal působit až do vybělení semen. Celý proces odbarvování jsem sledoval pod lupou, abych včas odhadl dobu, kdy jsou semena již vybělena a nenechal chlorové vápno působit příliš dlouho, aby nedošlo ke ztrátě vitality semen. Jako vodící znak pro tento moment mi sloužil fakt, kdy došlo k odbarvení embrya, avšak na jeho pólech se ještě zachoval náznak světle hnědé barvy.

Proces vybělení semen během povrchové sterilizace znázorňují obrázky 5 a 6 v příloze.

Další část sterilizace již probíhala ve sterilních laminárních boxech, aby nedošlo k opětovné kontaminaci semen.

Chlorové vápno bylo injekční stříkačkou odsáto a semena 3x propláchnuta ve sterilní deionizované vodě.

Po posledním propláchnutí bylo v mikrozkumavce ponecháno menší množství vody, aby je šlo lépe přemístit na kultivační média.



Pasteurovou pipetou byla nasáta kapka vody se semínky a vysévala se již sterilizovaná semínka na předem připravená média, v Petriho miskách.

### **3.4 Výsevy na jaře roku 2014**

#### **3.4.1 Cíl výsevů**

Cílem prvních výsevů bylo seznámit se s problematikou práce ve sterilních podmínkách a současně zvolit pro další výsevy nejvhodnější z použitých růstových regulátorů, přidaný do kultivačních médií, za účelem podpory klíčivosti semen.

#### **3.4.2 Rostlinný materiál**

Pokusnými rostlinami pro první výsev jsem zvolil semena rostlin *Cypripedium reginae* (Vermont) a *Cypripedium reginae* (Van Tubergeen), z důvodu většího množství semen, jímž jsem disponoval.

#### **3.4.3 Použitá média**

Vysévalo se na živná média připravená dle Murashige a Skoog (1962), (Dále MS), vyrobené ve třech verzích, které se od sebe lišily přidáním růstových regulátorů.

##### **3.4.3.1 Složení média**

½ MS bez vitamínů (DUCHEFA)

vitamíny: kyselina nikotinová, kyselina listová, thiamin, biotin.

Dále přidáno: sacharóza, glukóza, trypton, aktivní uhlí, agar.

pH= 5,6

růstové regulátory: kinetin, 6-benzylaminopurin (BAP)

Pro přehlednost jednotlivých složek jsem jejich seznam a množství napsal jako tabulku 1.

**Tabulka 1 složení média MS**

mikroelementy		makroelementy	
sloučenina	(mg/l)	sloučenina	(mg/l)
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	CaCl <sub>2</sub>	332,02
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
FeNaEDTA	36,7	KNO <sub>3</sub>	1900
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	MgSO <sub>4</sub>	180,54
KI	0,83	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16,9		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25		
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6		

ostatní složky		Vitamíny	
			(mg/l)
sacharóza	500 mg/l	thiamin	0,4
glukóza	15 g/l	kys. nikotinová	5
trypton	500 mg/l	kys. listová	0,5
aktivní uhlí	1 g/l	biotin	50
agar	8 g/l		

pH= 5,6

### 3.4.4 Příprava média

Při přípravě média jsem vytvořil z odvážené sacharózy, glukózy a koncentrátu organických a anorganických složek zásobní roztok, na 0,5 litru, v Erlenmeyerově baňce.

Následně se navážil agar, který byl rozvařen v 0,3 litru destilované vody, za použití mikrovlnné trouby.

Když došlo k jeho dokonalému rozvaření, přidal jsem k němu svůj předpřipravený zásobní roztok o objemu 0,5 litru a dodal dle tabulek ještě vitamíny a aktivní uhlí. V odměrném válci jsem doplnil celkový objem na 1 litr za pomoci destilované vody a změřil pH.

pH média se měřilo pH metrem. Při nízké hodnotě se pH média upravilo pomocí 0,1 M KOH, při vysoké hodnotě se pH média snížilo pomocí 0,1 M HCl.

Po dosažení pH v hodnotě 5,6 bylo médium dávkováno do skleněných nádob o objemu 250 ml, kdy jsem do každé z nich ještě přidal příslušný růstový regulátor

BAP, či kinetin, obojí v množství 0,1  $\mu\text{mol/l}$ . Uzavírány byly modrým, plastovým víčkem se závitem a celé médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121°C a po dobu 20 minut.

V průběhu sterilizace média v autoklávu jsem připravil a sterilizoval laminární box a vložil do něj sterilní Petriho misky. Když skončilo autoklávování média, odnesl jsem nádoby s médiem do laminárního boxu a v jeho sterilním prostředí jsem jej rozléval do Petriho misek.

Abych rozeznal, které misky jsou s kinetinem, které s BAP a které růstový regulátor neobsahují, při jejich zavírání jsem je označil.

Následně jsem rozlitá média v uzavřených Petriho miskách nechal zchladnout a ztuhnout. Aby nedošlo ke kontaminaci, obalil jsem je pomocí balící fólie a po týdnu jsem provedl optickou kontrolu, zda nějaké Petriho misky nekontaminují.

#### **3.4.5 Výsev semen**

Vlastnímu výsevu semen předcházela jejich povrchová sterilizace, která je popsána v kapitole 3.3, této práce.

V laminárním boxu jsem si nachystal Petriho misky s kultivačním médiem a povrchově sterilizovaná semena jsem na ně vyséval za pomoci Pasteurovy pipety, kterou jsem je nasával v kapce destilované vody.

Vyséval jsem na všechny verze připraveného média, tedy jak na verzi s BAP, tak na verzi s kinetinem a kontrolní verzi.

Abych semena rozeznal i nadále od sebe, popsal jsem Petriho misky zkratkou udávající název rostliny a před vyjmutím z laminárního boxu je pečlivě uzavřel pomocí obalení balící fólií.

Od obou variant *Cypripedium reginae*, *Vermont* i *Van Tubergeen*, byl proveden výsev na každém typu média vždy dvakrát, aby se daly výsledky porovnat mezi sebou a zároveň ponechat část semen pro použití i v následujícím pokusu.

#### **3.4.6 Kultivace semen**

Vysetá semena na Petriho miskách jsem umístil do kultivační místnosti, kde jsem je ukryl před světlem do uzavíratelné skříně.

Následně se po dobu několika měsíců kultivovala ve tmě při teplotě 22°C, než došlo k vytvoření protokormů. Protokormy jsem poté přesadil na nově připravené médium, opět dle Mourashige a Skooga, z důvodu stáří původního média a abych zabránil nekrotizaci protokormů kvůli postupné tvorbě fenolických látek, která klíčící semena tvoří, a která pro ně mají toxický charakter.

Protokormy většího vzrůstu jsem přesadil na médium připravené dle Harvaise (1982), který se věnoval kultivaci druhu *Cyripedium reginae*. Složení média dle Harvaise na objem 1l uvádím v tabulce 2 (Steele, 1995).

**Tabulka 2 složení média pro pasážování protokormů (Harvais, 1982)**

makroelementy		mikroelementy	
sloučenina		sloučenina	(mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1400 mg	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	400 mg	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5
KCl	100 mg	KI	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,54
KNO <sub>3</sub>	100 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,02
Citrát amonný nahrazen <b>kys. Citronovou</b>	19 mg	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5
Fe ze zás. Roztoku	2,5 ml		
ostatní složky		Vitamíny (mg/l)	
sacharóza	500 mg/l	thiamin	0,4
glukóza	15 g/l	kys. nikotinová	5
trypton	500 mg/l	kys. Listová	0,5
agar	8 g/l	biotin	10
			pH=5,4

## 3.5 Výsevy na podzim 2014

### 3.5.1 Cíl výsevů

cílem druhých výsevů bylo vytvořit srovnávací materiál pro optimalizaci kultivačních médií pomocí přidání kinetinu, jako růstového regulátoru, do kultivačního média a následně vytvořit modifikace média přidáním kvasničního extraktu, kokosového mléka, extraktu z mrkve a přidáním či nepřidáním aktivního uhlí.

### 3.5.2 Rostlinný materiál

Pro druhý výsev jsem jako pokusné rostliny zvolil *Cypripedium reginae* (Vermont), *Cypripedium reginae* (Van Tubergeen), *Cypripedium flavum*, *Cypripedium fasciolatum*, *Cypripedium macranthos* ve formách *macranthos*, *macranthos-albiflorum*, *macranthos hoteli-atsumorianum* a *macranthos-arshan*.

### 3.5.3 Použitá média

Základem bylo médium dle receptur Michla, (M), (1988). K této receptuře jsem přidal další látky, podrobně rozepsané níže. Půdu dle Michla jsem vybral proto, že sama pracuje s kombinací kvasničního extraktu a při pikýrování pak s extraktem z kořene mrkve.

#### 3.5.3.1 Složení média

Mikro prvky ½ MS bez vitamínů (DUCHEFA)

Makroprvky dle Michla

Vitamíny ze zásobního roztoku + další vitamíny: kyselina nikotinová, kyselina listová, thiamin, biotin, Ca-pantothenát, pyridoxin, inositol.

Dále přidáno: sacharóza, glukóza, trypton, agar,

V některých verzích: aktivní uhlí, kvasniční extrakt, kokosové mléko, mrkvový extrakt. Detailněji rozvedeno v části 3.5.4.1 této práce.

pH= 5,4

růstový regulátor: kinetin

Detailněji zpracováno v tabulce 3 na následující stránce.

Tabulka 3 složení média dle Michla (1988)

mikroelementy (MS)		makroelementy	
sloučenina	(mg/l)	sloučenina	(g/l)
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,216 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,132 g
FeNaEDTA	36,7	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,246 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	KCl	0,150 g
KI	0,83	kyselina citrónová	0,192 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16,9	CaCl <sub>2</sub> bezvodý	0,022 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25		
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6		

ostatní složky	
laktalbumin- hydrolyzát	0,5 g
yeastolate	0,5 g
sacharóza	500 mg/l
glukóza	15 g/l
trypton	500 mg/l
agar	8 g/l
kinetin	0,1 μmol

Vitamíny	(mg/l)
thiamin	0,4
kys. nikotinová	5
kys. listová	0,5
biotin	50
pyridoxin	10 mg
inositol	10 mg
Ca-pantothenát	10 mg
+Vitamíny ze zás. Rostoku 1,1 g	

pH= 5,4

### 3.5.4 Příprava médií

Při přípravě média jsem vytvořil z odvážené sacharózy, glukózy a koncentrátu organických a anorganických složek zásobní roztok, na 0,5 litru, v Erlenmeyerově baňce.

Přípravu média jsem upravil ještě pomocí přidání kokosového mléka, extraktu z kořene mrkve, kvasničního extraktu a přidáním či nepřidáním aktivního uhlí. Tyhle komponenty jsem odvážil do nádob o objemu 250 ml (kam jsem později přidal zbytek média, viz další část postupu) a nechal je zatím stát bokem.

Následně se navázil agar, který byl rozvařen v 0,3 litru destilované vody, za použití mikrovlnné trouby.

Když došlo k jeho dokonalému rozvaření, přidal jsem k němu svůj předpřipravený zásobní roztok o objemu 0,5 litru a dodal dle tabulek ještě vitamíny. V odměrném válci jsem doplnil celkový objem na 1 litr za pomoci destilované vody a změřil pH.

pH média se měřilo pH metrem. Při nízké hodnotě se pH média upravilo pomocí 0,1 M KOH, při vysoké hodnotě se pH média snížilo pomocí 0,1 M HCl

Po dosažení pH v hodnotě 5,6 bylo médium dávkováno do skleněných nádob o objemu 250 ml, ve kterých se nacházely různé přidané komponenty, zmíněné výše v textu. Poté jsem do každé z nich ještě přidal růstový regulátor kinetin. Uzavírány byly nádoby modrým, plastovým víčkem se závitem a celé médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121°C a po dobu 20 minut.

V průběhu sterilizace média v autoklávu jsem připravil a sterilizoval laminární box a vložil do něj sterilní Petriho misky. Když skončilo autokláfování média, odnesl jsem nádoby s médiem do laminárního boxu a v jeho sterilním prostředí jsem jej rozléval do Petriho misek.

Abych rozeznal, které misky mají médium upraveno a jak, při jejich zavírání jsem je označil.

Následně jsem rozlité média v uzavřených Petriho miskách nechal zchladnout a ztuhnout. Aby nedošlo ke kontaminaci, obalil jsem je pomocí balící fólie a po týdnu jsem provedl optickou kontrolu, zda nějaké Petriho misky nekontaminují.

#### 3.5.4.1 Úprava média

Pro přehlednost a úplnost textu je v následující tabulce 4 uvedeno, v jakém množství jsem přidal které složky do upravovaného média, připraveného dle receptur Michla (1988).

Tabulka 4 přidané složky

verze média	přidané látky			
	kvasniční extrakt (g)	kokosové mléko (ml)	extrakt z kořene mrkve (g)	aktivní uhlí (g)
ck1	1,5	0	0,5	0,1
ck2	0	0	0,5	0,1
ck3	1,5	0	2	0
ck4	0	0	2	0
ck5	1,5	2	0	0,1
ck6	0	2	0	0,1
ck7	1,5	1,5	0,5	0,1
ck8	0	1,5	0,5	0,1
ck9	0	0	0	0,1
ck10	0	0	0	0

### 3.5.5 Výsev semen

Vlastnímu výsevu semen předcházela jejich povrchová sterilizace, která je popsána v kapitole 3.3, této práce.

V laminárním boxu jsem si nachystal Petriho misky s kultivačním médiem a povrchově sterilizovaná semena jsem na ně vyséval za pomoci Pasteurovy pipety, kterou jsem je nasával v kapce destilované vody.

Vyséval jsem na všechny verze připraveného média, jejichž odlišnosti jsou zmíněné v části Úprava média. Abych semena rozeznal i nadále od sebe, popsal jsem Petriho misky zkratkou udávající název rostliny a před vyjmutím z laminárního boxu je pečlivě uzavřel pomocí obalení balicí fólií.

Druhy *Cypripedium reginae* (Vermont), *Cypripedium reginae* (Van Tubergeen) a *Cypripedium fasciolatum* byly vysety na každý z typů média vždy dvakrát.

Druhy *Cypripedium flavum*, *Cypripedium macranthos*, *Cypripedium macranthos-albiflorum*, *Cypripedium macranthos hotai-atsumorianum* a *Cypripedium macranthos-arshan* byly vysety, z důvodu malého množství semen a velkého množství verzí kultivačních médií, právě jednou, tudíž nelze výsledky vyhodnotit pomocí statistiky, ale mohou sloužit jako předloha pro další výzkum.

### 3.5.6 Kultivace semen

Vysetá semena na Petriho miskách jsem umístil do kultivační místnosti, kde jsem je ukryl před světlem do uzavíratelné skříně.

Následně se po dobu několika měsíců kultivovala ve tmě při teplotě 22°C, než došlo k vytvoření protokormů. Protokormy většího vzrůstu jsem poté přesadil na médium, připravené dle Murashige a Skooga (1962). Učinil jsem tak i u protokormů, které začínaly vykazovat známky nekrotizace v důsledku nevhodnosti dané verze média pro další vývoj klíčících semen.



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Povrchová sterilizace semen

V tabulce 5 jsou uvedeny časy povrchové sterilizace u jednotlivých druhů rodu *Cypripedium*, v obou pokusech. Časy jsou individuální a pohybují se v intervalu od jedné do několika hodin.

Tabulka 5 doba povrchové sterilizace u jednotlivých druhů rodu *Cypripedium*

číslo pokusu	Druh orchideje	doba povrch. ster. (min.)
I.	<i>Cypripedium reginae (Vermont)</i>	145
	<i>Cypripedium reginae (Van Tubergeen)</i>	197
II.	<i>Cypripedium reginae (Vermont)</i>	236
	<i>Cypripedium reginae (Van Tubergeen)</i>	260
	<i>Cypripedium fasciolatum</i>	72
	<i>Cypripedium macranthos</i>	266
	<i>Cypripedium macranthos var. Albiflorum</i>	276
	<i>Cypripedium macranthos arshan</i>	280
	<i>Cypripedium flavum</i>	191
	<i>Cypripedium macranthos hotei-atsumorianum</i>	212

Rychlost odbourávání inhibičních látek souvisí se zralostí semen a koncentrací roztoku chlorového vápna. Z důvodu rozdílné zralosti semeníků v době sběru semen se tedy optimální doba ošetření musí stanovit individuálně, pro každou dávku semínek zvlášť.

U některých autorů se dočteme, že povrchová sterilizace se provádí chlorovým vápnem po dobu 15 minut (Dušek a Křístek, 1986), (Zákrejs, 1980), ovšem jedná se o povrchovou sterilizaci semen z neprasklých semeníků, které otevřeme pomocí předem žíhaného skalpelu a semena hned po sběru vyséváme.

Steele (1995) pak hovoří o povrchové sterilizaci zralých semen kombinací 95% ethanolu působícího 2 minuty a 0,5% NaClO po dobu 35 minut. Dále uvádí, že nejvhodnější doba pro sběr semen za účelem jejich výsevu je 5-6 týdnů od opylení.

Mnohem delší čas trvala povrchová sterilizace semen Kazumitsu Miyoshi a Masahiro Mii (1998), kteří dělali pokusy s *Cypripedium macranthos*. Výsledný čas působení  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  na semena u nich dosáhl 7 hodin.

Vejsadová (2006) pak ve své práci píše, že doba působení sterilizačního roztoku by měla být ponechána, dokud nedojde k odbarvení semen z hnědé do slonovinové.

Nejkratší dobu probíhala při mých pokusech povrchová sterilizace u *Cypripedium fasciolatum*, konkrétně 72 minut, a nejdéle pak trvala u *Cypripedium macranthos arshan*, u něž trvalo odbourání inhibičních látek celých 280 minut.

## 4.2 Výsev jaro 2014

Při prvních pokusech jsem srovnával klíčivost na médiu připraveném dle Murashige a Skoog (1962), obohaceném o růstové regulátory kinetin a BAP. Vybral jsem je na základě pokusů, o nichž hovoří ve své práci Steele (1995) a Kazumitsu a Masahiro (1998), kteří používali při kultivaci střešníků ze semen právě výše zmíněné růstové regulátory, a na základě jejich výsledků jim vyšlo, že na médiích s kinetinem dosahují semena orchidejí rodu *Cypripedium* vyšší klíčivosti, než na médiích bez něj. Kinetin pak ve svých pokusech používá i Vejsadová (2006).

Obdobných výsledků dosáhl podle Steele (1995) i Harvais (1982) s *Cypripedium reginae* na médiích s BAP.

Tabulka 6 klíčivost semen na médiích s použitím růstových regulátorů

100 dní	verze média - klíčivost v %		
Druh orchideje	CO	Ck	CB
<i>C. reginae (Vermont)</i>	0	91,66	60
<i>C. reginae (Van Tubergeen)</i>	73,33	86,95	62,5
100 dní, opakování	verze média - klíčivost v %		
Druh orchideje	CO	Ck	CB
<i>C. reginae (Vermont)</i>	82,35	100	100
<i>C. reginae (Van Tubergeen)</i>	60	86,66	76,92

V tabulce 6 mám zaznamenány výsledky svého pokusu, kdy na médiích s použitím růstových regulátorů byla klíčivost vyšší, než na verzi média bez nich. Rozdíly mezi kinetinem a BAP již nejsou procentuálně příliš odlišné a jejich vliv by se dal zhodnotit jako podobný, avšak v tabulce 7 uvádím počet vytvořených protokormů, který je mnohem vyšší na médiu s přidaným kinetinem, než s BAP. Proto jsem rozhodl, že ke svému druhému pokusu použiji do připravovaných médií kinetin.

Grafy klíčivosti z prvního pokusu jsou zobrazeny v příloze jako graf 1 a 2.

Tabulka 7 počet protokormů vyklíčených po 100 dnech na médiích s růstovými regulátory

100 dní	verze média - počet protokormů		
Druh orchideje	C0	Ck	CB
<i>C. reginae</i> (Vermont)	0	11	3
<i>C. reginae</i> (Van Tubergeen)	1	1	0
<b>100 dní, opakování</b>			
Druh orchideje	C0	Ck	CB
<i>C. reginae</i> (Vermont)	5	10	3
<i>C. reginae</i> (Van Tubergeen)	0	3	0

Pro kompletnost výsledků prvního pokusu uvádím v tabulce 8 celkové počty vytvořených protokormů, které jsem po 180 dnech od vysetí pasázoval na nová média, kdy vzrůstově menší jsem přemístil na médium MS a větší na médium dle Harvais (1982), jehož médium používal ve své práci i Steele (1995)

Tabulka 8 počet protokormů přepasávaných na nová média 180 dní od vysetí semen a jejich celkový počet

180 dní-pasáž na MS	Z verze média - počet protokormů		
Druh orchideje	C0	Ck	CB
<i>C. reginae</i> (Vermont)	8	11	6
<i>C. reginae</i> (Van Tubergeen)	18	18	10
<b>180 dní-pasáž na Harvais</b>			
Druh orchideje	C0	Ck	CB
<i>C. reginae</i> (Vermont)	7	10	3
<i>C. reginae</i> (Van Tubergeen)	5	5	5
<b>Protokormy vyrostlé celkem:</b>			
	C0	Ck	CB
<i>C. reginae</i> (Vermont)	15	21	9
<i>C. reginae</i> (Van Tubergeen)	23	23	15

### 4.3 Výsev podzim 2014

Druhým pokusem jsem zkoušel vlivy přidaných látek organického původu na klíčivost semen, růst a vývoj protokormů. Arditti (2009) ve své práci píše o vlivu kokosového mléka na klíčivost z důvodu jeho obsahu nativního cytokininu zeatin.

Protokormy vyklíčené na takovém médiu pak však mají nažloutlou barvu. Dále se zmiňuje o vlivu kvasničního extraktu, který je pro semena orchidejí důležitý svým

obsahem škály vitamínů B. Obdobný způsob účinku, jako kokosové mléko by pak měl mít i mrkvový extrakt z kořene, který také přirozeně obsahuje určitou koncentraci cytokininů. Obecně se o těchto látkách, přidávaných do média, můžeme dočíst v pracích Duška a Křístka (1986), Zákrejse (1980), Ardittiho (1967) a (2009).

Tabulka 9 zobrazuje procentuální klíčivost jednotlivých druhů střešníků na různých verzích média, do nějž jsem přidával různé kombinace kokosového mléka, mrkvového extraktu, kvasničního extraktu a přidal, či nepřidal aktivní uhlí. Ve všech verzích média byl přidán kinetin, jako růstový regulátor.

Tabulka 10 slouží jako legenda k tabulce 9, protože klíčící semena a protokormy se u každého z vysévaných střešníků chovala jinak a některá vykazovala známky nekrotizace na médiích, kde jiná klíčila bez problémů.

Tabulka 9 klíčivost *Cypripedii* na zkoušených úpravách média dle Michla

180 dní	verze média - klíčivost v %									
Druh orchideje	Ck1	Ck2	Ck3	Ck4	Ck5	Ck6	Ck7	Ck8	Ck9	Ck10
<i>C. reginae</i> (Vermont)	90,69	100	10,52	100	100	100	81,39	92,86	89,74	85,89
<i>C. reginae</i> (Van Tubergeen)	71,42	76,19	33,33	22,22	77,27	97,14	97,82	55,55	57,14	22,22
<i>C. fasciolatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. macranthos</i>	0	7,69	11,54	0	0	17,95	0	4	9,67	15,78
<i>C. macranthos</i> var. <i>Albiflorum</i>	60,71	55,32	0	90,32	81,81	86,02	60,71	9,8	75,75	17,85
<i>C. macranthos</i> arshan	0	8,33	0	0	0	98,59	0	8	42,72	34,33
<i>C. flavum</i>	0	0	9,09	16,21	8,82	0	8	0	0	15,38
<i>C. macranthos</i> hotai-atsumorianum	0	0	88,81	0	0	0	0	0	67,85	82,25
180 dní, opakování	verze média - klíčivost v %									
Druh orchideje	Ck1	Ck2	Ck3	Ck4	Ck5	Ck6	Ck7	Ck8	Ck9	Ck10
<i>C. reginae</i> (Vermont)	93,55	100	86,44	100	91,43	100	93,67	100	90	93,67
<i>C. reginae</i> (Van Tubergeen)	66,66	81,81	80,85	87,5	33,33	0	100	92,55	80,31	63,63
<i>C. fasciolatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka 10 vitalita

legenda - vitalita
neklíčící beze změny
neklíčící nekrotizované
bílé
nahnědlé
nekrotizované
nekrotizované + rhizoidy

Z výsledků jsou patrné rozdíly mezi vlivem médií na druhy *Cypripedium reginae* a na varianty druhu *C. macranthos*, které reagovaly zcela odlišně u média Ck6,8,10. Může to být způsobeno rozdílnými nároky jednotlivých druhů na složení média.

Typ Ck1, což byla kombinace kvasničního extraktu, extraktu z kořene mrkve a aktivního uhlí, se jevila pro klíčení semen jako vhodná. Ck2, tedy extrakt z kořene mrkve a aktivní uhlí byl rovněž pro všechny druhy vnímán pozitivně a bobtnající semena ani protokormy nevykazovaly žádné známky hnědnutí, či nekrotizace. Dá se tedy soudit, že přidání těchto kombinací složek má na klíčení semen pozitivní vliv díky kombinaci nativních cytokininů a skupiny vitamínů B.

Zcela opačně dopadla verze média pouze s extraktem z kořene mrkve (Ck4). Protokormy na něm nekrotizovaly, vykazovalo tedy opačné výsledky, než verze s přidáním aktivním uhlím, což mohlo být způsobeno právě absencí aktivního uhlí, které by snižovalo obsah fenolických látek, vyloučených klíčovými semeny a tím i toxický charakter těchto látek.

Nekrotizované protokormy s rhizoidy a nekrotizovaná zbobtnalá semena jsou zobrazeny v příloze, jako obrázek 7.

Typ Ck9 byla základní receptura dle Michla, obohacená o aktivní uhlí. V literatuře se lze dočíst, že Michl sám se věnoval kultivaci semen orchidejí, proto je můj výsledek na tomto typu média i předvídatelný.

Média, která měla bobtnající semena a protokormy nahnědlá nemusí být nutně nevhodná, protože při přemístění nahnědlých protokormů na nové médium ½ MS, začaly z velké většiny opět postupně růst a světlat.

Lze tedy soudit, že je nutné zkrátit dobu kultivace na těch médiích, na nichž postupem času protokormy hnědnou, v důsledku nedostatku potřebných živin. Protokormy jsou zobrazeny v příloze jako obrázek 9.

Médium Ck6, tedy kombinace kokosového mléka a aktivního uhlí, pak u variant druhu *Cypripedium macranthos* mělo mnohem lepších výsledků, než u všech ostatních druhů. Dokázaly totiž bez problému vyklíčit a na rozdíl od *Cypripedium reginae* zůstaly jejich protokormy stále bílé. *Cypripedium macranthos hotai-atsumorianum* vyklíčit na tomto médiu, jako jediná varieta druhu *Cypripedium macranthos*, nedokázal vůbec.

*Cypripedium macranthos albiflorum* pak vytvořil největší protokormy, které byly během všech pokusů zaznamenány. Jejich fotografii najdete v příloze jako obrázek 8.

U média Ck7, což je kombinace kokosového mléka, kvasničního extraktu, extraktu z kořene mrkve a aktivního uhlí, většina protokormů, ale i bobtnajících semen u vysévaných druhů začala postupně hnědnout, avšak *Cypripedium flavum* jako jediné má protokormy, ponechané na tomto médiu, stále všechny bílé barvy.

Nevhodná se ukázala média Ck5,4 a u *Cypripedium reginae* Ck10.

Konkrétně se jednalo o kombinace: Ck4: extrakt z kořene mrkve, Ck5: kvasniční extrakt, kokosové mléko, aktivní uhlí, Ck10: Základní médium, bez aktivního uhlí.

Na těchto médiích semena buď vůbec nevyklíčila, či protokormy a zbobtnalá semena začaly nekrotizovat. V některých případech u *Cypripedium reginae* vytvořily nekrotizované protokormy rhizoidy, které u živých protokormů na jiných médiích pozorovány zatím nebyly.

Lze tedy soudit, že tato skupina médií je pro kultivaci střevíčníků nevhodná, či je třeba po velmi krátké době zbobtnalá semena přemístit na jiný typ média, aby nedošlo k nekrotizaci.

Grafické znázornění klíčivosti z tabulky 9 je uvedeno v příloze jako graf 3.

## 5 ZÁVĚR

Kultivace *in vitro* představuje významný způsob množení orchidejí, ať už při komerční produkci, či při záchranných programech. U orchidejí existuje možnost symbiotického výsevu, kdy semena sázíme na média spolu se symbiotickou houbou. Druhou možností je asymbiotický výsev, kdy musíme látky, které houba dodává klíčovému semenu, nahradit pomocí vhodné úpravy kultivačního média.

Rod *Cypripedium* patří mezi terestrické orchideje mírného pásu a jako takový v přírodě bez mykorrhizní symbiózy nevyklíčí. Z toho důvodu je u střevíčníků problematický jejich asymbiotický výsev. Je nutno dodržet podmínky aseptického prostředí a řešit problematiku povrchové sterilizace semen, za účelem odbourání látek zabírajících klíčení a zároveň zabránění možnosti kontaminace kultivačního média nedostatečně sterilizovaným semenem, před jejich vlastním výsevem.

Dospělá rostlina však ke svému životu symbiotickou houbu nepotřebuje, protože díky fotosyntetickému aparátu si dokáže potřebné látky syntetizovat sama.

Z výsledků je patrné, že pozitivní vliv na klíčení semen rodu *Cypripedium* mají také růstové regulátory. Nejvhodněji se jeví na základě pokusů i literatury cytokinin kinetin.

Zkoumán byl také vliv organických látek, přidaných do kultivačního média, kdy jako nejvhodnější se jeví kombinace kvasničního extraktu s extraktem z kořene mrkve a aktivním uhlím, spolu s kombinací extraktu z kořene mrkve a aktivním uhlím. Výsledek si lze vysvětlit přítomností škály vitamínů B, přítomných v kvasničním extraktu a zároveň nativním cytokininům v kořeni mrkve, což má obojí za následek pozitivní stimulaci klíčení semen střevíčníků.

Oproti očekávání zaostalo v pokusech mléko z kokosových ořechů, na němž sice vyklíčily největší protokormy, ale celkově jen u variant druhu *Cypripedium macranthos*. Dá se to vysvětlit tím, že dle literatury se jako vhodné jeví z nezralých kokosových ořechů, které se však v našich podmínkách špatně shánějí, takže bylo nahrazeno mlékem z ořechů zralých, které obsahují cytokininů mnohem méně.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ARDITTI, J., *Micropropagation of Orchids*, Svazek 1, John Wiley & Sons, 2009, 2. vydání 1560 s., ISBN 1444300407, 9781444300406

BURGEFF, H., 1936. *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung*, Gustav Fisher, Jena, Germany 312 s.

CRIBB, P., *The genus Cypripedium*, Timber Press, Inc., Portland, Oregon, U.S.A. printed in Hong Kong, 1997, 301 s., ISBN 0-88192-403-2

DUŠEK, J., KŘÍSTEK, J., *Orchideje*, Academia Praha, 1986, 1. Vydání, 204 s., ISBN 21-000-86

DYKYJOVÁ D., *Ekologie střeoevropských orchidejí*, KOPP nakladatelství, České Budějovice, 2003, 1. Vydání, 116 s. ISBN 80-7232-202-8

ECCARIUS, W., *Die Orchideengattung Cypripedium*, EchinoMedia Verlag Dr. Kerstin Ramm, Deutschland, 2009, 384 s., ISBN 978-3-937107-19-6

ERFKAMP, J., *Kouzelné orchideje*. Praha: Euromedia Group, k.s. - Knižní klub v Praze, 2008. 1. vydání 144 s. ISBN 978-80-242-2198-4

GRYNDLER, M., BALÁŽ, M., HRŠELOVÁ, H., JANSA, J., VOSÁTKA, M., *Mykorhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin*. Praha: Academia, 2004. 1. vydání 366 s. ISBN 80-200-1240-0

HRADILÍK, J., *Rostlinné explantáty*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2005. 1. vydání 85 s. ISBN 80-7157-915-7

CHARLES L. ARGUE, *The Pollination Biology of North American Orchids: Volume 1: North of Florida and Mexico*, Springer Science & Business Media, 2011, 228 s. ISBN 1461405920, 9781461405924

JEŽEK, Z., *Orchideje: praktická encyklopedie*. 4. vydání, Čestlice: Rebo, 2010, 304 s. ISBN 978-80-255-0393-5

KAZUMITSU, M., MASAHIRO, M., *Stimulatory effects of sodium and calcium hypochloride, pre-chilling and cytokinins on the germination of Cypripedium macranthos seed in vitro*, Psychologia Plantarum, 1998, ISSN 0031-9317, 102: 481-486



KLEPETKOVÁ, P., Náklady generativní reprodukce hlíznaté mediteránní orchideje *Serapias lingula*, diplomová práce (nepubl., dep. Knihovna Masarykovy University), Brno 2006, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

MEJSTRÍK, V., Studie ČSAV č. 7, Mykorhizní symbiózy, Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1988 vydání 1., náklad 400 výtisků

MICHL, J., Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny, *Živa* 2: 51 –52, 3: 89 – 91, 4: 131 – 133, 1988.

MURASHIGE, T., SKOOG, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, 1962, *Physiologia Plantarum*, Volume 15, 473-497.

NASH, N., LA CROIX, I., Orchideje, Více než 1500 druhů orchidejí. Brno: Computer Press, a. s., 2007. 1. vydání ISBN 978-80-251-1459-9

PANDEY S. N., SINHA B. K., Plant physiology, 4E, Vikas Publishing House Pvt Ltd, 2009, 680 s., 4. Vydání, ISBN 8125918795, 9788125918790

PROCHÁZKA, F., Naše orchideje. Pardubice: Krajské muzeum východních Čech - pracoviště Pardubice, 1980. 1. vydání 296 s.

RÖLLKE, F., Orchideje, Praha, Nakladatelství Jan Vašut, s. r. o., 2007. České 1. vydání 128 s. ISBN 978-80-7236-497-8

SALLY E. SMITH, DAVID J. READ, Mycorrhizal Symbiosis, Academic Press, 2010, 3. vydání, 800 s. ISBN 0080559344, 9780080559346

SMITH SE, READ DJ., Mycorrhizal Symbiosis, 2nd Edition, Academic Press, London, UK, 1997, 605 s. ISBN 0-12-652840-3

STEELE, KW., Growing *Cypripedium reginae* from Seed, American Orchid society bulletin, April 1995, 64: 382-391

ŠAFRÁNKOVÁ, I., MATOUŠKOVÁ, J., BUCHTOVÁ, A., Choroby a škůdci orchidejí, Praha, Grada Publishing a. s., 2013, 1. vydání, 96 s.

ISBN 978-80-247-4606-7

VLAŠÍNOVÁ, H., Metodika generativního množení *Orchis morio* v aseptických podmínkách, Katedra botaniky a šlechtění rostlin, VŠZ Brno, Brno 1988, 30 s.

ZÁKREJS, J., Orchidey, Příroda - vydavatelstvo kníh a časopisov, n. p., Bratislava, 1980, 1. vydání 196 s. ISBN 64-142-80

ZOUN, M., Orchideje – Druhy vhodné pro pěstování v běžných podmínkách, Computer Press, Brno, 2008, 304 s. ISBN: 978-80-251-2135-1

ZOUN, M., Orchideje, Druhy vhodné pro pěstování v domácích podmínkách. Brno: Computer Press, a.s., 2009, 2. Aktualizované vydání 303 s. ISBN 978-80-251-2865-7

## 6.1 Online publikace

ARDITTI, J., Factors affecting the germination of orchid seeds, The botanical review vol.33, January-March 1967, 1. Vydání, The New York Botanical Garden, [cit. 24.4. 2015], 1:97 s., dostupné online z:

[http://www.academia.edu/890112/Factors\\_affecting\\_the\\_germination\\_of\\_orchid\\_seeds](http://www.academia.edu/890112/Factors_affecting_the_germination_of_orchid_seeds)

MARTIŠKO, J., MARTIŠKOVÁ, K., Unikátní lokalita orchidejí Obůrky-Třeštětec, červenec 2012, [cit. 26.3.2015], dostupné online z:

<http://www.kr-jihomoravsky.cz/archiv/ozp/publikace/oburky-trestenec.pdf>

MCKENDRICK, S., In vitro germination of orchids, a manual. Ceiba Foundation of tropical conservation, 2000, [Cit. 26.3. 2015], dostupné online z:

<http://www.orchideenvermehrung.at/downloads/seed%20sowing%20manual.pdf>

VEJSADOVÁ, H., Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids under in vitro conditions, Acta Biologica Cracoviensia, february 2006, [cit. 24.4. 2015], (IF) 48: 109-113, dostupné online z:

[http://www2.ib.uj.edu.pl/abc/pdf/48\\_1/vejsadova.pdf](http://www2.ib.uj.edu.pl/abc/pdf/48_1/vejsadova.pdf)

## 6.2 Zdroje obrázků

Obrázek 1 *Cypripedium reginae* [převzato dne 16. 4. 2015], dostupné online z:

<http://www.planteck.com/ben/wp-content/uploads/2011/01/Cyp-reginae007.jpg>

Obrázek 2 *Cypripedium fasciolatum* [převzato dne 16. 4. 2015], dostupné online z:

[http://www.floralpin.de/images/cypripedium-fasciolatum-06\\_1.jpg](http://www.floralpin.de/images/cypripedium-fasciolatum-06_1.jpg)

Obrázek 3 *Cypripedium flavum* [převzato dne 16. 4. 2015], dostupné online z:

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/98/Cypripedium\\_flavum\\_Orchi\\_010.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/98/Cypripedium_flavum_Orchi_010.jpg)

Obrázek 4 *Cypripedium macranthos* [převzato dne 16. 4. 2015], dostupné online z:

<http://www.cypripedium.cz/Images/cyps/macranthos0.jpg>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**BAP:** 6-benzylaminopurin

**MS:** Kultivační médium Murashige a Skoog

**½ MS:** Kultivační médium Murashige a Skoog s polovičním obsahem solí

**H:** Médium dle Harvais

**M:** Médium dle Michla

**Ck1-10:** Typ média v pokusu II, s přidaným kinetinem a dle čísla i dalšími složkami, rozepsanými v tabulce 4

**Ck:** Typ média v pokusu I, s přidaným kinetinem

**Cb:** Typ média v pokusu I, s přidaným 6-benzylaminopurinem

**C0:** Typ média v pokusu I, bez růstových regulátorů

## 8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 složení média MS

Tabulka 2 složení média pro pasážování protokormů (Harvais, 1982)

Tabulka 3 složení média dle Michla

Tabulka 4 přidané složky

Tabulka 5 doba povrchové sterilizace u jednotlivých druhů rodu *Cypridium*

Tabulka 6 klíčivost semen na médiích s použitím růstových regulátorů

Tabulka 7 počet protokormů vyklíčených po 100 dnech na médiích s růstovými regulátory

Tabulka 8 počet protokormů přepasážívaných na nová média 180 dní od vysetí semen a jejich celkový počet

Tabulka 9 klíčivost *Cypridii* na zkoušených úpravách média dle Michla

Tabulka 10 vitalita

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1, *Cypripedium reginae*

Obrázek 2 *Cypripedium fasciolatum*

Obrázek 3 *Cypripedium flavum*

Obrázek 4 *Cypripedium macranthos*

## 10 PŘÍLOHY

### 10.1 Seznam příloh

#### Příloha 1 Obrázky

Obrázek 5 Počátek povrchové sterilizace *Cypripedium reginae* (Van Tubergeen)

Obrázek 6 Konec povrchové sterilizace *Cypripedium reginae* (Van Tubergeen)

Obrázek 7, *Cypripedium reginae* (Vermont), nekrotizovaný protokorm s rhizoidy (největší uprostřed) a nekrotizovaná zbobtnalá semena, Ck4, 200  $\mu\text{m}$

Obrázek 8 *Cypripedium macranthos albiflorum* největší protokorm Ck6, 2000  $\mu\text{m}$

Obrázek 9, *C. reginae* (Van Tubergeen) skupinka protokormů, Ck9, 200  $\mu\text{m}$

Obrázek 10, *C. reginae* (Van Tubergeen) protokorm přemístěný na MS z Ck, 1000  $\mu\text{m}$

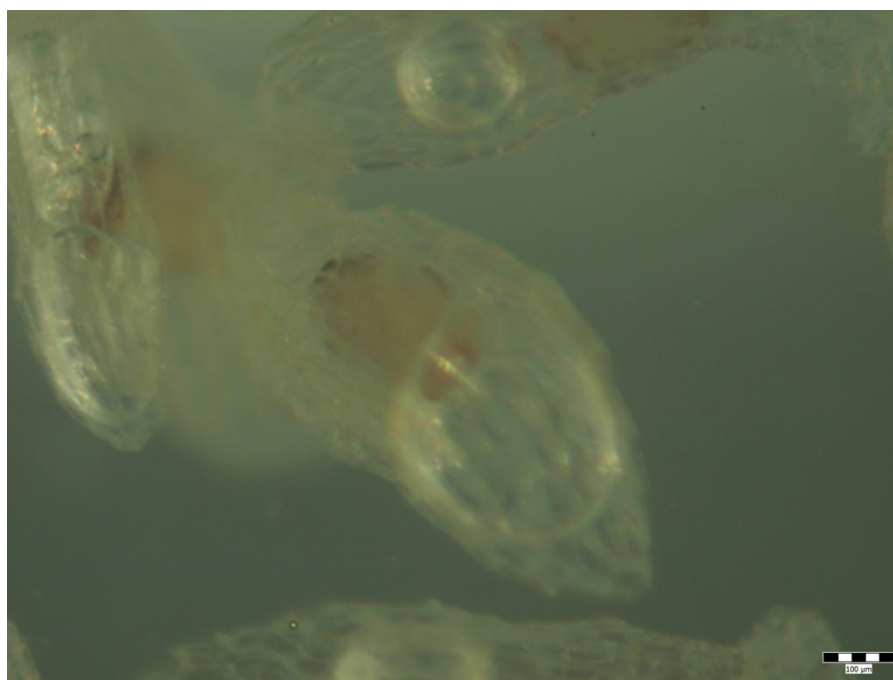
#### Příloha 2 grafy

Graf 1 procentuální klíčivost po 100 dnech z tabulky 6

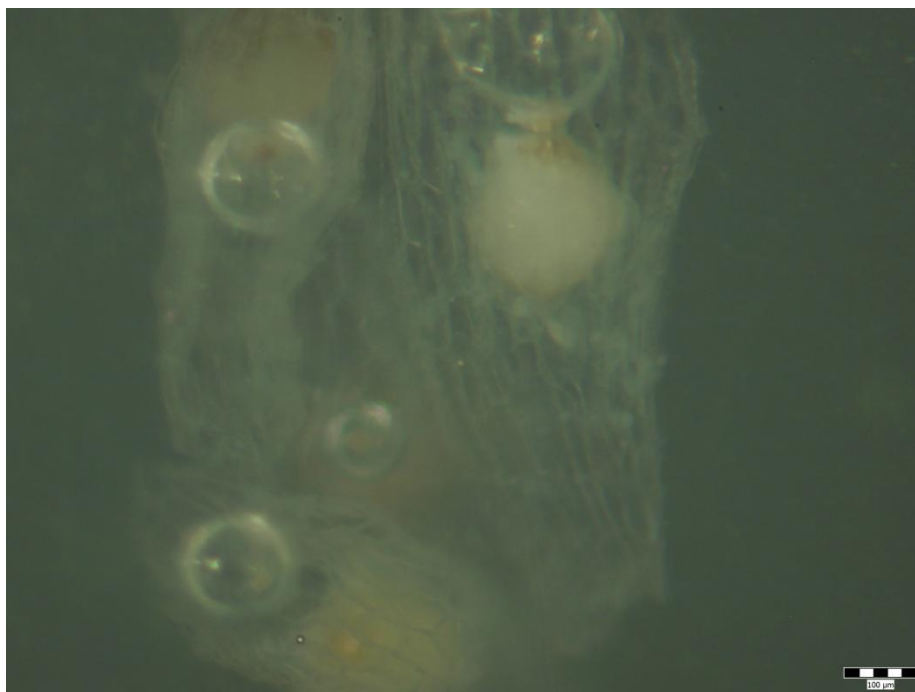
Graf 2 procentuální klíčivost opakování po 100 dnech z tabulky 6

Graf 3 klíčivost na médiích pokus 2 z tabulky 9

**Příloha 1 Obrázky**

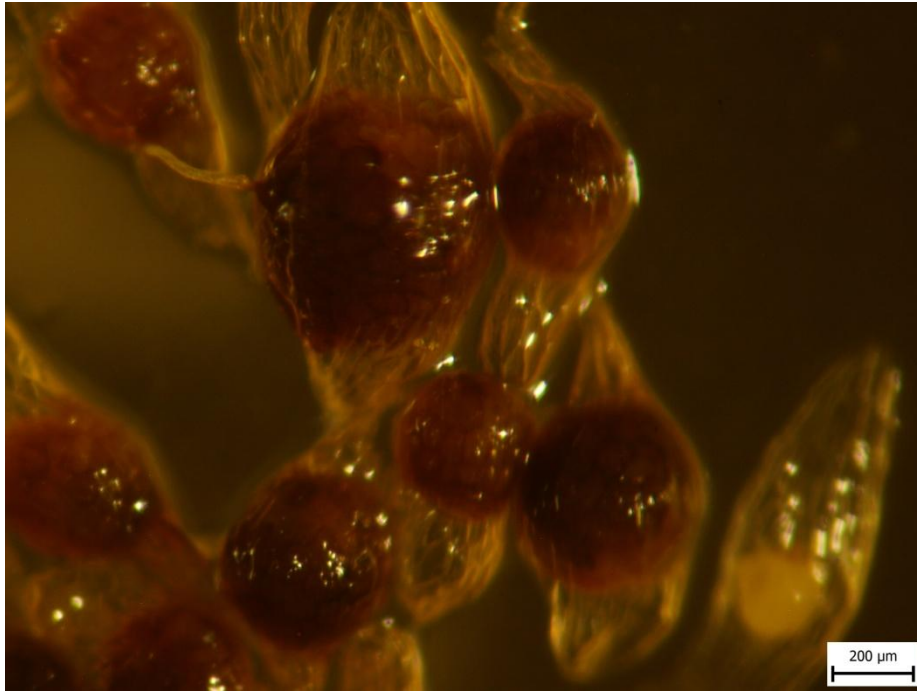


Obrázek 5, *Cypripedium reginae* (Van Tubergeen), počátek povrch. ster. 100 μm  
Autor: Martin Vetter



Obrázek 6, *Cypripedium reginae* (Van Tubergeen), konec povrch. ster. 100 μm  
Autor: Martin Vetter

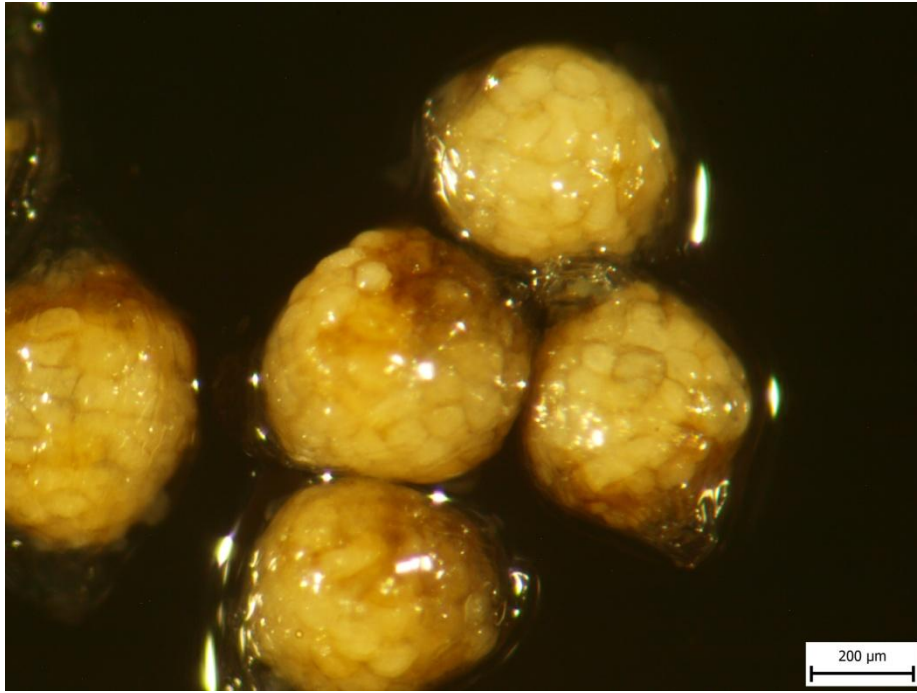




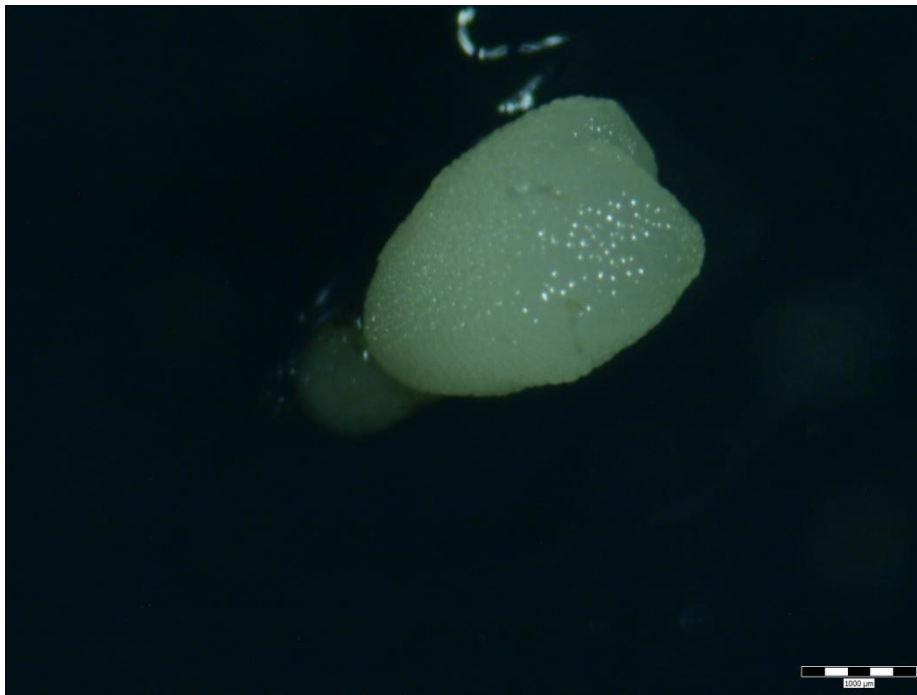
Obrázek 7, *Cyripedium reginae* (Vermont), nekrotizovaný protokorm s rhizoidy (největší uprostřed) a nekrotizovaná zbobtnalá semena, Ck4, 200 μm  
Autor: Martin Vetter



Obrázek 8, *C. macranthos albiflorum* největší protokorm Ck6, 2000 μm  
Autor: Martin Vetter



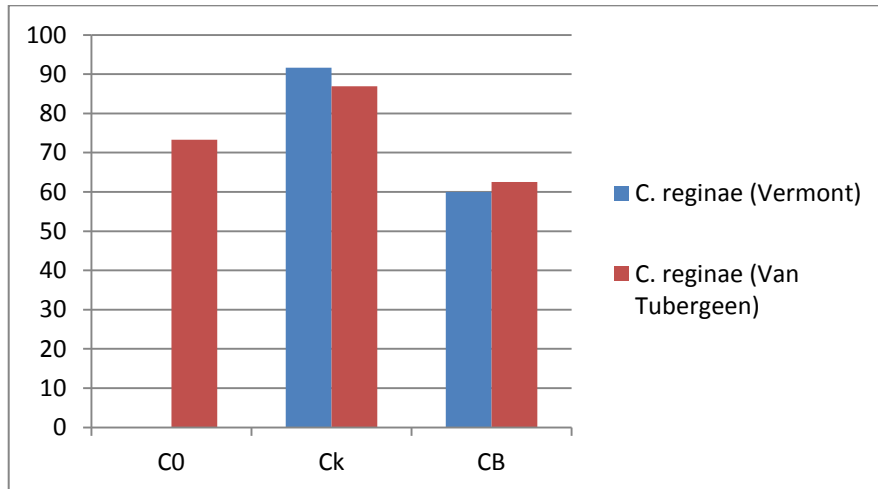
Obrázek 9, *C. reginae* (Van Tubergeen) skupinka protokormů, Ck9, 200 μm  
Autor: Martin Vetter



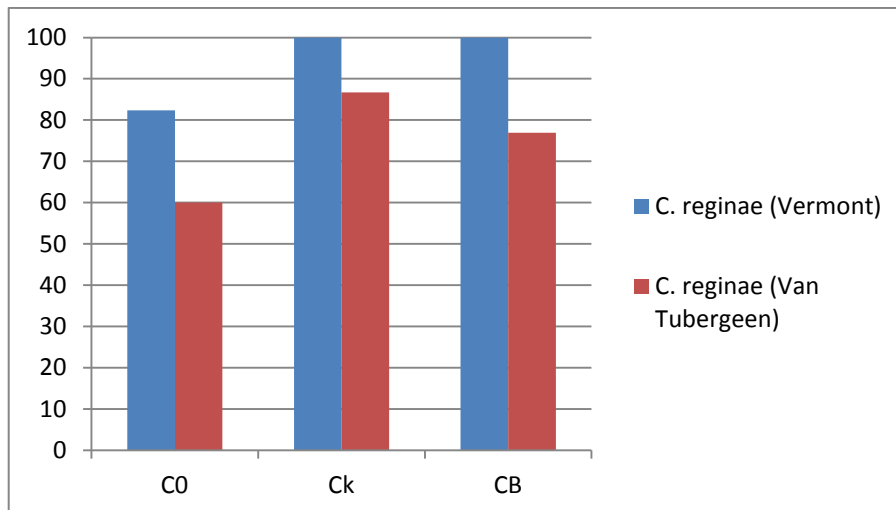
Obrázek 10, *C. reginae* (Van Tubergeen) protokorm přemístěný na MS z Ck,  
1000 μm  
Autor: Martin Vetter

## Příloha 2 grafy

Graf 1 procentuální klíčivost po 100 dnech z tabulky 6



Graf 2 procentuální klíčivost opakování po 100 dnech z tabulky 6



Graf 3 klíčivost na médiích pokus 2 z tabulky 9

