

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Generativní množení vybraných druhů rodu *Tillandsia L.* in vitro
(Generative propagation of selected *Tillandsia L.* species in vitro)

bakalářská práce

Jiří Kyncl

vedoucí práce:

doc. RNDr. Hana Čížková, CSc.

konzultant:

Mgr. Bohumil Vondruš

České Budějovice 2009

KYNCL J (2009): Generativní množení vybraných druhů rodu *Tillandsia* L. in vitro [Generative propagation of selected *Tillandsia* L species in vitro] 28 pp. + 9 pp. Appendix, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The plants of genus *Tillandsia* L. are a valuable article at the market nowadays, both legal and illegal. A lot of collectors are able to pay enormous sums of money only for having the species, some of which live in tens individuals at only one locality in the world. Mainly protected species are illegally sold.

The goal of this thesis is to find out, which medium is the most suitable for aseptic breeding by seeds and if it is possible, by using this method, to help free living species to survive.

Anotace

Rostliny rodu *Tillandsia* L. jsou v dnešní době cenným artiklem na trhu, legálním i nelegálním. Mnoho sběratelů je schopno zaplatit nehorázné sumy peněz jenom proto, že chtějí mít ve své sbírce druh, který žije na jediné lokalitě pouze v desítkách kusů. Nelegálně se prodávají hlavně chráněné druhy.

Cílem této práce je zjistit, jaké je nejvhodnější médium pro aseptické množení pomocí semen a zda lze tímto postupem pomoci volně žijícím druhům v jejich přežití.

Keywords

Bromeliaceae, aseptic breeding, medium

Klíčová slova

Bromeliaceae, aseptické množení, médium

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pouze s použitím citované literatury a za odborného vedení doc. RNDr. Hany Čížkové, CSc. a Mgr. Bohumila Vondruše.

V Českých Budějovicích 13. dubna 2009

Poděkování:

Děkuji všem, kteří mi s touto prací jakkoliv pomohli. Za získání semen druhů *Tillandsia L.* Ing. Janovi Zimovi, Antonínovi a Ondřejovi Lukscheiterům, Ing. Pavlu Heřtusovi a Ing. Jarmile Matouškové. Za zpracování dat ve statistických programech Mgr. Lukášovi Šmahelovi. Za jazykovou korekci Mgr. Vlastě Valentové. Za vedení, cenné rady a nezlomnou trpělivost děkuji vedoucí své práce doc. RNDr. Haně Čížkové. A v neposlední řadě děkuji svému konzultantovi, Mgr. Bohumilu Vondrušovi, za neocenitelnou pomoc při uskutečňování tohoto experimentu.

1. ÚVOD	3
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
2.1. STAVBA TĚLA	4
2.1.1. Kořeny	4
2.1.2. Stonek	5
2.1.3. Listy	5
2.1.4. Trichomy	5
2.1.5. Květy a květenství	6
2.1.6. Plody a semena	6
2.2. NÁROKY NA PĚSTOVÁNÍ	7
2.2.1. Světlo	7
2.2.2. Voda	7
2.2.3. Teplota	8
2.2.4. Vzduch	8
2.2.5. Minerální látky	8
2.3. ZPŮSOBY ROZMNOŽOVÁNÍ	9
2.3.1. Vegetativní rozmnožování	9
2.3.2. Generativní rozmnožování	10
2.4. ZKOUMANÉ DRUHY	11
2.4.1. <i>Tillandsia gardneri</i> Lindl.	11
2.4.2. <i>Tillandsia pseudobaileyi</i> Sue Gardner	12
2.4.3. <i>Tillandsia schiedeana</i> Stued.	12
2.4.4. <i>Tillandsia ferrisiana</i> L. B. Smith	14
2.4.5. <i>T. myosura</i> v. <i>gilliesii</i> Griseb. ex Baker	14
2.4.6. <i>T. loliacea</i> Martius ex Schultes f.	14
2.4.7. <i>T. flabellata</i> v. <i>rubra</i> Baker	15
2.4.8. <i>T. capillaris</i> Ruiz and Pav.	16
2.4.9. <i>T. didisticha</i> H. B. K.	17
3. MATERIÁL A METODIKA	18
3.1. CÍL PRÁCE	18
3.2. PRINCIP – ASEPTICKÉ KULTURY	18
3.3. MATERIÁL	18
3.4. POSTUP PŘI PŘÍPRAVĚ POKUSŮ	19
3.5. USPOŘÁDÁNÍ POKUSŮ	20
3.5.1. Pokus číslo 1 (předběžný pokus)	20
3.5.2. Pokus číslo 2 (pokus s dezinfekcí)	20
3.5.3. Pokus číslo 3	20

3.5.4. Pokus číslo 4.....	20
4. VÝSLEDKY	21
4.1. POKUS Č. 1.....	21
4.2. POKUS Č. 2.....	21
4.3. POKUS Č. 3.....	21
4.4. POKUS Č. 4.....	22
5. DISKUZE	24
5.1. METODICKÁ OMEZENÍ.....	24
5.2. VHODNÉ MÉDIUM (3. A 4. POKUS).....	25
6. ZÁVĚR	26
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	27
8. PŘÍLOHA.....	29

1. Úvod

Rod *Tillandsia L.* jsou rostliny plné kontrastů. Rostou v tropickém deštném pralese, kde je ráno a v podvečer dostatek vody a nízké teploty a naproti tomu odpoledne teploty přesahují i 30 °C. Rostou však i ve vysokých horských oblastech, kde teplota často klesá pod bod mrazu a nacházejí se na místech, kde nemusí dlouhou dobu spadnout ani kapka vody. A přesto zde rostou, kvetou a rozmnožují se. Díky těmto až extrémním podmínkám jsou druhově rozmanité a lze si vybrat druhy vhodné pro pěstování na stinných místech, přímém slunci, v bytě i ve skleníku (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

Velmi málo víme o generativním rozmnožování druhů *Tillandsia L.* in vitro (Mekers 1977). Mnoho pěstitelů hledalo způsoby, jak nejlépe rozmnožit tyto zajímavé rostliny, ať už vegetativním, či generativním způsobem, pomocí meristémových kultur či jiných kultur aseptických.

V této práci jsem se zaměřil na aseptické kultury in vitro, kdy se získávají nové rostliny pomocí semen rostoucích a klíčících ve sterilním prostředí. Pokusy budou prováděny na pěti různých médiích při konstantní teplotě. Druhy použité v této práci jsou vesměs snadno dostupné, kromě obchodně ceněné *Tillandsia gardneri*, která je primárním pokusným objektem.

2. Literární přehled

Rod *Tillandsia L.* patří mezi jednoděložné rostliny. Je zařazen do čeledi *Bromeliaceae Juss.*, která čítá přes 2000 druhů. Rostliny této čeledě se nacházejí na amerických kontinentech. V příloze č 2 je uvedeno přibližné rozdělení. Rod *Tillandsia L.* je rozšířen převážně v Latinské Americe, pouze několik druhů se vyskytuje v jižní oblasti USA. Jejich nejsevernější přirozená oblast výskytu je cca 40° severní šířky a nejj jižnější okraj výskytu je 45° jižní šířky. Tento rod je pojmenován podle švédského botanika Tillandse. Již na začátku minulého století byli dováženi do Evropy první zástupci rodu *Tillandsia L.* pro zahradnické, množitelské a šlechtitelské účely (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

Většina druhů rodu *Tillandsia* jsou vytrvalé oddenkaté byliny (Maruška 2001). Mnoho druhů rodu *Tillandsia L.* se velmi snadno zamění s podobně vypadajícími rostlinami rodu *Vriesea Lindl.* Pro správně zařazení rostlin musíme počkat na kvetení, kdy na rozdíl od *Tillandsia L.* mají *Vriesea Lindl.* srostlé okvětní lístky (Maruška 2001).

2.1. Stavba těla

U *Tillandsia L.* můžeme pozorovat velkou rozmanitost stavby těla. Velikost těla může být od několika centimetrů (*T. bryoides*) až po několika metrové obry (*T. grandis*) (Lukscheiter, Lukscheiter 2000). Stavba těla odráží přizpůsobení k extrémním podmínkám prostředí. Druhy rodu *Tillandsia L.* se vyznačují schopností využívat i malé množství vláhy v ovzduší.

2.1.1. Kořeny

Všechny známé druhy rodu *Tillandsia L.* vytvářejí kořeny, a to i známý druh *Tillandsia usneoides*, který tvoří pouze velice nepatrný kořen v počátečním stadiu. Xerofilní druhy mají velmi redukovaný kořenový systém (Maruška 2001).

Kořenová soustava je svazčitého typu s převahou adventivních kořenů. Životnost kořenů je 2 – 3 roky. Hlavní funkce kořenové soustavy je mechanická – přichycení k podkladu, na kterém rostliny rostou. U kořenů těchto druhů rostlin dochází během krátké doby ke sklerifikaci, čímž získávají kořeny neuvěřitelnou pevnost (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

2.1.2. Stonek

Jednou z nejméně nápadných částí rostlin je stonek. V mnoha případech bývá zkrácený až zakrnělý nebo velice podlouhlý a úzký. U některých druhů se vyznačuje stonek tzv. negativním geotropickým růstem. To znamená, že stonek těchto druhů roste směrem dolů. Tento jev je běžný zejména u epifytů. Pokud je negativní geotropismus vyvinut u rostlin rostoucích na vodorovném podkladu, pak stonky rostou všemi směry. U všech druhů rodu *Tillandsia L.* je růst stonku ukončen květenstvím. Kvetení evokuje u většiny matečních rostlin tvorbu dceřiných rostlin a mateční rostlina odumře do několika let. U některých druhů dozrají pouze semena a rostlina odumře (Rauh 1990).

2.1.3. Listy

Listy jsou bezpochyby u všech rodu *Tillandsia L.* nejzajímavější a nejrozmanitější částí celé rostliny a pro její přežití mají největší význam (<http://kkplzen.eu>). Mohou být protáhlé s podélnou nervaturou, v mnoha případech mají na povrchu speciální trichomy. Listy jsou značně tvarově variabilní, mohou být ploše řemenovité nebo až čárkovité s okrouhlým či trojúhelníkovitým průřezem. Mohou dosahovat velikosti i dvou metrů, ale u miniaturních druhů také pouze několika milimetrů. Listy většiny druhů mají sukulentní charakter (Rauh 1990).

List jako celek je dále dělen na listovou čepel a listovou pochvu. Listová pochva objímá stonek rostliny nebo mladší listy. Listová čepel je umístěna na těle rostliny směrem do volného prostoru. Přejít mezi oběma částmi listu může být zcela rozdílný, a to i barevně, kdy přechod může být buď plynulý, nebo téměř neznatelný (Rauh 1990).

2.1.4. Trichomy

Trichomy, stříbrné šupinky na povrchu těla, hrají v životě tilandsií důležitou roli. Tyto trichomy jsou přesněji označovány jako savé šupinky. Trichomy tilandsií slouží pro příjem vody a v ní rozpuštěných látek. Tuto vodu mohou využívat pouze v kapalně formě a přenášejí ji do prodloužených buněk uvnitř listu. Přes den, kdy na rostlinu svítí slunce a musí přežít vysoké teploty, jsou trichomy ploše rozloženy na povrchu listu. Zakryjí tak průduchy, a tudíž sníží výpar vody na minimum. Přitom jejich stříbrná barva efektivně odráží světlo a tím pádem nedochází k přehřátí rostlin. V noci, kdy je okolo rostlin vody dostatek, přijímá rostlina vodu a v ní rozpuštěné látky. Nejsou-li však listy vlhké, jsou průduchy pořád uzavřeny a rostlina ztrácí při vysokých teplotách minimální množství vody (Crawford 1989, Maruška 2001).

V noci, kdy je v ovzduší dostatečná vlhkost a průduchy jsou otevřeny, může rostlina přijímat potřebný oxid uhličitý. Poutá jej za pomoci enzymu PEPkarboxylázy do molekul organických kyselin, které ukládá do vakuoly. Z toho vyplývá, že *Tillandsia L.* nepotřebuje CO₂ přijímat přes den, neboť ho čerpá z nashromážděných zásob z předešlé noci. Syntéza cukrů pak probíhá přes den, kdy se CO₂ uvolňuje z organických kyselin a je následně zabudován do molekul sacharidů v reakcích Calvinova cyklu. Tento zvláštní způsob fotosyntézy je pojmenován CAM (Crassulacean Acid Metabolism) (Procházka et al. 1998).

2.1.5. Květy a květenství

Květy rodu *Tillandsia L.* jsou uspořádány do klasu s různým stupněm nahloučení. Délka klasu a počet květů se u jednotlivých druhů liší. Klas může být jednoduchý nebo složený a je pak bočně tvarován na několik dalších klásků (Isley 1992). Vyskytují se rostliny, které mají klas redukovaný přímo v růžici rostliny (*T. ionantha*), které měří s květenstvím až dva metry (*T. utriculata*), klas s jedním květem (*T. andraina*) a druhy s klasem několikanásobně větveným na menší klásky (*T. duratii*). V období květu se květenství a celá rostlina dosti často zbarvuje do různých odstínů červené, fialové, růžové, ... (Spišiak 1993).

2.1.6. Plody a semena

Semeník u rodu *Tillandsia L.* je svrchní a plodem je třípouzdrá tobolka. Každá rostlina produkuje různý počet tobolek. Například *Tillandsia albertiana f. Vervoorst* produkuje pouze jednu tobolku, naproti tomu monokarpický druh, jako je například *Tillandsia guatemalensis* L.B.Smith, produkuje tobolku na desítky. Při procesu zrání tobolky vysychají a zmenšují se. Semena jsou seskupena v apikálním konci tobolky. Dozrání semen v tobolce trvá podle druhu 3 měsíce až 2 roky. Tobolka se pak otevře, zpravidla na tři části, a ochmýřená semena jsou připravena na transport větrem (Isley 1987).

Semena jsou uložena v tobolkách a mají chmýří. Ochmýření může být jednoduché nebo dvojité. Rostlina využívá chmýří k usnadnění transportu semen pomocí větru a také k následnému uchycení na vhodný podklad, kterým jsou v přírodě především koruny stromů, kaktusy, jiné rostliny či skály. Chmýří je uspořádáno ve formě padáčku, a proto mohou být semena unášena větrem na značné vzdálenosti (Rauh 1990). U *T. gardneri* jsou padáčky zdvojené. Jeden se nachází nad semenem a druhý na konci stonku. Toto přizpůsobení napomáhá lepšímu rozšiřování semen (Spišiak 1993).

2.2. Nároky na pěstování

2.2.1. Světlo

Každá rostlina potřebuje ke svému životu světlo a *Tillandsia L.* není výjimkou. Druhy rodu *Tillandsia L.*, které mají širší a měkčí listy, žijící v zápoji vegetace nížinných tropických lesů, kde je značná limitace světlem. Jsou sytě zelené a pěstujeme je v polostínu či ve stínu. Jejich listy jsou uzpůsobené pro maximální intenzitu fotosyntézy při malých hladinách ozáření (Ježek 1996).

Stříbrné zbarvení rostlin se objevuje v tropických lesích vyšších nadmořských výšek a s přibývajícím nadmořskou výškou se tato barva stává intenzivnější. Toto zbarvení představuje ochranu před přímým slunečním svitem. Stříbrný povrch pomáhá odrážet sluneční paprsky a rostlina má menší výpar vody. Těmito způsoby se zabráňuje přehřátí rostliny (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

2.2.2. Voda

Kvalita vody je pro druhy rodu *Tillandsia L.* velice důležitá. V přírodě přijímají rostliny měkkou dešťovou vodu a tak by to mělo být i u zálivky. Příliš tvrdá voda způsobuje u *Tillandsia L.* nahromadění soli na listech. Vzniklé soli znemožní činnost nasávacích šupin, obzvláště u stříbrných rostlin, a životaschopnost rostlin je omezena. Protože kořenový systém *Tillandsia L.* je přizpůsoben primárně pro úchyt na podložce a *Tillandsia L.* přijímají živiny celým svým povrchem těla, zálivka musí obsahovat také vhodné množství živin. V přírodě jsou živiny v dešťové vodě pouze v malém množství, což je třeba brát v úvahu také při dávkování tekutých hnojiv (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

Frekvence zálivky je dána ekologickou valencí druhu. Druhy rostoucí na níže položených tropických stanovištích mají stálý přísun vody, ba někdy jsou i naplněny vodou a jejich vyschnutí může způsobit i úhyn. Druhy žijící ve vyšších nadmořských výškách je ideální rosit ráno či večer, kdy je nejmenší sluneční aktivita (Maruška 2001). Zejména druhy pocházející ze suchých horských stanovišť jsou citlivé na přelití. Pokud je rostlina trvale ve vlhkém prostředí, kořeny a posléze celé rostliny odumírají. Riziko přelití je větší při nižších teplotách.

2.2.3. Teplota

Tillandsia L. z teplých tropických oblastí potřebuje k životu stálou teplotu, která by neměla klesnout pod 20 °C (<http://www.rostliny.net>). U ostatních druhů žijících ve vyšších nadmořských výškách se teplota během dne mění a kolísá v rozmezí od 2 až do 20 °C. Tyto výkyvy jsou pro jejich dlouhodobou existenci velice důležité. Teplotní minimum je u jednotlivých druhů rozdílné, ale v zásadě platí, že i druh v nížinných oblastech snese krátkodobé mrazy okolo 0 °C, ale pro jejich optimální růst to není vhodné (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

Kawollek W. (1992) uvádí, že optimální teplotní podmínky pro růst většiny druhů jsou 15 – 20 °C. Minimum se pohybuje v rozmezí od 8 do 10 °C a maximum je 40 – 45 °C.

Při generativním množení semen *in vitro* bylo pozorováno, že semenům vyhovuje nižší teplota (okolo 22°C) spíše než teplota 30°C a výše (Pickens et al. 2003).

2.2.4. Vzduch

Pohyb vzduchu je dalším důležitým faktorem pro zdravý růst *Tillandsia L.* Toto pravidlo platí pro všechny známé druhy *Tillandsia L.* Dostatečný pohyb čerstvého vzduchu podmiňuje nejen vegetativní růst, ale i nástup generativní fáze a vývoj květů (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

2.2.5. Minerální látky

Jak již jsem se zmínil výše, rostliny tohoto rodu přijímají živiny ve formě vodných roztoků. V přírodě je dešťová voda často obohacena prachovými částicemi a někdy i vícebuněčnými organismy, které do vody dodávají minerální látky (Lukscheiter, Lukscheiter 2000). Proto je důležité při pěstování *Tillandsia L.* přidávat do vody hnojiva, zajišťující rostlinám optimální přísun živin. Ze všech prvků je nejrychleji přijímán dusík a fosfor, dále draslík a vápník. Velmi intenzivně je spotřebovávána měď, mangan a z těžkých kovů olovo. Lze říci, že tento rod nemá vyhraněné požadavky na minerální látky, jejich koncentraci nebo vzájemný poměr (Chvastek 1992). Jak již jsem se zmínil výše, rostliny tohoto rodu přijímají živiny ve formě vodných roztoků. V přírodě je dešťová voda často obohacena prachovými částicemi a někdy i vícebuněčnými organismy, které do vody dodávají minerální látky (Lukscheiter, Lukscheiter 2000). Proto je důležité při pěstování *Tillandsia L.* přidávat do vody hnojiva, zajišťující rostlinám optimální přísun živin. Ze všech prvků je nejrychleji přijímán

dusík a fosfor, dále draslík a vápník. Velmi intenzivně je spotřebovávána měď, mangan a z těžkých kovů olovo. Lze říci, že tento rod nemá vyhraněné požadavky na minerální látky, jejich koncentraci nebo vzájemný poměr (Chvastek 1992).

2.3. Způsoby rozmnožování

Rozmnožovat rostliny jsme schopni v podstatě dvěma způsoby. Generativním množením, tj. množením semen, nebo vegetativním, tj. množením pomocí vegetativních částí mateřské rostliny. Každá uvedená metoda má své výhody a nevýhody (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

Jako výhodu u generativního množení lze zařadit možnost získání velkého počtu nových rostlin, jelikož mají velký počet semen. Nevýhoda je v pomalém růstu rostlin, které často vykvetou až za 4 až 8 let po výsevu (Maruška 2001).

Vegetativním způsobem získáme nové rostliny za relativně kratší dobu, ale v malém množství. U některých druhů vytváří mateřská rostlina pouze jednu novou dceřinou rostlinu. Při tomto způsobu rozmnožování je mateřská rostlina vysilována a během několika vegetačních období odumírá (Maruška 2001).

2.3.1. Vegetativní rozmnožování

Principem tohoto způsobu je oddělení nově vzniklé rostliny od rostliny mateřské. Nově vzniklé rostliny označujeme jako rostliny dceřiné či odnože. Většina druhů *Tillandsia L.* je schopna vytvářet odnože až při kvetení nebo po odkvětu. I u těchto rostlin lze vyvolat kvetení pomocí etylénových přípravků a tak napomoci větší tvorbě dceřiných rostlin. U druhů, které vytvářejí delší stonky, není tvorba dceřiných rostlin podmíněna přechodem do generativní fáze (Isley 1987).

Množství odnoží závisí na druhu a síle kvetoucí rostliny. Pokud vyrůstá z jedné rostliny více odnoží, mluvíme o vegetativním množení. Po několika letech vzniká na místo jedné rostliny zvětšující se trs. Dceřiné rostliny využívají zásobní látky mateřské rostliny. Jejich růst je pomalý a může trvat 1 – 4 roky. Mateřská rostlina pomalu chřadne a odumírá během dvou sezón a usychá, až si odnože vytvoří vlastní přichytné kořeny (Ježek 1996).

Oddělení dceřiné rostliny můžeme provést nožem, skalpelem nebo nově vzniklou rostlinu ulomit – zde hrozí poškození dceřiné i mateční rostliny.

2.3.2. Generativní rozmnožování

Jedná se o rozmnožování pomocí semen. Vše začíná při kvetení rostliny. Většina druhů *Tillandsia L.* je cizosprašná, ale některé druhy jsou samosprašné a u některých miniaturních druhů (*T. capillaris*) se vyskytuje kleistogamie (Shimizu, Takizawa 1998).

Při sprašování je nejběžněji používána metoda sprašování štětečkem a prsty. Prašník se opatrně se uchopí mezi prsty a pomalými pohyby se nechá pyl nalepit na štěteček. Poté se pyl přenesení na bliznu. Květy po tomto zákroku během několika hodin začnou vadnout a usychat. To je známka dobrého sprášení (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

Vývoj semen po opylení trvá velmi dlouho. Zrání semen může trvat 3 – 8 měsíců a v některých případech i déle. Přesná doba zrání není jednoznačná. Na dozrávání působí mnoho faktorů, jako jsou teplota, vzdušná vlhkost a světelné podmínky (Isley 1987). Při pozorování změny barvy semeníků jsou semena dostatečně vyvinutá a mají schopnost klíčit. Po puknutí semeníku se doporučuje rostlinu nerosit, ale napřed sebrat semena (Lukscheiter, Lukscheiter 2000). Po dozrání semena postupně ztrácejí klíčivost. V literatuře se uvádí, že po šesti měsících po dozrání klíčivost prudce klesá (Isley 1987). Zpomalit tento negativní jev můžeme, když uložíme semena do chladnějšího prostředí v době, kdy s nimi nemanipulujeme (Vondruš, ústní sdělení).

Techniky výsevu jsou rozmanité. Mezi nejpoužívanější metody patří výsevy na různé podložky. Nejvíce se používají neopracovaná balzová prkna, která mají výhodu v tom, že semena na ně snadno přilnou. Dále se používají všechny části dřeva jako borka, větve, či smotky větviček. Výsevu se provádějí i na záclonu či skelnou vatu, železné rošty s buničinou (Lukscheiter, Lukscheiter 2000). Při rozmnožování výsevem na podložku musíme dodržet určité podmínky, respektive dostatečnou vzdušnou vlhkost a pohyb vzduchu v pěstební místnosti (Ježek 1996).

Další způsob generativního rozmnožování je metoda aseptického výsevu. V principu jde o výsev semen na živnou půdu ve sterilních podmínkách. Využívá se stejné metody jako u rozmnožování orchidejí *in vitro* (Ježek 1996). Důležité je dodržet sterilní prostředí, které je jedním z kroků pro správné množení. Zajistíme to správnou dezinfekcí semen a pracovních pomůcek. Dále pracujeme většinou ve flow – boxu, který zajišťuje přísun vzduchu bez mikroorganismů (Maruška 2001).

Při způsobu rozmnožování *in vitro* jsou semena umístěna na živnou půdu, která obsahuje potřebné látky pro jejich klíčení a růst, který bývá zpravidla rychlejší. Největší problém je při

„vyláhčování“, tj. při přesunu rostlin z aseptických kultur v lahvích, do běžných pěstebních podmínek. V prvních několika dnech věnujeme semenáčkům zvýšenou pozornost (Ježek 1996).

2.4. Zkoumané druhy

V této práci jsem použil druhy *Tillandsia gardneri*, *T. pseudobaileyi*, *T. schiedeana*, *T. ferrisiana*, *T. small-sun*, *T. myosury* v. *gilessii*, *T. flabelata forma rubra*, *T. loliaceae*, *T. capillaris*, *T. didiscicha* PHA 911 a *T. spp.* PHA 830 (PHA 911 a PHA 830 jsou polní čísla). Blíže popisují pouze pár vybraných druhů.

2.4.1. *Tillandsia gardneri* Lindl.

T. gardneri (Obr. č. 1) tvoří listovou růžici a listy pokrývá hustá vrstva starších šupinek. Listy jsou tenké a ohebné. Květenství je bohaté, stříbřité, přecházející do světle růžové, květy mají zářivě růžovou barvu. Tento druh se vyskytuje v Ekvádoru a v Peru v nadmořské výšce do 1 600 m n. m. (Rauh 1990).



Obr. č. 1 *Tillandsia gardneri*

2.4.2. *Tillandsia pseudobaileyi* Sue Gardner

Tillandsia pseudobaileyi (Obr. č. 2) se řadí mezi jedny z nejzajímavějších druhů, jelikož má nezvyklou stavbu těla. Vytváří pravou cibuli, je myrmekofilní rostlinou. roste v trsech a je dobrým kandidátem pro vegetativní množení. Dceřiné rostliny někdy dospívají až po dvou letech. Dosahuje velikosti 20 - 30 cm (Isley 1987). Hranice areálu sahá od Mexika až po Nikaraguu. Roste v nadmořské výšce 300 - 1000 m n. m. (Rauh 1990).



Obr. č. 2 *Tillandsia pseudobaileyi*

2.4.3. *Tillandsia schiedeana* Stued.

Tillandsia schiedeana (Obr. č. 3) je značně variabilním druhem, lze rozlišit rostliny s různým stupněm sukulence, více či méně stříbřité, různě veliké. Většinou roste jako epifyt na koniferách nebo v dubových lesích ve výškách od 50 až do 2000 m n. m. Vyskytují se od Mexika a Antil do Kolumbie a Venezuely (Isley 1987). Tento druh lze snadno množit semeny a odnožemi (Shimizu, Takizawa 1998) Zajímavostí druhu jsou žluté květy, které nejsou u zástupců rodu *Tillandsia* L. příliš časté (Chvastek 1992).



Obr. č. 3 *Tillandsia schiedeana*

2.4.4. *Tillandsia ferrisiana* L. B. Smith

Roste epifytně v suchých lesích a křovinách. Je to druh s krátkým stonkem, ale velkým počtem listů. Velikost rostliny dosahuje 15 cm. Tvoří dvouřadé, jednoduché květenství s jedním, až dvěma květy, které jsou 2 – 6 cm dlouhé. Listy jsou tuhé a silně pokryté trichomy. Stáčejí se k jedné straně. Snáší přímé slunce. Je rozšířena v severozápadním Mexiku (Lukscheiter, Lukscheiter 2000).

2.4.5. *T. myosura* v. *gilliesii* Griseb. ex Baker

Vzhled *T. myosura* v. *gilliesii* (Obr. č. 4) připomíná „žebřík“. Na stonku najdeme dvě řady stříbřitě tuhých, silně dužnatých a tupými špičkami nazpět zatočených listů o velikosti 5 – 10 cm . Vytváří husté trsy. Přirazujeme ji v pomalu rostoucích, ale odolnějších rostlin. Květy jsou nenápadné, bílé barvy. Místo výskytu je v Argentině a Bolívii (Rauch 1990).



Obr. č. 4 *T. myosura* (www.h5.dion.ne.jp)

2.4.6. *T. loliacea* Martius ex Schultes f.

T. loliacea (Obr. č. 5) se řadí do miniaturní druh velký od 1 – 3 cm. Rostlina je vhodná do dobře větraného a polostinného místa ve vitríně. Tvoří jednoduché květenství 1 - 3 cm dlouhé se žlutozelenými květy (www.lukscheiter.cz) Tento druh se nachází v Bolívii, Brazílii,

Argentině a Paraguayi, kde se vyskytuje v nadmořských výškách od 200 – 1500 m n. m. (Shimizu, Takizawa 1998). Tento epifytní druh můžeme nalézt přichycen jak na stromech, tak i na skalách(www.bromelia.cz).



Obr. č. 5 *T. liliacea* (www.tillandsia-salz.de)

2.4.7. *T. flabellata* v. *rubra* Baker

T. flabellata v. *rubra* (Obr. č. 6) je epifytní druh, který je velice oblíbený, jelikož se může pěstovat i jako terestrická rostlina. Roste na stinných místech, ale přežívá i na přímém slunci, kdy se jeho světle zelené listy zbarví do červena. Květenství je červeně zbarvené. Roste na území Salvadoru, Guatemale, Mexiku a Nikaragui v nadmořské výšce 1000 – 1200 m n. M (anwyl.com).



Obr. č. 6 *T. flabellata v. rubra* (ssairplants.com)

2.4.8. *T. capillaris* Ruiz and Pav.

T. capillaris (Obr. č. 7) je stonkový druh s dvouřadými listy žijící epifytním způsobem na stromech i na skalách. Tenký stonek nese květenství s 2 – 3 žlutě zbarvenými květy. Je to přizpůsobivý druh. Který roste jak na přímém slunci, tak i ve stínu. Její rozšíření je od Mexika po Peru, Bolívii, Argentiny a Chile v nadmořské výšce 300 – 3500 m n. m. (www.lukcheiter.cz)



Obr. č. 7 *T. capillaris* (farm4.static.flickr.com)

2.4.9. *T. didisticha* H. B. K.

T. didisticha (Obr. č. 8) je druh s málo výrazným stonkem, který může nést až 30 cm dlouhé květenství. Listy jsou umístěné v hustě rozšířené růžici. Nalezneme ho v oblastech od Brazílie až po Paraguay, Bolívii a Argentinu. Vyhovuje mu méně vlhké prostředí na přímém slunci (Rauch 1990).



Obr. č. 8 *T. didisticha* (www.tillandsia-salz.de)

3. Materiál a metodika

3.1. Cíl práce

Cílem práce je prověření vhodnosti různých médií pro vegetativní množení kultur tilandsií in vitro. Práce je založená především na faktu, že kultury in vitro se v praxi dosud tolik nevyužívají. Botanické zahrady a sběratelé využívají spíše metodu přímého vysetí na různé podložky, jelikož je to méně pracný způsob rozmnožování.

3.2. Princip – aseptické kultury

Aseptická kultivace in vitro probíhá v přísně kontrolovaných podmínkách. Umožňuje nalézt vhodné podmínky pro klíčení a růst semen. Tyto podmínky jsou určeny stálou teplotou, která by se měla pohybovat okolo 25 °C a stoprocentní vzdušnou vlhkostí, která je utvářena uzavřením infúzních lahví víkem. A v neposlední řadě sterilním prostředím, které zajistí dostatečnou dezinfekci semen a všech nástrojů, včetně vzduchu ve flow-boxu. Dále je úspěšnost aseptické kultivace podmíněna vhodným druhem kultivačního média.

Pro sestavení metodiky byly využity literární prameny, které jsou dále citovány. Byly použity pěstební zkušenosti a poznatky Antonína a Ondřeje Lukscheiterových (ústní sdělení), Bohumila Vondruše a osobní zkušenosti.

3.3. Materiál

Rostlinný materiál, respektive semena tilandsií, jsou obtížně dostupná. Jelikož firmy v České republice nabízejí pouze vzrostlé dospělé rostliny, po dohodě s Mgr. Bohumilem Vondrušem jsme kontaktovali pěstitele. Od nich jsme získali semena druhů *Tillandsia gardneri*, *T. pseudobaileyi*, *T. schiedeana*, *T. ferrisiana* a *T. small-sun*, *T. myosury* v. *gilessii*, *T. flabelata forma rubra*, *T. loliaceae*, *T. capillaris*, *T. didiscicha* PHA 911 a *T. spp.* PHA 830 (PHA 911 a PHA 830 jsou polní čísla). Největším omezením práce bylo malé množství semen některých druhů. Jejich doplnění bylo v době vymezené pro bakalářskou práci nereálné. Řešení bylo v tom, že se sehnala semena jiných druhů. Prioritním druhem pro výzkum byla *T. gardneri* a dále druhy, jejichž semena byla nasbírána na původních lokalitách výskytu (*T. didiscicha* PHA 911 a *T. spp.* PHA 830), jelikož jsou na trhu pořád považovány za vzácnější sbírkové rostliny. Další druhy (*T. pseudobaileyi*, *T. schiedeana*, *T. ferrisiana* a *T. small-sun*, *T.*

myosury v. gilessii, T. flabelata forma rubra, T. loliaceae a T. capillaris) byly zařazeny do práce pro srovnání.

3.4. Postup při přípravě pokusů

V prvé řadě jsem za pomoci školitele připravil média MS 1/1, MS 1/2, Knudson C a Fetherstonovo médium (modif. Vš 2004) (příloha č 2). Ve všech svých pokusech jsem použil výše vyjmenovaná média. Postup byl u všech médií stejný. Do čisté 800 ml kádinky jsem nalil 300 ml destilované vody. Potřebné chemikálie jsem do kádinky dávkoval z připravených zásobních roztoků. Pak se přidalo dané množství sacharózy a vše se nechalo řádně rozpustit.

Po rozpuštění všech látek se kontrolovalo pH, ideální hodnoty se měly pohybovat okolo 5,4 až 5,6. Pro kyselá média se přidávala kyselina citrónová a pro zásaditá KOH. Po překontrolování a upravení pH jsem uvařil agar, který byl pro všechna média stejný a i jeho množství bylo stejné – 8 g/l. Agar se zředil 500 ml destilované vody a nechal se ohřát. Teplota nesmí přesáhnout 98 °C, jinak se v agaru zničí můstky, které zajišťují jeho viskozitu.

Dále jsem provedl kontrolu životnosti semen tetrazoliovým testem, který je založen na aktivitě mitochondrií. Když byla semena živá, roztok i semena se zbarvily do světle růžové barvy.

Semena získaná z tobolek se musela nechat odmastit a dezinfikovat. Odmaštění se provádělo propláchnutím devadesátisedmiprocentním roztokem lihu asi po dobu 45 sekund. Dezinfekce probíhala v roztocích různých látek. V prvním pokusu jsem použil chlornanu vápenatého, který jsem nechal působit po dobu 10 minut. V druhém pokusu jsem testoval různé druhy dezinfekčních roztoků a různou dobu aplikace. V dalších pokusech jsem pak použil roztoku chlorového vápna aplikovaného po dobu 15 minut. Po dezinfekci se semena přemístila do destilované vody, kde se očistily od dezinfekce.

Tento postup se prováděl pro každý druh zvlášť. Dalším krokem bylo umístění semen do infúzních lahví pomocí sterilních pinzet. Všechny lahve se poté uzavřely gumovou zátkou s otvorem pro molitan, který sloužil jako cesta pro odpařování vody a pro výměnu plynů (kyslík, CO₂). Pro menší pravděpodobnost kontaminace z vnějšího prostředí se ještě víko se zátkou zabalilo do alobalu.

Poté se naplněné lahve umístily do klimaboxu, kde se udržovala teplota na 25 °C. Vzdušná vlhkost v infúzních lahvích byla stoprocentní, vzdušná vlhkost okolního prostředí byla okolo 50 %. Denní režim osvětlení zde byl 12 hodin den a 12 hodin noc. Rozdělení rostlinných druhů do pokusů a použitá média jsou uvedeny v příloze číslo 3.

Pro zhodnocení pokusů jsem si určil 3 označení:

- aktivní – semena mají náznaky „bobtnání“, začínají zelenat a klíčit,
- neaktivní – semena jsou ve fázi neaktivní, kdy ještě nezačaly klíčit, nebo jsou „spálené“ dezinfekcí,
- plíseň – semena jsou špatně zdezinfikována, a tudíž celá láhev je kontaminována.

3.5. Uspořádání pokusů

3.5.1. Pokus číslo 1 (předběžný pokus)

Použil jsem všechna uvedená média, do kterých jsem vkládal semena těchto druhů: *Tillandsia L.*: *T. gardneri*, *T. ferrisiana*, *T. x small-sun*, *T. schiedeana*, *T. pseudobailey*. U *T. gardneri* jsem dával pět semen do pěti infúzních lahví. U ostatních druhů sedm semen do třech infúzních lahví.

3.5.2. Pokus číslo 2 (pokus s dezinfekcí)

V tomto pokusu jsem se zaměřil na nalezení nejvhodnějšího dezinfekčního činidla. Jako médium bylo využito pouze jedno, a to Fetherstonovo médium (modifikované Vondrušem – ústní sdělení). Druh testovaný na dezinfekci byl *T. gardneri*, od kterého jsem měl největší množství semen. Vyhodnocení jsem provedl kontingenční tabulkou s využitím testovacího kritéria Pearsonova chi-square.

3.5.3. Pokus číslo 3

V pokuse jsem testoval klíčivost semen pěti druhů tilandsií na všech šesti vybraných druzích médií. Druhy, se kterými jsem pracoval, byly *T. didiscicha* PHA 911, *T. spp.* PHA 830, *T. flabelata forma rubra*, *T. schiedeana* a *T. myosury v. gilessii*. Vkládal jsem po pěti až sedmi semenech do jedné infúzní lahve od každého média. Změněný počet semen a lahví byl způsoben malým množstvím semen od každého druhu *Tillandsia L.*

3.5.4. Pokus číslo 4

Pro poslední pokus jsem použil opět všech šest druhů médií. Získal jsem semena některých dalších druhů *Tillandsia L.*, o něž jsem pokus obohatil. Zkoumanými druhy byly *T. loliaceae*, *T. schiedeana*, *T. flabelata forma rubra*, *T. spp.* PHA 830 a *T. capillaris*.

4. Výsledky

4.1. Pokus č. 1

Výsledky prvního pokusu jsou shrnuty v přílohách č. 4 a 5. V průběhu prvního pokusu jsem sledoval pokusné druhy jednou za týden. Při první kontrole po týdnu jsem zjistil, že některá média jsou zkontaminovaná. Při dalších kontrolách jsem zjišťoval, že kultury všech druhů, kromě *T. schiedeana*, jsou zkontaminovány. Po domluvě se školitelem jsem usoudil, že problém byl v nedostatečné dezinfekci semen. Proto jsem provedl v rámci 2. pokusu testy vhodné dezinfekce (viz příloha č 3).

4.2. Pokus č. 2

Výsledky pokusu jsou uvedeny v tabulce č. 1. Nejvyšší účinnost mělo chlorové vápno aplikované po dobu 15 minut, druhý nejúčinnější způsob dezinfekce byla aplikace chlorového vápna po dobu 13 minut. Pro všech 8 pokusných dezinfekcí jsem zjistil statisticky průkazné rozdíly na 1 % hladině významnosti. Pro chlorové vápno (tj. 5 pokusných dezinfekcí) byla průkaznost nižší, tj. na 2 % hladině významnosti, což je ale stále méně než běžně ve statistice užívaných 5%.

Tab. č. 1: Průběh pokusu s různými roztoky dezinfekcí na *T. gardneri*.

dezinfekční roztok	délka (minuty)	10.6.	10.7.	6.8.	10.9.	10.10.
Chlorové vápno	11	X	X	X	X	X
Chlorové vápno	12	X	√	X	X	X
Chlorové vápno	13	X	X	√	√	√
Chlorové vápno	14	X	X	X	X	X
Chlorové vápno	15	X	√	√	√	√
Chloramin B	10	X	X	X	X	X
Domestos	10	X	X	X	X	X
Domestos	6	X	X	X	X	X
X	kontaminovalo					
√	nekontaminovalo					

4.3. Pokus č. 3

Při pokusu číslo 3 jsem pracoval se stejnými druhy médií jako při prvním pokusu (viz Příloha č. 2). Změnil jsem však po domluvě se školitelem počet lahví a semen podle dostupných druhů *Tillandsia* L. Semena každého druhu byla umístěna do 6 lahví, z nichž každá

obsahovala jedno ze šesti testovaných médií. Do každé lahve jsem umístil 5 – 7 semen, které se předtím dezinfikovaly v roztoku chlorového vápna po dobu 15 minut.

Při kontrole dne 11.12. 2008 jsem zjistil, že většina semen *T. myosura varieta gilessii* je neaktivní. Výjimkou byla semena umístěná v médiu Featherstnovo a MS plná + humáty.

Většina semen *T. schiedeana* byla neaktivní kromě semen umístěných v médiu Featherstnovo a KS, kde byla zjevná kontaminace mikroorganismy.

U *T. flabelata forma rubra* a *T. spp. PHA 830* jsem zjistil velkou kontaminaci semen, která byla pravděpodobně způsobena špatnou manipulací se semeny.

U *T. didiscicha* PHA 911 byla všechna semena aktivní.

Při kontrole lahví dne 13.1. jsem nezaznamenal žádné změny. Při poslední kontrole dne 26.1. jsem u *T. didiscicha* PHA 911 zjistil v médiu MS 1/2 + BAP + NAA růst asi 30 mm velké rostliny. U ostatních lahví s aktivními semeny docházelo teprve k růstu děložních listů .

Z výsledků vyplývá, že *T. myosura v. gilessii* a *T. didiscicha* PHA 911 lze množit na všech zkoumaných médiích. Jako univerzální medium pro všechny jmenované druhy lze použít MS GA3 + NAA a MS + humáty (viz Tab. č 2).

Tab. č. 2 Výsledná aktivita semen vybraných druhů v jednotlivých médiích v pokusu číslo 3.

medium	<i>T. myosura v. gilessii</i>	<i>T. schiedeana</i>	<i>T. flabelata forma rubra</i>	<i>T. spp. PHA 830</i>	<i>T. didiscicha PHA 911</i>
MS plná Nitra	✓				✓
KS	✓				✓
MS 1/2+NAA 2mg	✓	✓		✓	✓
MS+GA3+NAA	✓		✓	✓	✓
MS+humáty	✓		✓	✓	✓
Feathersnovo	✓			✓	✓

4.4. Pokus č. 4

Použil jsem stejný počet semen a infúzních lahví jako v pokuse č. 3 (viz výše). Nemohl jsem však použít semena všech druhů jako v pokuse č. 3, protože jsem neměl k dispozici dostatek semen.

Pokus jsem započal dne 16.12. Při kontrole 13.1.jsem zjistil, že většina semen je pořád v neaktivní formě. Kultury druhu *T.flabellata forma rubra* byly kompletně zkontaminovány. U *T.loliacea* byla aktivní semena v MS+GA3+NAA.

Dne 26.1. jsem zaznamenal nejvýraznější změnu u *T.capillaris*, kdy většina semen v prvních čtyřech médiích byla aktivní. U ostatních druhů jsem nezaznamenal žádné změny.

Dne 9.2. jsem nepozoroval žádnou změnu kromě *T.loliaceae*. V mediu MS 1/2+NAA 2mg bylo vidět nabobtnání tří semen z pěti. Ostatní stav semen se nezměnil.

V posledním pozorování dne 17.2 vyklíčily u *T.spp.* PHA 830 semena v KS, MS 1/2+NAA 2mg a MS+GA3+NAA mediích a u *T.loliacea* v mediim MS+humáty.

Po dokončení všech opakování jsem zjistil, že u *T. loliacea* a *T. capillaris* lze pro generativní množení in vitro použít všechna zkoumaná media. Jako univerzální medium pro všechny jmenované druhy lze použít MS GA3 + NAA a MS + humáty (viz Tab. č 3).

Tab. č. 3: Výsledná aktivita semen vybraných druhů v jednotlivých médiích v pokusu č. 4.

medium	<i>T.loliacea</i>	<i>T.schiedeana</i>	<i>T.flabellata forma rubra</i>	<i>T.spp. PHA 830</i>	<i>T.capillaris</i>
MS plná Nitra	✓				✓
KS	✓	✓			✓
MS 1/2+NAA 2mg	✓			✓	✓
MS+GA3+NAA	✓		✓	✓	✓
MS+humáty	✓		✓	✓	✓
Feathersnovo	✓			✓	✓

5. Diskuze

5.1. Metodická omezení

Úspěšnost explantátových kultur závisí nejen na stavu technického vybavení (flow-box, nástroje, infúzní lahve, kultivační podmínky ...), ale i na zkušenostech experimentátora. Ke kontaminaci materiálu dochází i v nejlepších laboratořích. Cílem proto bylo co nejvíce zminimalizovat negativní vlivy ohrožující pokusy.

V prvé řadě jsem všechny infúzní lahve sterilizoval. Nejprve jsem je vyčistil od nečistot a zbytků medií z minulých pokusů, poté jsem je sterilizoval v autoklávu. Všechny následující práce jsem prováděl ve flow-boxu. Před každým pokusem jsem zapnul flow-box 15 minut předem, aby byla zaručena čistota vzduchu do něj vháněného. Všechny nástroje, jako jsou skalpely, pinzety a petriho misky, jsem před a po každé manipulaci vydezinfikoval, navíc jsem nástroje namáčet v 100% lihu a ožehnul nad plamenem. Každou infúzní láhev jsem před otevřením otřel dezinfekcí. Při vkládání semen do láhve jsem manipuloval opatrně s nástroji i lahví, abych eliminoval na minimum možnou kontaminaci. Před každým pracovním postupem jsem si umyl ruce antibakteriálním mýdlem a ještě otřel hadříkem s dezinfekcí.

I přes tato opatření byla u 1. a 2. pokusu míra kontaminace značná. Během práce jsem však získal zkušenosti se zacházením s nástroji do té míry, že se mi podařilo eliminovat kontaminaci při zakládání kultur při 3. a 4. pokusu. Problémem zůstalo dlouhodobé dopěstování rostlin v aseptických kulturách, protože nebyly k dispozici vhodné kultivační prostory.

U pokusu číslo 3 jsem pozoroval postupnou klíčivost semen, která začala být patrná již od prvního týdne zkoumání pokusu. Při dalším pozorování 16. 12. podmínky byly pozměněny. V klimaboxu přestala fungovat regulace vzdušné vlhkosti, a lahve proto byly na dobu 1 týdne umístěny v provizorních podmínkách. Změnila se zejména teplota, která se pohybovala v rozmezí 18-20°C. Tato situace pozastavila klíčení semen. Pak byly lahve umístěny do náhradního kultivačního zařízení, kde byla teplota opět vyšší (kolem 25 °C). To mělo za následek opětovné zvýšení aktivity, které jsem zaznamenal při dalším pozorování dne 13.1. Klíčivost se zvýšila skoro o polovinu. Z průběhu pokusu č. 3 je zřejmé, jak podstatně podmínky při dopěstování ovlivňují výsledek pokusu.

5.2. Vhodné médium (3. a 4. pokus)

Z grafů č 1 a 2. lze vidět, že semena klíčila dobře ve třech médiích: MS 1/2+NAA 2mg, MS+GA3+NAA a MS+humáty. Na základě výsledků pokusů č. 3 a 4 lze jako univerzální media pro výsev vybraných druhů *Tillandsia L.* doporučit MS+GA3+NAA a MS+humáty.

Nejlepší výsledky jsem získal s kultivačním médiem MS 1/2+NAA 2mg , které v obou pokusech mělo největší počet infúzních lahví s aktivními semeny. Tyto výsledky byly získány ze dvou pokusů, které byly čtyřikrát opakovány. Použil jsem při nich stejná média a dostupná semena druhů *Tillandsia L.*

Maruška (2001) se zabýval klíčením semen na druzích *Tillandsia L* v rámci své studie vegetativního množení druhů *Tillandsia L.* Ve své práci jsem navázal na výsledky Marušky (2001) upřesněním vhodné doby dezinfekce. Vyzkoušel jsem dezinfekční činidla, která se v běžné praxi nejvíce používají. Potvrdil jsem úspěšnost dezinfekce chlorovým vápnem a upřesnil vhodnou dobu aplikace (13-15 minut).

Pickens et al. (2003) zkoumali množení in vitro pro druh *T. eizii*. Používali médium složené z agaru, sacharózy a NAA. Zkoumali vliv teploty na růst semen a rostlin *T. eizii*. Nejvhodnější teplota pro růst semen druhu *T. eizii* byla 22°C. Při 30°C bylo klíčení semen a růst rostlin pomalejší a rostliny neměly vzrostlý habitus jako rostliny při 22°C.

6. Závěr

V této bakalářské práci jsem prověřoval ve čtyřech pokusech aseptického množení in vitro klíčivost semen jedenácti druhů rodu *Tillandsia* L. (*Tillandsia gardneri*, *T. pseudobaileyi*, *T. schiedeana*, *T. ferrisiana*, *T. small-sun*, *T. myosury* v. *gilessii*, *T. flabelata forma rubra*, *T. loliaceae*, *T. capillaris*, *T. didiscicha* PHA 911 a *T. spp.* PHA 830) v šesti různých druzích kultivačních médií (viz příloha č.1).

Podmínkou úspěšného provedení pokusu byla vhodná dezinfekce semen. V pokuse s *T. gardneri* se nejlépe osvědčila dezinfekce chlorovým vápnem po dobu patnácti minut.

Ve dvou pokusech jsem testoval klíčivost semen různých druhů na všech šesti kultivačních médiích. Klíčivost semen byla patrná po dvou týdnech od vložení semen do infúzních lahví. Semena většiny zkoumaných druhů dobře klíčila v médiích MS+GA3+NAA a MS+humáty. Nejlepší výsledky byly získány pro médium MS 1/2+NAA 2mg.

7. Použitá literatura

- CRAWFORD R.M.M. (1989): Studies in Plant Survival. Blackwell, Oxford.
- DUCHEFA (2003 – 2005): Biochemicals plant cell and tissue culture. Duchefa.
- CHVASTEK J. (1990): Atlas tillandsií 1. Chvastek-editor, Frýdek-Místek.
- CHVASTEK J. (1992): Atlas tillandsií 2. Chvastek-editor, Frýdek-Místek.
- ISLEY P.T. III. (1987): *Tillandsia*. Botanical Press, Gardina, California.
- JEŽEK Z. (1996): Na lovu mexických orchidejí. Květ, Brno.
- JONES L.D. (1988): Native orchids of Australia. Reed, Australia.
- LUKSCHEITER A., LUKSCHEITER O. (2000): *Tillandsia* I. Ratio, Vimperk.
- MARUŠKA J. (2001): Průzkum množitelských a technologických metod u vybraných druhů rodu *Tillandsia* L. Diplomová práce, Zahradnická fakulta v Lednici na Moravě, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.
- MEKERS O. (1977): In vitro propagation of some *Tillandsiideae* (*Bromeliaceae*). Acta Hort. (ISHS) 78: 311-320.
- RAUCH W. (1990): Bromelien. E. Ulmer, Stuttgart.
- PICKENS K.A., AFFOLTER J.M., WETZSTEIN H.Y., WOLF J.H.D. (2003): Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. Hortscience, 38: 101-104.
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK, J. (1998): Fyziologie rostlin. Academia, Praha.
- SHIMIZU H., TAKIZAWA H. (1998): The new *Tillandsia* Handbook. Japan Cactus Planning Co. Press, Fukushima.
- SPIŠIAK J. (1993): Vyhodnotenie sortimentu rodu *Tillandsia* L. v ČSFR z pohľadu rozsahu a rozširovania zbierok, možnosti umnoženia a ich význam v domácom a zahraničnom obchode. Diplomová práce, Vysoká škola zemědělská v Brně.
- VOTRUBA M. (1987): Explantátové techniky (pro biotechnology a šlechtitele). Vysoká škola zemědělská, Praha.

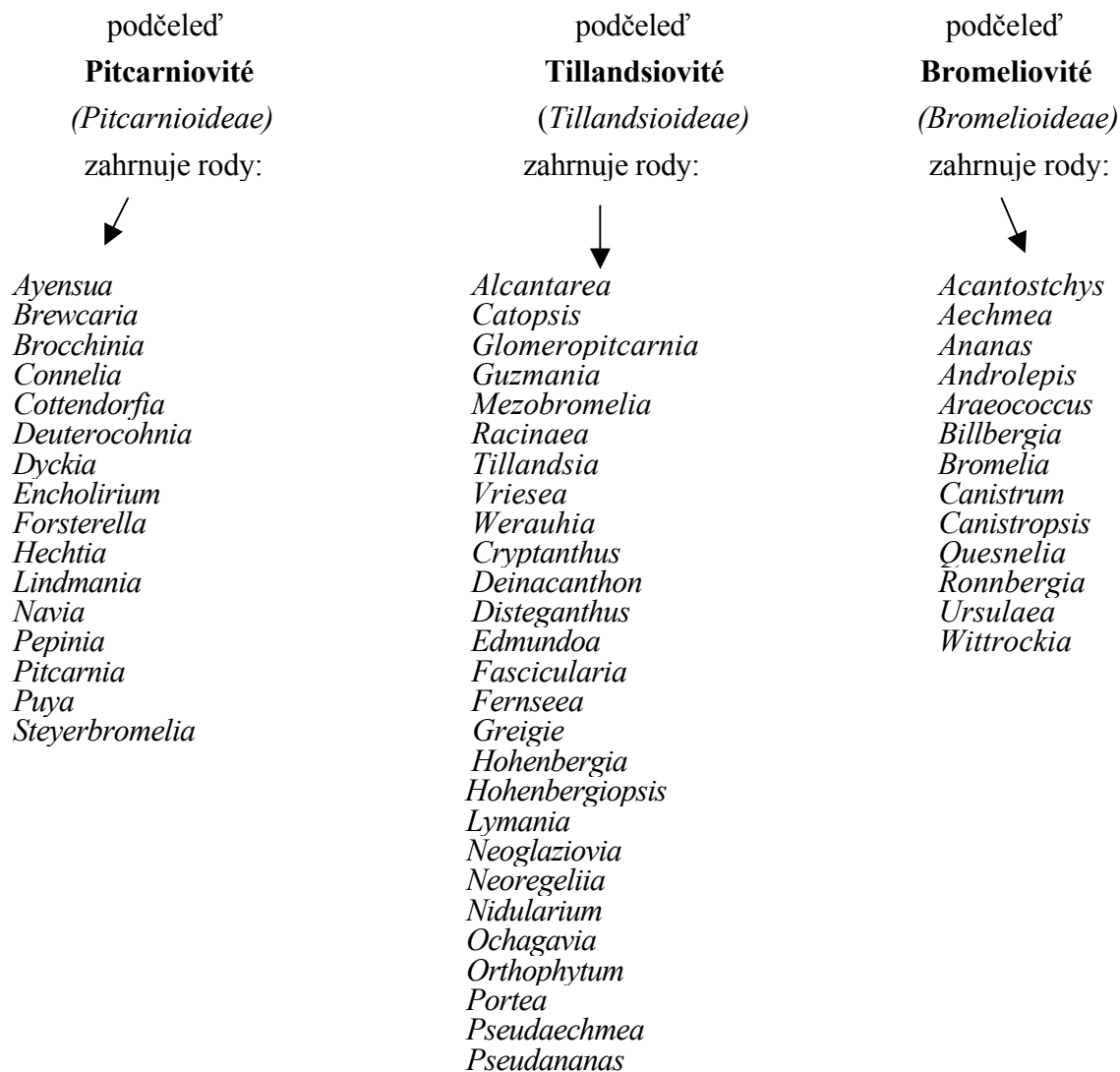
Internetové zdroje:

- kkplzen.eu (Klub kaktusářů Plzeň) (cit. 21.1.2008)
- www.bromelia.cz (cit. 20.3.2009)
- www.lukcheiter.cz(cit. 20.3.2009)
- www.rostliny.net (rostliny) (cit. 10.4.2008)

8. Příloha

Příloha č. 1 Taxonomie čeledi *Bromeliaceae*

Čeď Bromeliovitě (*Bromeliaceae*)



Příloha č. 2 Popis druhu médií a jejich komponentů

1) MS

- Sacharóza 20 g/l
- Agar 8 g/l

A. Makrokomponenty

- NH_4NO_3 66 g/l
- KNO_3 76 g/l
- $CaCl_2 \times 2H_2O$ 17,6 g/l
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ 14,8 g/l
- KH_2PO_4 6,8 g/l

B. Mikrokomponenty

- H_3PO_3 620 mg/l
- $MnSO_4 \times 4H_2O$ 2230 mg/l
- $ZnSO_4 \times 4H_2O$ 860 mg/l

C. Mikrokomponenty

- KI 83 mg/l
- $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ 25 mg/l

D. Mikrokomponenty

- $CuSO_4 \times 5H_2O$ 2,5 mg/l
- $CoCl_2 \times 6H_2O$ 2,5 mg/l

E. Mikrokomponenty

- $Na - EDTA$ 7,65 mg/l
- $FeSO_4 \times 7H_2O$ 5,57 g/l
- *m*-inozitol (cukerný alkohol) 2,5 g/250ml
- *Glycin* (aminokyselina) 20 mg/250 ml

„Hormony“

BAP (benzylaminopurin – syntetický cytokynin)

IBA (betaindolylní kyselina)

NAA (alfanaftylacetová kyselina)

IAA (indolylacetová kyselina)

2,4D (2,4 – dichlorfenylacetová kyselina)

GA3 (kyselina gibberelová)

ADP (adenozid difosfát) 30 mg/300 ml

PABA (paraaminobenzoová kyselina) 0,0625 g/l

kyselina nikotinová 1 mg/l

<i>pyridoxin (B₆)</i>	10 mg/l
<i>thiamin (B₁)</i>	30 mg/l

2) Knudson C

<i>Ca(NO₃) x 4H₂O</i>	1 g/l
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	0,5 g/l
<i>KH₂PO₄</i>	0,25 g/l
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	0,25 g/l
<i>FeSO₄ x 7H₂O</i>	0,025 g/l
<i>MgSO₄ x 4H₂O</i>	0,0075 g/l
<i>Sacharóza</i>	20 g/l
<i>Agar</i>	8 g/l

3) Fetherstonova formule (modif. Vř 2004)

<i>Sacharóza</i>	20 g/l
<i>Ca(NO₃)₂ x 4H₂O</i>	1 g/l
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	0,5 g/l
<i>KH₂PO₄</i>	0,25 g/l
<i>MgSO₄ x 7H₂O</i>	0,25 g/l
<i>Fe – chelát</i>	42,5 g/l
<i>MnSO₄ x 4H₂O</i>	7,5 g/l
<i>Vitamín C</i>	0,125 g/l
<i>Glycin</i>	5 ml/l
<i>Vitamín B₁ (thiamin)</i>	0,002 g/l
<i>Kyselina nikotinová</i>	0,001 g/l
<i>IAA</i>	0,001 g/l
<i>Agar</i>	8 g/l
<i>Derivát PABA</i>	0,0625 g/l
<i>GA3</i>	0,005 g/l
<i>Humáty</i>	2 ml koncentrátu/l

Příloha č. 3 Počet nekontaminovaných lahví se semeny druhů rodu **Tillandsia L.**

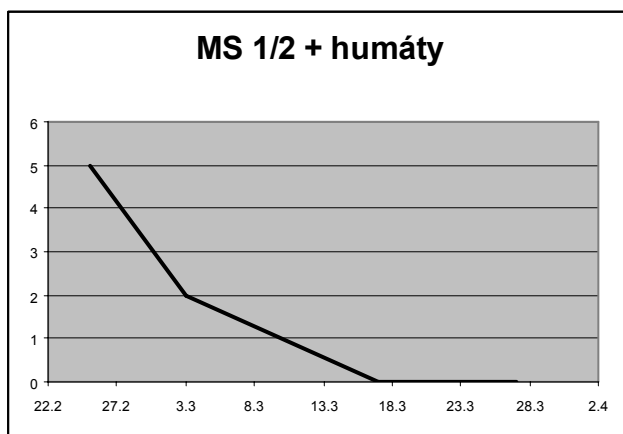
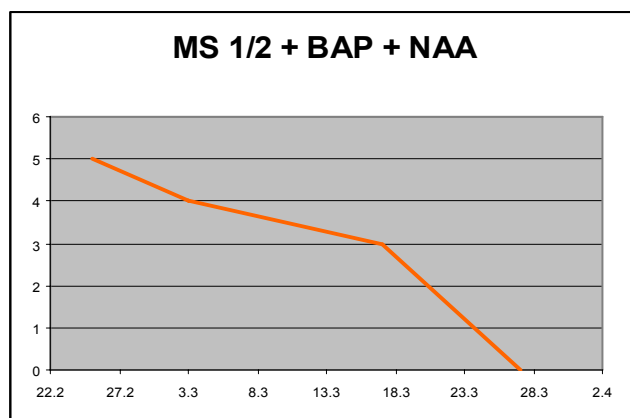
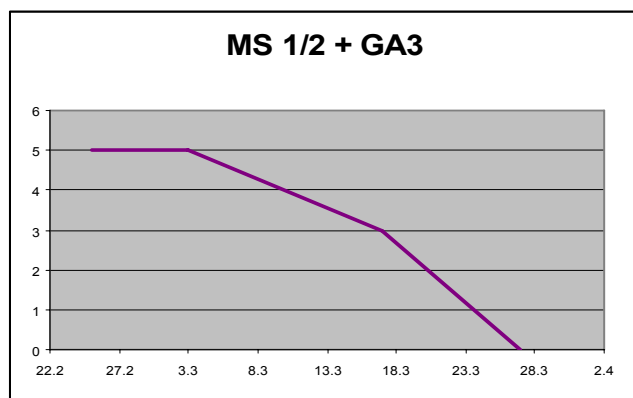
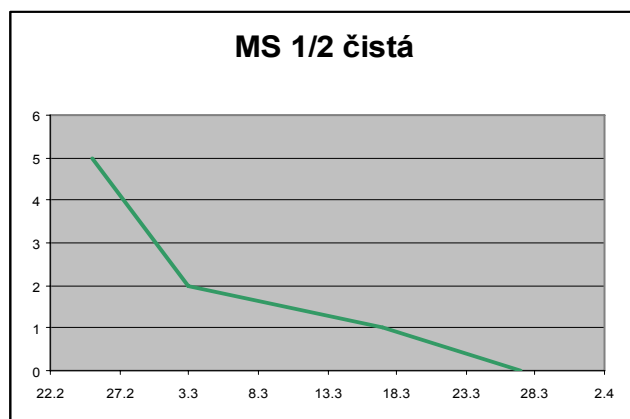
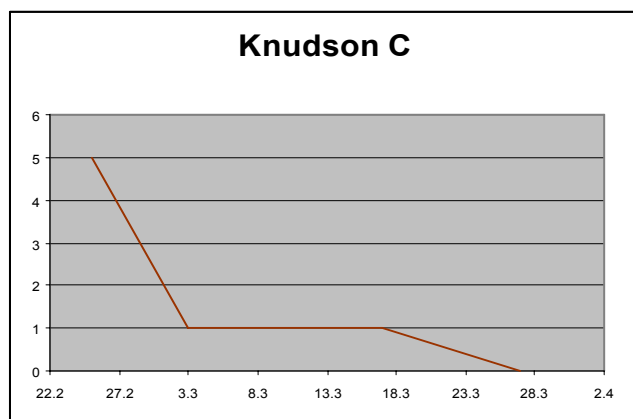
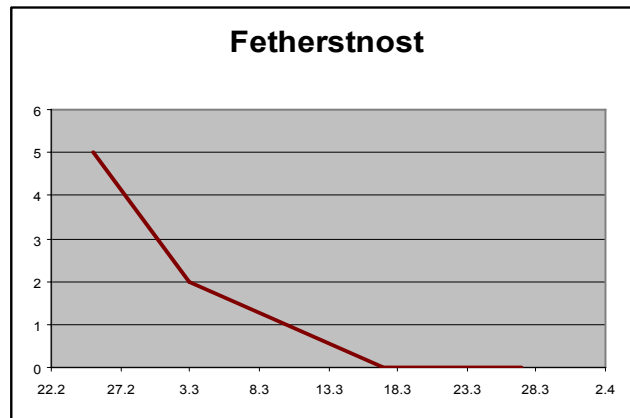
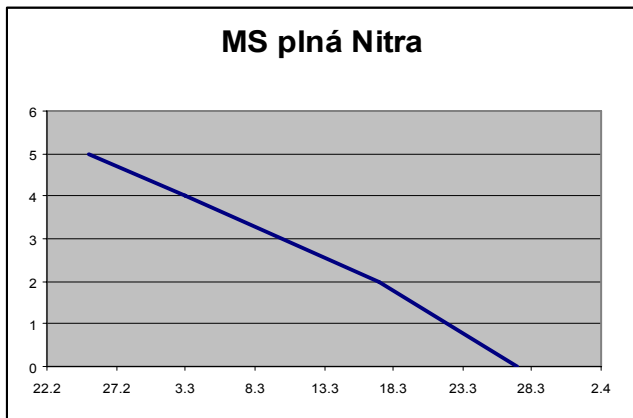
Celkový počet lahví daného druhu a média je uveden pro datum počátku pokusu (25.2.2008)

Použitá média:

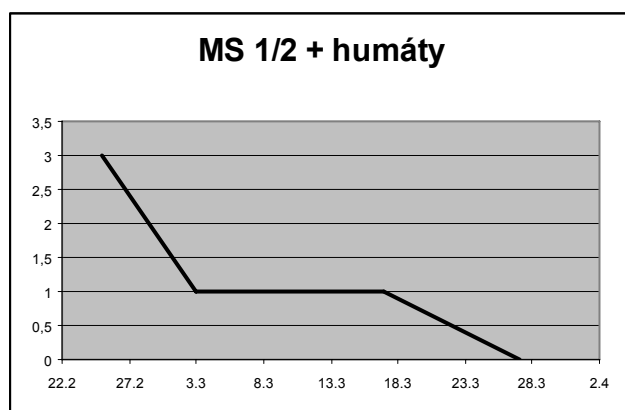
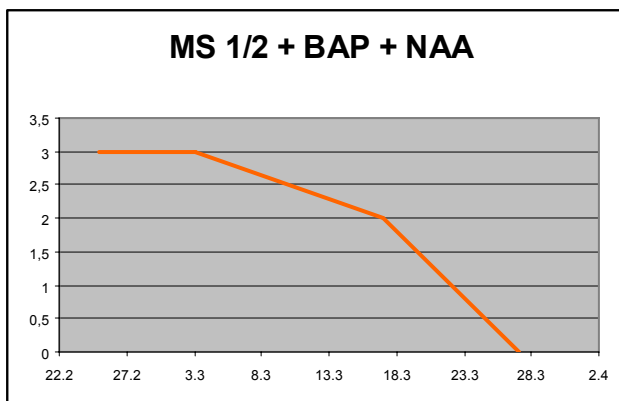
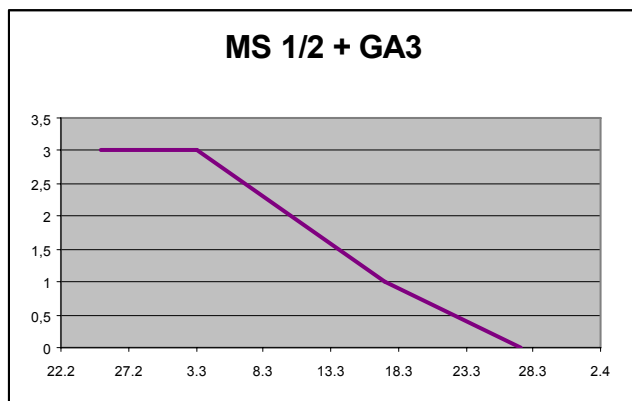
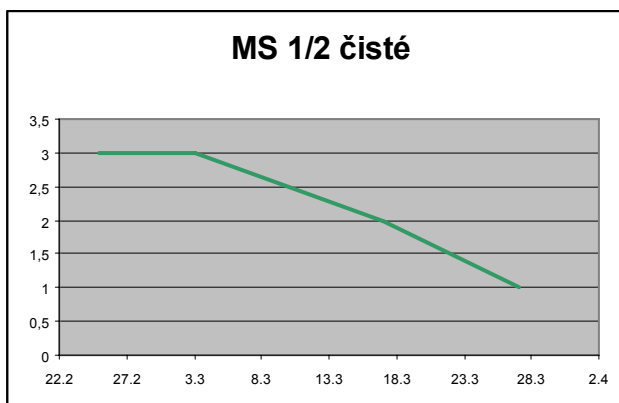
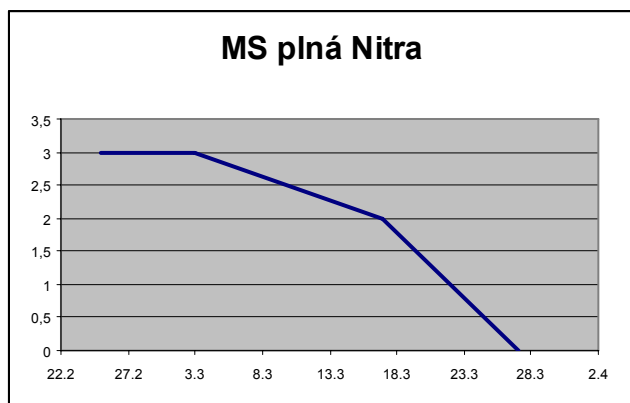
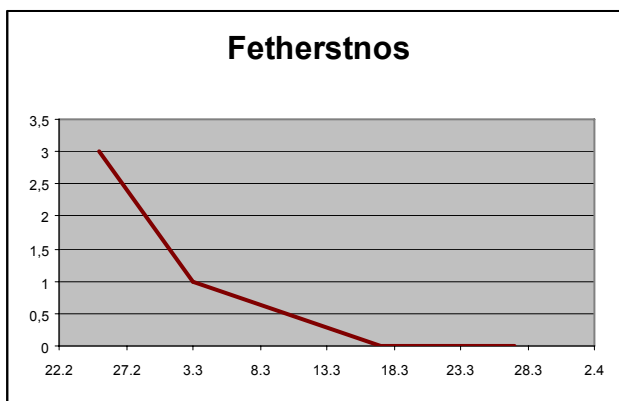
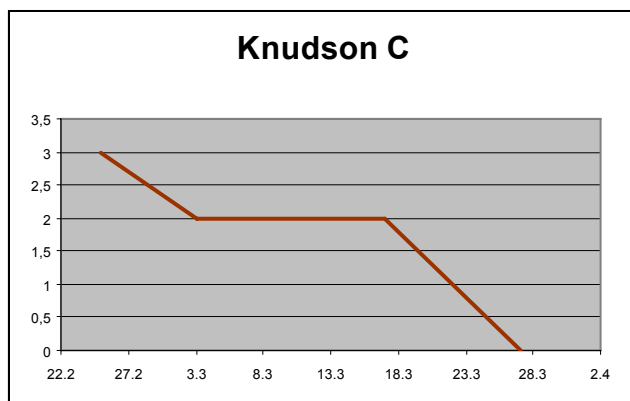
médium č.	název média
1.	MS plná Nitra
2.	Fetherstnos
3.	Knudson C
4.	MS 1/2 čisté
5.	MS 1/2 + GA3
6.	MS 1/2 + BAP + NAA
7.	MS 1/2 + humáty

nekontaminované dávky		Druh				
médium č.	datum	<i>T. gardneri</i>	<i>T. ferrisiana</i>	<i>T. x small-sun</i>	<i>T. schiedeana</i>	<i>T. pseudobailey</i>
1.	25.2.2008	5	3	3	3	3
	3.3.2008	4	0	0	3	3
	17.3.2008	2	0	0	3	2
	27.3.2008	0	0	0	3	0
2.	25.2.2008	5	3	3	3	3
	3.3.2008	2	0	0	3	1
	17.3.2008	0	0	0	3	0
	27.3.2008	0	0	0	3	0
3.	25.2.2008	5	3	3	3	3
	3.3.2008	1	0	0	3	2
	17.3.2008	1	0	0	3	2
	27.3.2008	0	0	0	3	0
4.	25.2.2008	5	3	3	3	3
	3.3.2008	2	0	0	3	3
	17.3.2008	1	0	0	3	2
	27.3.2008	0	0	0	3	1
5.	25.2.2008	5	3	3	3	3
	3.3.2008	5	0	0	3	3
	17.3.2008	3	0	0	3	1
	27.3.2008	0	0	0	3	0
6.	25.2.2008	5	3	3	3	3
	3.3.2008	4	0	0	3	3
	17.3.2008	3	0	0	3	2
	27.3.2008	0	0	0	3	0
7.	25.2.2008	5	3	3	3	3
	3.3.2008	2	1	0	3	1
	17.3.2008	0	1	0	3	1
	27.3.2008	0	0	0	3	0

Příloha č. 4 Časový vývoj kontaminace kultur *T. gardneri* při pokusu číslo 1.



Příloha č. 5 Časový vývoj kontaminace kultur *T. pseudobailey* při pokusu číslo 1.



Příloha číslo 6: Průběh aktivity semen u jednotlivých druhu *Tillandsia*

L. v průběhu pokusu číslo 3.

medium	datum odečtu			
	11.12.	16.12.	13.1.	26.1.
<i>T.myosury varieta gilessii</i>				
MS plná Nitra	#	√	√	√
KS	#	√	√	√
MS 1/2+NAA 2mg	#	√	√	√
MS+GA3+NAA	#	√	√	√
MS+humáty	√	√	√	√
Feathersnovo	√	√	√	√
<i>T.schiedeana</i>				
MS plná Nitra	#	#	#	#
KS	X	X	X	X
MS 1/2+NAA 2mg	#	√	√	√
MS+GA3+NAA	#	#	#	#
MS+humáty	#	#	#	#
Feathersnovo	X	X	X	X
<i>T.flabelata forma rubra</i>				
MS plná Nitra	X	X	X	X
KS	X	X	X	X
MS 1/2+NAA 2mg	X	X	X	X
MS+GA3+NAA	#	√	√	√
MS+humáty	√	√	√	√
Feathersnovo	X	X	X	X
<i>T.spp. PHA 830</i>				
MS plná Nitra	X	X	X	X
KS	#	#	#	#
MS 1/2+NAA 2mg	#	√	√	√
MS+GA3+NAA	#	√	√	√
MS+humáty	√	√	√	√
Feathersnovo	#	√	√	√
<i>T.didiscicha PHA 911</i>				
MS plná Nitra	√	√	√	√
KS	√	√	√	√
MS 1/2+NAA 2mg	√	√	√	√
MS+GA3+NAA	√	√	√	√
MS+humáty	√	√	√	√
Feathersnovo	√	√	√	√

aktivní	√
inaktivní	#
plíseň	X

Příloha číslo 7: Průběh aktivity semen u jednotlivých druhu *Tillandsia*

L. v průběhu pokusu číslo 4.

medium	datum odečtu			
	13.1.	26.1.	9.2.	17.2.
<i>T.loliaceae</i>				
MS plná Nitra	#	#	#	#
KS	#	#	#	#
MS 1/2+NAA 2mg	#	#	√	√
MS+GA3+NAA	√	√	√	√
MS+humáty	#	#	#	√
Feathersnovo	#	#	#	#
<i>T.schiedeana</i>				
MS plná Nitra	#	#	#	√
KS	X	X	X	X
MS 1/2+NAA 2mg	#	#	√	√
MS+GA3+NAA	#	#	#	#
MS+humáty	X	X	X	X
Feathersnovo	X	X	X	X
<i>T.flabelata forma rubra</i>				
MS plná Nitra	X	X	X	X
KS	X	X	X	X
MS 1/2+NAA 2mg	X	X	X	X
MS+GA3+NAA	X	X	X	X
MS+humáty	X	X	X	X
Feathersnovo	X	X	X	X
<i>T.spp. PHA 830</i>				
MS plná Nitra	#	#	#	#
KS	#	#	#	√
MS 1/2+NAA 2mg	#	#	#	√
MS+GA3+NAA	#	#	#	√
MS+humáty	#	#	#	#
Feathersnovo	#	#	#	#
<i>T.capillaris</i>				
MS plná Nitra	#	#	√	√
KS	#	√	√	√
MS 1/2+NAA 2mg	#	√	√	√
MS+GA3+NAA	√	√	√	√
MS+humáty	#	#	#	#
Feathersnovo	#	#	#	#

<i>aktivní</i>	√
<i>inaktivní</i>	#
<i>plíseň</i>	X

Příloha číslo 8: Kultivační místnost, v které probíhalo pozorování všech pokusů.



Příloha číslo 9: Kontaminovaná infúzní láhev.

