

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

zemědělská fakulta

katedra biologických disciplín

---

*studijní směr: zemědělská specializace*

*studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů*

MAGISTERSKÁ PRÁCE

**GENERATIVNÍ MNOŽENÍ TERESTRICKÝCH  
ORCHIDEJÍ METODOU *IN VITRO*  
(**GENERATIVE PROPAGATION OF SELECTED  
TERRESTRIALS ORCHIDS OF METHOD *IN VITRO***)**

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Hana Čížková, CSc

Konzultant:

RNDr. Hana Vejsadová, CSc a Mgr. Bohumil Vondruš

Autor práce:

Jiří Kyncl

---

2012

Kyncl J (2012): Generativní množení terestrických orchidejí metodou in vitro [Generative propagation of selected terrestrial orchids by method in vitro] 59 pp. + 1 pp. appendix, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotation**

We studied asymbiotic and symbiotic propagation of terrestrial orchids. There wasn't found statistical effect of organic nitrogen in the form of pepton for examined species of orchid in the asymbiotic propagation. There wasn't confirmed the positive effect of microelements and addition of carbohydrates (sucrose, glucose and maltose) on the germination of *Habenaria dentata*. Effects of various iron salts weren't striking to stimulate seed of *Cypripedium calceolus*. The effect of different isolates of mycorrhizal fungi in the symbiotic propagation wasn't statistically proven on investigated species of orchids. The effect of examined substrates (Akadama, volcanic sand and substrate Lukscheiter Orchid) wasn't statistically confirmed on growth of species *Spiranthes odorata* and *Bletilla striata*, when seedling of them were moved to *ex vitro* conditions.

## **Anotace**

Cílem práce bylo studium asymbiotického a symbiotického množení terestrických orchidejí. Při asymbiotickém množení nebyl zjištěn statistický vliv organického dusíku ve formě peptonu na zkoumané druhy orchidejí. U *Habenaria dentata* byl potvrzen pozitivnější vliv mikroelementů a přísad sacharidů (sacharóza, glukóza a maltóza) na klíčivost semen. Vliv různých železitých solí nebyl markantní na stimulaci semen druhu *Cypripedium calceolus*. Vliv různých izolátů mykorhizních hub při symbiotickém množení nebyl u zkoumaných druhů orchidejí statisticky prokázán. Při přesunu semenáčků do podmínek *ex vitro* nebyl statisticky potvrzen vliv zkoumaných substrátů (Akadama, lávový písek a orchidejový substrát Lukscheiter) na růst u druhů *Spiranthes odorata* a *Bletilla striata*.

## **Keywords**

*Orchidaceae*, mycorrhizal fungi, asymbiotic, symbiotic, propagation, medium

## **Klíčová slova**

*Orchidaceae*, mykorizní houby, asymbiotické, symbiotické, množení, médium

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

**V Českých Budějovicích, dne 25. dubna 2012 .....**

## **Poděkování:**

Děkuji všem, kteří mi s touto prací pomohli. Především chci poděkovat za vedení, cenné rady a nezlomnou trpělivost vedoucí práce doc. RNDr. Haně Čížkové, CSc. Dále RNDr. Haně Vejsadové, CSc za praktické rady a možnosti provedení experimentu v laboratoři VÚKOZ v Průhonicích. A v neposlední řadě děkuji i Mgr. Bohumilu Vondrušovi, za nezaplatitelnou pomoc při provedení experimentů v laboratoři v Homolích a jeho rady v celém průběhu studia.

<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>Cíl práce</b>	<b>9</b>
<b>1 Literární přehled</b>	<b>10</b>
1.1 ORCHIDACEAE .....	10
1.2 ŽIVOTNÍ CYKLUS.....	10
1.3 MORFOLOGICKÉ ZNAKY .....	10
1.3.1 STONEK .....	11
1.3.2 ZÁSOBNÍ ORGÁNY .....	11
1.3.3 KOŘEN.....	12
1.3.4 LISTY .....	12
1.3.5 KVĚT A KVĚTENSTVÍ.....	13
1.4 ROZDĚLENÍ TERESTRICKÝCH ORCHIDEJÍ PODLE VEGETAČNÍHO CYKLU .....	14
1.5 MYKORHIZNÍ SYMBIÓZA .....	14
1.5.1 ORCHIDEOIDNÍ MYKORHIZNÍ SYMBIÓZA .....	15
1.6 VYBRANÉ DRUHY ORCHIDEJÍ Z MÍRNÉHO PÁSMA .....	17
1.6.1 DACTYLORHIZA INCARNATA .....	17
1.6.2 DACTYLORHIZA MACULATA SSP. MAJALIS .....	18
1.6.3 CYPRIPEDIUM CALCEOLUS .....	19
1.7 VYBRANÉ DRUHY ORCHIDEJÍ Z TROPICKÝCH OBLASTÍ.....	21
1.7.1 BLETILLA STRIATA .....	21
1.7.2 HABENARIA DENTATA.....	23
1.8 MYKORHIZNÍ HOUBY.....	24
1.9 GENERATIVNÍ MNOŽENÍ.....	25
1.9.1 TECHNIKY KULTIVACE IN VITRO .....	25
1.9.2 POVRCHOVÁ STERILIZACE .....	26
1.10 ŽIVNÁ MÉDIA .....	26
1.10.1 SLOŽENÍ MÉDIA .....	27
1.11 VEGETATIVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ .....	29
1.12 PŘEVOD DO EX VITRO PODMÍNEK .....	30

<b>2</b>	<b>Materiál a metodika</b>	<b>31</b>
2.1	PRINCIP ASEPTICKÉ KULTURY .....	31
2.2	ROSTLINNÝ MATERIÁL .....	31
2.3	HOUBOVÉ IZOLÁTY .....	32
2.4	PŘÍPRAVA ŽIVNÉHO MÉDIA .....	32
2.4.1	METODY A ZALOŽENÍ VÝSEVŮ .....	33
2.5	POUŽITÉ PROGRAMY .....	34
2.6	POKUSY .....	34
2.6.1	POKUS Č. I - VLIV PŘÍDAVKU PEPTONU NA KLÍČIVOST U VYBRANÝCH DRUHŮ ORCHIDEJÍ .....	34
2.6.2	POKUS Č. II – VLIV RŮZNÝCH DRUHŮ MÉDÍ NA KLÍČIVOST ORCHIDEJÍ .....	35
2.6.3	POKUS Č. III – VLIV RŮZNÝCH DRUHŮ MYKORHIZNÍCH HUB NA KLÍČIVOST SEMEN .....	35
2.6.4	POKUS Č. IV- VLIV ŽELEZITÝCH SOLÍ NA KLÍČIVOST A RŮST CYPRIPIEDIUM CALCEOLUS .....	35
2.6.5	POKUS Č. V – VLIV DRUHU SUBSTRÁTU NA RŮST SEMENÁČŮ PŘI PŘENOSU DO EX VITRO PODMÍNEK .....	36
<b>3</b>	<b>Výsledky</b>	<b>37</b>
3.1	POKUS Č. I – VLIV PŘÍDAVKU PEPTONU NA KLÍČIVOST ORCHIDEJÍ .....	37
3.2	POKUS Č. II – VLIV RŮZNÝCH DRUHŮ MÉDÍ NA KLÍČIVOST ORCHIDEJÍ .....	40
3.3	POKUS Č. III – VLIV RŮZNÝCH DRUHŮ MYKORHIZNÍCH HUB NA KLÍČIVOST SEMEN .....	43
3.4	POKUS Č. IV - VLIV ŽELEZITÝCH SOLÍ NA KLÍČIVOST A RŮST CYPRIPIEDIUM CALCEOLUS .....	44
3.5	POKUS Č. V – VLIV DRUHU SUBSTRÁTU NA RŮST SEMENÁČŮ PŘI PŘENOSU DO EX VITRO PODMÍNEK .....	45
<b>4</b>	<b>Diskuze</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Seznam literatury</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Přílohy</b>	<b>60</b>

# Úvod

Čeď *Orchidaceae* se svým počtem druhů (přes 20 000) řadí mezi největší skupiny semenných rostlin na světě. Orchideje se vyskytují téměř po celém povrchu zemské souše, od tropických deštných pralesů, přes listnaté lesy mírného pásu, až po tundru (Baumann et al. 2009). S příchodem člověka a rozvojem kulturní krajiny jejich hojnost rapidně klesla. Změnou způsobu života lidí v druhé polovině minulého století se přešlo na intenzivní zemědělství a lesnictví, což způsobilo zánik mnoha stanovišť s výskytem orchidejí (Jersáková a Kindlmann 2004).

Přestože je čeď *Orchidaceae* fylogeneticky mladou skupinou, umožňující vznik kříženců mezidruhových i mezirodových. Je potřeba tyto jedinečné rostliny, jak způsobem života, tak i kombinacemi barev a tvarů květů, chránit a udržovat jejich přirozené prostředí a dávat možnosti vzniku nových orchidejových lokalit.

Všeobecně známé druhy čeledi *Orchidaceae* a jejich hybridy jsou převážně epifytní rostliny vyskytující se v tropických oblastech Jižní Ameriky či Asie. Většina z cca 50 druhů rostoucích v České republice jsou terestrické orchideje. Tyto druhy vytvářejí zvláštní soužití s mykorhizními houbami nazývané orchideoidní mykorhizní symbióza. Vzhledem k faktu, že semena těchto terestrických orchidejí neobsahují téměř žádné zásobní látky, nemohla by bez přítomnosti houbového endofytu vyklíčit (Gryndler et al. 2004). Tato symbióza způsobuje obtíže při *in vitro* kultivaci zvláště u těch druhů vstavačovitých, které jsou na mykorhize závislé ve velké míře. Také se snižuje úspěšnost jejich zpětného vysazení na původní lokality (Dykyjová 2003).



## Cíl práce

Diplomová práce se zabývala generativním množením ohrožených taxonů *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina*, *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*, *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza praetermissa*, *Habenaria dentata*, *Spiranthes odorata*, *Bletilla striata*, *Epipactis atrorubens*, *Spiranthes autumnolis*, *Epipactis helleborine*, *Himantoglossum hircinum*, *Nigritela nigra*, *Epipactis gigantea*, *Cephalus longifolia* a *Cypripedium macranthos* v podmínkách *in vitro* a *ex vitro*.

Byl studován:

- Vliv přidavku peptonu na klíčivost orchidejí,
- Vliv různých druhů médií na klíčivost orchidejí,
- Vliv různých druhů mykorhizních hub na klíčivost semen,
- Vliv železitých solí na klíčivost a růst *Cypripedium calceolus*,
- Vliv druhu substrátu na růst semenáčů při přenosu do *ex vitro* podmínek.

# 1 Literární přehled

## 1.1 *Orchidaceae*

Čeleď *Orchidaceae* je jedna z největších čeledí v rostlinné říši. Orchideje Vstavače rostou všude tam, kde se vyskytují cévnaté rostliny a jsou biologicky plastické. Největší hustota výskytu druhů orchidejí je však v tropech, okolo 90%, kdežto v obou mírných pásech se vyskytuje pouze 7% druhů orchidejí (Dušek a Křístek 1986). Od rovníku k pólům klesá diverzita druhů orchidejí. V tropických a subtropických oblastech se tyto rostliny přizpůsobily stinnému životu s nedostatkem světla v bylinném patře nebo se specializovaly jako epifytní organismy, které v korunách stromů dosáhnou snadněji k většímu světelnému záření (Baumann et al. 2009). Orchideje mírného pásu tvoří převážně terestrickou formu přizpůsobenou zásobními orgány na přežití v nepříznivém období (Dykyjová 2003).

## 1.2 *Životní cyklus*

Orchideje tvoří velké množství malých semen tvořených několika živými buňkami v suchém síťovitém osemení. Semena nemají zřetelné zárodečné vegetativní vrcholy. Jsou schopna pouze nabobtnání, poté musí tato semena infikovat mykorhizní houba, od které získávají potřebné živiny pro další vývoj (Sekera et al. 2006). Mnoho epifytických druhů je přizpůsobeno životu na jiných rostlinných družích, či jiném podkladě (Procházka a Velíšek 1983). Semena epifytických orchidejí se vyvíjejí v zelený protokorm, který se zvětšuje a tvoří v určité velikosti první list a poté první kořen (Sekerka et al. 2006).

## 1.3 *Morfologické znaky*

*Orchidaceae* se řadí do základní třídy jednoděložných – *Monocotyledones*, mají však množství modifikací těla podle přizpůsobení prostředí. Jak již bylo uvedeno, mnoho druhů roste na hostitelské rostlině (strom) – epifyty. Nejedná se o parazitismus, protože epifyty využívají hostitele jako podložku pro svůj růst a ne

jako zdroj živin. Další druhy rostou na skalách – petrofyty. Většina orchidejí mírného pásu tvoří terestrické formy (Sekerka et al. 2006).

### **1.3.1 Stonek**

Základní rozdělení všech orchidejí je podle stavby stonku, který roste sympodiálně či monopodiálně (Procházka 1980a). Sympodiální větvení lodyh je nejběžnějším způsobem růstu u většiny druhů orchidejí, kdy se stonek přizpůsobuje povrchu terénu i pod ním. Většinou tvoří oddemek s krátkými nebo dlouhými internodii (může růst i vzpřímeně – *Oncidium*). Z koncového pupenu každoročně vyrůstá nový letorost, který je základem pro všechny orgány (kořeny, listy a květenství). Po vegetačním období vyrostle ze stonku boční pupen, z kterého vyrůstají další rok nové orgány. U monopodiálních orchidejí má koncový pupen neomezený růst. Listy jsou umístěné ve dvou protilehlých řadách, u zakrucujícího se stonku vytváří spirálu (Dušek a Křístek 1986).

### **1.3.2 Zásobní orgány**

Terestrické orchideje tvoří podzemní orgány, které slouží jako zásobárna potřebných látek pro růst. Bývají to oddenky či hlízy, které lze zařadit do tří skupin. Hlíznaté orchideje přetrvávají období klidu v podobě jedné hlízy s pupenem, z něhož po ukončení vegetačního klidu vyrůstá nová rostlina s lodyhou s listy. Z bázi lodyhy vyrůstají kořeny a nově vzniká hlíza, potřebná pro přežití následujícího vegetačního klidu. Ke konci vegetačního období stará hlíza zaniká. Oddenkové hlízy tvoří druhy, které přečkávají období klidu formou oddenků s pupenem. U některých druhů vyrůstá dříve květní stvol, u některých zase listy, ale u převážné části druhů dochází k současnému růstu obou částí. Po dobu vegetačního období vytváří nové pupeny pro příští rok. Pahlízy bývají často zelené a slouží jako místo pro zásobní látky, ale také pro vodu. U orchidejí tohoto typu jejich bazální část stonkového původu po vytvoření listů tloustne a umožní vznik pahlízy nové. Stará pahlíza společně s kořeny a listy na konci vegetačního období odumírá (Sekerka et al. 2006).

U většiny epyfitních orchidejí prýt na bázi nebo po celé délce tloustne a vytváří tzv. pahlízy (pseudobulby). Tvar pahlíz může být kulovitý (*Coelogyne*

*cristata*), vejčitý (*Cymbidium*), vřetenovitý (*Cattleya*), nebo nepatrně naznačený (*Pleurothalis*). Tvar pahlíz se mění podle období a jejich stáří. V nepříznivých dobách sucha jsou scvrklé a obsahují malé množství vody (Dušek a Křístek 1986).

### **1.3.3 Kořen**

Kořeny orchidejí se vyznačují, na rozdíl od ostatních rostlin, mohutnější tloušťkou, málo větvenou strukturou, která často nevytváří kořenové vlášení (Sekerka et al. 2006). U druhů terestrických je kořen utvářen podobně jako u ostatních rostlin, které uskutečňují mykotrofii, potřebují zásobu živin a přichytit se v substrátu. Kořeny epyfitů mají navíc velamen, povrchovou vrstvu tlustostěnných buněk, naplněných vzduchem (Dušek a Křístek 1986). Tato vrstva odumřelých buněk slouží jako mechanická ochrana, ale především jako „píják“, který nasaje a zadrží vodu. Podle obsahu vody se mění průsvitnost a barva kořenů. Při zalití velamen zprůsvitní a kořeny zezelenají, protože živé buňky v kořenu obsahují chlorofyl a mají schopnost fotosyntézy (Sekerka et al. 2006).

### **1.3.4 Listy**

Listy jsou jednoduché, nedělené, pochvaté, střídavé, postavené ve spirále nebo dvouřadě, nejčastěji celokrajné. Terestrické druhy orchidejí tvoří listy jednoleté, tenké, a často přizemní. Žilnatinu je obvykle souběžná, vzácně síťovaná. Lodyhy jsou vzpřímené, buď porostlé zakrnělými šupinami, nebo listnaté (Procházka 1980b). Druhy zelené s mykotrofií mívají listy často zakrnělé (*Epipactis microphylla*), nezelené heterotrofní orchideje vytvářejí fylomy (jen jako lodyžní pupeny - *Neottia*). Některé taxony mají bazální listy zakrnělé v šupinách, které v dolní části lodyhy tvoří normální listy a směrem ke květenství se zmenšují a přecházejí na tzv. liánovité listy (*Dactylorhiza*, *Orchis*) (Procházka 1980b).

Epyfitické druhy orchidejí jsou často na bázi pahlíz šupinaté, v horní části jsou redukované listeny, které obvykle zasychají. Některé druhy tvoří bezlisté formy využívající pouze chlorofyl v kořenech (*Polyrrhiza*). Stavba listů se liší v závislosti na podnebí, ve kterém se rostlina nachází. Ve vlhkých oblastech se epifyty přizpůsobily dostatečnému přísunu vláhy měkkými listy s tenkou kutikulou. Naproti tomu, druhy rostoucí v suchých podmínkách mají xeromorfní listy. Jsou výrazněji ztlustlé a slouží jako zásobárna vody. Dále se přizpůsobily světelným podmínkám,

kdy druhy rostoucí v zastíněných místech, mají listy široké, masité, s poměrně tenkou kutikulou (*Phalaenopsis*). Druhy vyskytující se na přímém slunečním svitu tvoří listy také ztlustlé, ale kutikula je mnohem silnější a často mívá na povrchu šupiny pro lepší ochranu před výparem vody (Dušek a Křístek 1986).

### **1.3.5 Květ a květenství**

Nejvíce obdivované u orchidejí jsou jejich květy. Společná charakteristika pro všechny zástupce *Orchidaceae* je, že květy jsou složeny z pěti trojčetných kruhů. Květy bývají oboupohlavné, souměrné, výrazně zbarvené. Většinou vyrůstají v hroznovitých květenstvích, vzácněji jednotlivě. Květ tvoří 3 vnitřní okvětní lístky (intertepaly) a 3 vnější (extratepaly). Extratepaly, ze začátku tvorby květu, slouží k ochraně květu, obsahují chlorofyl a při rozvítí mění svojí barvu. Vnitřní kruh tvoří intertepaly, z nichž dva listy tvoří pár – jsou shodné barvou, velikostí a postavením. Horní list, odlišující se od ostatních se nazývá pysk. Bývá barevně i tvarově odlišen od ostatních – plochý, střevíčkovitě prohnutý, často laločnatý. V ostruže se tvoří nektar lákající potencionální opylovače. Zbývající tři kruhy má každý druh specifické. Dva kruhy patří samčím pohlavním orgánům. Další kruh náleží čnělce a blizně. Tyčinky u většiny druhů orchidejí se s vývojem zredukovaly na jednu či dvě (*Cypripedium sp.*). Pylová zrna jsou slepená v tzv. brylkách a jsou umístěny na tyčinkách, které srůstají s čnělkou ve sloupek (Dušek a Křístek 1986).

Semeník je vždy spodní a tvoří ho tři plodolisty. Semena neobsahují endosperm. Jsou to holá embrya, která se nacházejí v řídkém osemení. Ve vývoji květu většinou dochází k resupinaci, kdy se semeník překrotí o 180 – 360° (Sekerka et al. 2006).

Květenství tvoří jednoduchý hrozen vyrůstající z terminálu letorostu nebo z listových pochev na bocích výhonů. Hrozen je často větvený a tím vzniká lata. Orchideje terestrické mají květenství vzpřímená, kdežto u epifytických druhů bývají i převislá. Rozkvétání probíhá od báze květenství k vrcholu (akropetálně) a ve stejném pořadí i odkvétají. Velikost květů a délka květenství je variabilní v čeledích, rodech i druzích. Většinou platí pravidlo, že rostlina s velkým množstvím květů tvoří prodloužené květenství a květy jsou maličké (*Oncidium*), kdežto rostliny s menším krátké květenství je obvykle tvořeno robustními květy (*Phalaenopsis*) (Dušek a Křístek 1986, Procházka 1980b).

## ***1.4 Rozdělení terestrických orchidejí podle vegetačního cyklu***

Vegetační cyklus je faktor ovlivňující přizpůsobení orchidejí na nepříznivé periodicky se měnící podmínky během roku, čímž je myšleno především střídání ročních období (mráz v zimních měsících, suché letní dny, období srážek aj.), ale i adaptaci na stinné lokality. Sekerka et al. (2006) dělí orchideje na čtyři kategorie:

- o **Stálezelené** – zařazuje se sem většina tropických epifytních druhů.
- o **Středomořské** – oblast s teplejší zimou, vlhkým podzimním a zimním obdobím (Středozeří, jihozápad Afriky a jih Austrálie). Rostliny začínají rašit na podzim a přes zimu přežívají v zelené vegetační formě. Kvetení probíhá v jarních měsících a tvorba generativních orgánů se uskutečňuje do začátku suchého léta, kdy zatahují zpátky do země.
- o **Na jaře rašící** – do této skupiny patří druhy vyskytující se v oblastech se zimními mrazy, kdy hlavní období vegetace začíná v jarních měsících po nástupu vyšších teplot a rozmrznutí půdy. *Cypripedium* sp. a *Epipactis* sp. jsou zástupci, kteří kvetou v letních měsících a zatahují na podzim, kdežto někteří *Orchidaceae* zatahují na počátku léta, kdy je největší nárůst okolní vegetace.
- o **V létě rašící** – druhy vyskytující se v oblastech Himalájí a východní Asie, kde je pro ně limitujícími faktory chladná zima, relativně suché jaro a monzunové deště přicházející na začátku léta.

## ***1.5 Mykorhizní symbióza***

Termín symbiotismus poprvé použil v roce 1877 Albert Bernard Frank jako společnou koexistenci dvou a více organismů. Heinrich Anton de Bary v roce 1887 upřesnil tento pojem jako život parazita a hostitele, spojení organismů, kteří si navzájem pomáhají (Smith a Read 1997). Pojmem symbióza bývá označováno mnoho vztahů organismů – od symbiózy oboustranně výhodné (mutualismus) po symbiózu parazitickou, ve které jeden ze zúčastněných organismů přežívá na úkor toho druhého (Gryndler et al. 2004). V dřívějších dobách se vědci o tento zajímavý

vztah, mezi houbou a rostlinou, nezajímali do hloubky, jelikož byla symbióza známa jen u několik málo rostlinných druhů. V poslední době vědci objevili, že více než 80% rostlin sdílí symbiózu s mykorhizními houbami. De Bary (1887) věřil, že existují stupně symbióz mezi rostlinami a houbou. Tyto vztahy klasifikoval jako nekrotrofii a biotrofii, kdy záleží na tom, zda-li symbionti zůstávají naživu nebo jeden z nich musí nezbytně umřít, aby mohly být látky absorbovány druhým organismem v symbiotickém vztahu (Smith a Read 2008).

V mykorhizní symbióze jde o mutualistický vztah mezi rostlinným druhem a různými druhy hub. Některé druhy se postupem času dokázaly specializovat na určitý druh symbiózy. Koexistence se symbiotickými houbami přináší některým rostlinám přísun špatně dostupných minerálních látek (fosfor či dusík) a zároveň rostlina vyživuje houbu organickými látkami (Gryndler et al. 2004).

Mykorhizní symbióza se rozděluje do dvou odlišných skupin. První se nazývá arbuskulární mykorhiza, kdy proniká houbové vlákno dovnitř kořenových buněk rostliny, kde tvoří zvláštní struktury buněk (arbuskuly, vezikuly). Dalším typem je erikoidní mykorhiza tvořící symbiózu s velkou částí zástupců rostlin řádu *Ericales*. Houby této skupiny pronikají převážně do buněk rhizodermis. Zástupci *Ericales* jsou na houbách závislí, protože se vyskytují převážně na lokalitách s nedostatkem minerálních látek či nízkým pH (rašeliniště, vřesoviště). Do orchideoidní mykorhizní symbiózy se dají řadit pouze zástupci čeledi *Orchidaceae*, jejichž semena by v reálných podmínkách přírodních lokalit nevyklíčila bez pomoci symbiotických hub.

Zvláštní formu symbiózy tvoří heterotrofní rostliny, které nejsou schopny fotosyntetizovat. Rostlina je zcela odkázána na přísun potřebných látek od symbiotických hub, hovoříme o mykoheterotrofii. Ta se vyskytuje u některých hostitelských orchidejí žijících i v České republice – *Neottia nidus-avis*, *Corallorhiza trifida*, *Epipogium aphyllum* a *Limodorum abortivum* (Gryndler et al. 2004).

### **1.5.1 Orchideoidní mykorhizní symbióza**

Orchideoidní mykorhizní symbióza je specifická pouze pro rostlinné druhy čeledi *Orchidaceae*. První popis orchideoidní mykorhizy pochází již z 19. století, kdy Reissek (1847) jako první pozoroval zbytky houbových hyf stočených uvnitř rostlinných buněk *Neottia nidus-avis*. Mnoho poznatků o fungování tohoto soužití

mezi houbou a orchidejí dodnes chybí. Jedna z mála věcí, kterou můžeme s jistotou říci je, že všechny druhy terestrických orchidejí jsou závislé v počátečních stádiích vývoje zárodku na mykorrhizní houbě. Semena obsahují tak málo živin, že jim to stačí na „nabobtnání“ a bez přítomnosti houby by nebyla schopna dalšího růstu (Smith a Read 1997). Bylo zjištěno, že při počáteční infekci houbou, jsou hyfy vyživovány vyšší rostlinou. Hyfy se v další fázi kolonizace rozrůstají na úkor zásob hostitelových buněk (cukry, aminokyseliny, bílkoviny), až začnou samy hromadit rezervní látky (glycidy a dusíkaté sloučeniny) přijímané z půdního humusu pomocí jejich vláken. Jakmile se houbové hyfy přiblíží k jádru buňky hostitele v pásu fagocytózy, začínají se rozpouštět a hostitel získává nazpět svoje zásobní látky a zároveň získává sloučeniny fosforu a uhlíku od houby (Procházka 1980b). V dalších fázích vývoje, kdy rostlina vytvoří první fotosyntetický list, se závislost na příjmu živin od mykorrhizních hub zmenšuje či úplně zmizí (Gryndler et al. 2004).

Tak jako u jiných typů mykorrhizních symbióz, i u orchideoidní mykorrhizy rozeznáváme kořenové a mimokořenové mycelium (shluky vzájemně propletených vláken hub). Lépe prozkoumané je kořenové mycelium než mimokořenové. Mycelium je tvořeno přímými, často větvenými hyfami a takzvanými anastamózujícími hyfami a moniliodními buňkami vytvářejícími nejprve větévky, větve a poté anastamózují, čímž dají vzniknout shlukům těchto buněk (Gryndler et al. 2004).

V partnerském vztahu orchideje s houbou může vznikat jak parazitismus (kdy roli parazitujícího může přebírat jak hostitel, tak i mykorrhizní houba), nebo mohou tvořit mutualistickou symbiózu ve prospěch obou partnerů (Gryndler et al. 2004).

V současné době jsou popsány dvě formy mykorrhizní kolonizace kořenů orchidejí – tolypofágní a ptyofágní. Prvně zmíněná forma je běžnější a rozšířenější než ptyofágní a nachází se u protokormů a i dospělých rostlin. Typické vnitrokořenové útvary pro tolypofágní orchideoidní mykorrhizu jsou tzv. klubíčka. Vytváří se uvnitř primární kůry kořene, kde hyfy pronikají dovnitř buněk a zde se větví a vytvářejí splenou strukturu, přičemž houba posléze proniká do sousední buňky. Nedochozí však k přímému kontaktu s cytoplazmou jako u erikoidní mykorrhizy. Shluk hyf se obaluje plazmatickou membránou hostitele a po určité době kolabuje a tvoří útvar zvaný fagocyt, který může být znovu rekolonizován. U ptyofágního typu orchideoidní mykorrhizy dochází rovněž ke kolonizaci buněk



primární kůry, ale klubíčka hyf se dále nešíří do sousedních buněk (Gryndler et al. 2004). Při ptyofágii podléhají fagocytóze pouze konce hyf, kdy praskají a vylévají svou protoplasmu do „stravovacích“ buněk hostitele (Procházka 1980b).

## **1.6 Vybrané druhy orchidejí z mírného pásma**

### **1.6.1 *Dactylorhiza incarnata***

*D. incarnata* je hlíznatá orchidej dorůstající výšky 30 – 80 cm. Lodyhy jsou tuhé, duté, vzpřímené, rovnoměrně porostlé 5 – 8 neskvrnitými, světle zelenými, kopinatými listy s kápovitou špičkou. Od května do června vytváří úzce válcovité květenství s 15 – 60 květy a se zelenými, dlouze trojúhelníkovitými a výrazně vyčnívajícími listeny. Barva květů je růžová, světle až tmavě masově červená, ve výjimečných případech mohou vznikat albinotičtí jedinci. Spodní pysk je mělce trojlaločný, okrouhlý, ve středu s jednoduchou či dvojitou klikatou kresbou. Prostřední vnější lístek s vnitřním okvětím vytvářejí přilbu. Tlustá ostruha má kuželovitý tvar, na konci je tupá a mírně se sklání dolů (Baumann et al. 2006).

Tento druh má celoevropské rozšíření, areál sahá na sever Skandinávie, do hor jižního Španělska a po sever Balkánského i Apeninského poloostrova. *D. incarnata* se řadí mezi vlhkomilné druhy, můžeme ji nalézt na slatiništích, bažinách, na mokřích loukách do 2 400 m n.m. V Česku je její výskyt roztroušený, od nížin po podhůří. Středem areálu výskytu je střední Polabí a vyskytuje se i na Jižní Moravě ([www.naturabohemica.cz](http://www.naturabohemica.cz)).

*Dactylorhiza incarnata* patří do ohrožených a chráněných rostlin naší přírody, považuje se za indikátor vlhkých stanovišť. Největší ohrožení se skrývá v přeměně vlhkých luk – meliorace a vysušování. Naštěstí mnoho přirozených lokalit s tímto druhem spadá do chráněných území a je zde prováděn přiměřený management ([www.naturabohemica.cz](http://www.naturabohemica.cz)).



Obr. 1: *Dactylorhiza incarnata*

### **1.6.2 *Dactylorhiza maculata* ssp. *majalis***

*D. maculata* ssp. *majalis* má zploštělé hlízy a vyrůstá do výšky kolem 50 cm. Dutá lodyha je načervenalá se 4 – 7 lysými, kopinatě až elipticky utvářenými, hrubě skvrnitými listy. Květenství utváří válcovitý klas, který nese 7 – 35 nachových, růžových či vzácně bílých květů. Vnější lístky jsou obvykle skvrnité, vejčité, tvořící přílbu. Postranní lístky směřují kolmo vzhůru. Kresba pysku připomíná kličky, tečky či čárky, okraje má červenofialové (Baumann et al. 2009).

Tento poddruh se vyskytuje zejména ve střední a východní Evropě. Zasahuje na jih Skandinávie i na západ Sibíře. Preferuje vlhké louky a pastviny, slatiny, rašeliniště či okraje lučních pramenišť. Vyhovuje mu hlinitá půda s dostatkem živin.

V ČR se jeho výskyt považuje za roztroušený až vzácný, můžeme ho nejčastěji zahlédnout ve středně výškových polohách jako je Šumava nebo Krušné hory ([www.naturabohemica.cz](http://www.naturabohemica.cz)).

Ohrožení tohoto druhu není z globálního hlediska příliš velké, na našem území roste v poměrně velkém počtu, i když jeho přirozené lokality ubývají. Některé populace zanikly díky odvodňování vlhkých luk. Další ohrožení se skrývá pod „nájezdy“ pěstitelů orchidejí či vykopávání hlíz pro použití v lidovém léčitelství. Poddruh je uveden na Červeném seznamu cévnatých rostlin pod statutem „ohrožený“ a v mezinárodním seznamu CITES v kategorii B ([www.naturabohemica.cz](http://www.naturabohemica.cz)).



Obr. 2: *Dactylorhiza maculata* ssp. *majalis*

### **1.6.3 *Cypripedium calceolus***

Tato naše nejkrásněji kvetoucí orchidej je v České republice kriticky ohroženým druhem, který se řadí mezi chráněné rostliny (Sekerka et al. 2006). Tvoří geofytní formu s horizontálně plazivým oddenkem, který může u silnějších rostlin

tvořit více článků, a tím dává vzniknout hustým koloniím až s 43 květnosubnými lodyhami. Stonek tohoto druhu je dlouhý 30 – 60 cm s 4 – 5 lodyhami. V jarních měsících po období klidu vyrážejí lodyhy se silně žilnatými, široce eliptickými listy. Květenství raší od května do června a může mít 1 – 3 květy. Pysk je výrazně odlišný až citronově žlutou barvou od ostatních okvětních lístků, které jsou červenohnědé, lehce spirálovitě zatočené (Baumann et al. 2009).

Areál rozšíření tohoto druhu se nachází v mírném humidním až chladném boreálním pásmu euroasijské lesní podoblasti od Anglie a západní Skandinávie, přes Pyreneje, na Balkán, východní Ukrajinu, přes Ural až po severovýchodní Čínu. V nižších oblastech střední Evropy se vyskytuje ve světlých smíšených lesích s borovicí, dubem a habrem. V podhorských a horských oblastech obývá bučiny, často pod listím. V Čechách a na Moravě roste na minerálních půdách vápenito-jílovitých, na vápencích a opukách v nadmořské výšce 280 – 500 m (Baumann et al. 2009).

Dnešním největším ohrožením pro tyto rostliny je využívání krajiny v lokalitách přirozeného výskytu a změny v lesním hospodářství. Další nebezpečí představuje trhání a vykopávání rostlin z lokalit (Baumann et al. 2009). *Cypripedium calceolus* je jediný stěvíčnick striktně chráněný konvencí CITES. Je zařazen do evropského seznamu druhů přílohy A (Sekerka et al. 2006).





Obr. 3: *Cypripedium calceolus*

## ***1.7 Vybrané druhy orchidejí z tropických oblastí***

### ***1.7.1 Bletilla striata***

*Bletilla striata* se řadí se mezi nejvíce pěstovaných druhů v Japonsku pro její variety s pestrobarevnými listy. Vyskytuje se v Číně, Japonsku a východním Tibetu, kde roste v nadmořské výšce od 1 100 – 3 200 m (Pridgeon 1992; la Croix 2008).

Rostlina je až 60 cm vysoká s celokrajnými, protáhle oválnými listy, které jsou až 45 cm dlouhé a 4 cm široké. Květenství s 5 – 20 květy, v barvě přes růžovou, červenou až bílou, zdobí rostlinu v období května až června. Květy mohou vydržet kvést až měsíc ([www.botany.cz](http://www.botany.cz)).

Nalezneme ji při okrajích vlhčích lesů a lesních světlínách. Důležitým faktorem je teplota, která pro přežití druhu nesmí, klesnout pod  $-5^{\circ}\text{C}$  ([www.botany.cz](http://www.botany.cz)). Jako většina druhů čeledi *Orchidaceae*, je celosvětově chráněn a zařazen v příloze II mezinárodní úmluvy CITES.



Obr. 4: *Bletilla striata*



### 1.7.2 *Habenaria dentata*

Tento terestrický druh nalezneme v Asii od Himalájí, přes Čínu, Indii a Indočínu (Thajsko po Myanmar) v nadmořské výšce 500 – 1500 m ([www.icimod.org](http://www.icimod.org)). Je to vytrvalá bylina vysoká přibližně 30 – 80 cm. Listy jsou vejčitého tvaru střídavě uspořádané, 6 – 12 cm dlouhé a 2 – 3 cm široké ([www.hewo.com](http://www.hewo.com)). Stonek je vztyčený, často s trubkovitými pochvami. Ostruha má 4 cm a je delší než stopky a vaječník ([www.efloras.org](http://www.efloras.org)). Od srpna do října vytváří 5 – 12 cm dlouhé květenství s 3 – 13 bílými květy, které jsou 3 cm veliké ([www.hewo.com](http://www.hewo.com)).

Nalezneme ji v otevřených sekundárních trávnicích, poloopadavých a opadavých listnatých a suchých lesích nížin a savan ([www.orchidspecies.com](http://www.orchidspecies.com)). Vytváří hlízy, díky kterým přežívá nepříznivé období během zimy ([www.speciesorchids.com](http://www.speciesorchids.com)). Hlízy této rostliny se využívají k léčení např. bederních bolestí, hadího uštknutí, kašle, otoků a kýly v lidovém léčitelství ([www.hewo.com](http://www.hewo.com)). Pro využití hlíz tohoto druhu v domorodém léčitelství jsou vytvořena vývozní kvóty v rámci CITES, v níž je druh zařazen do přílohy II ([www.unep-wcmc-apps.org](http://www.unep-wcmc-apps.org)).



Obr. 5: *Habenaria dentata*

## 1.8 Mykorhizní houby

Čeled' *Orchidaceae* charakterizuje, alespoň v některé fázi vývoje, soužití s mykorhizními houbami. Tyto houby, se značnou taxonomickou diverzitou, patří většinou do třídy *Basidiomycetes* a v poslední době byla prokázána mykorhiza i s houbami z třídy *Ascomycetes*.

První provedl separaci kolonizovaných buněk z kořenového kortexu a jejich kultivaci na živném médiu Noel Bernard (1909). Popsal druhy *Rhizoctonia mucotroides* a *R. repens* (Bernard 1909). Nejčastěji se vyskytující mykorhizní houby u orchidejí se řadí do rodu *Rhizoctonia*.

Pro nedostatek, jiných než anamorfních stádií hub byla další determinace velice složitá, neboť anamorfní stádia jsou si velice podobná v morfologických znacích. Po 60. letech byla vyvinuta nová metoda, která umožňovala provést determinaci hub pomocí jejich reprodukčních orgánů (Trojanová 2006).

Zřejmě nejběžněji vyskytující se druh hub v kořenovém endofytu orchidejí je *Rhizoctonia repens*. Dalším častým druhem je *Tulasnella calospora* izolovaná z *Dactylorhiza purpurella* a jiných terestrických a i epifytických druhů orchidejí (Rasmussen 1995). Prokázalo se, že druhy jako *Rhizoctonia repens* jsou celosvětově rozšířené. Došlo se k závěru, že vztah mezi houbou a orchidejí, který vede k vytvoření mykorhizní asociace, je spíše nespecifický (Smith a Read 1997).

Mezi dalšími houbami tvořícími orchideoidní mykorhizní symbiózu nalezneme houby ektomykorhizní, řazené do oddělení *Basidiomycota* (např. rod *Cortinarius*) a několik rodů z oddělení *Ascomycota* (Beneš 2010) Tyto rody vytvářejí symbiózu s nezelenými druhy orchidejí (např. *Goodyera repens*), kdy tvoří asociaci se stromy a houby zprostředkovává přenos uhlikatých látek z ektomykorhizního hostitele do kořenové soustavy orchideje. Tyto domněnky byly potvrzeny v poslední době pomocí izotopově značených sloučenin (Trojanová 2006).



## 1.9 Generativní množení

### 1.9.1 Techniky kultivace *in vitro*

*In vitro* výsevy jsou důležitou metodou v záchranných programech po celém světě (McKendrick 2000). Orchideje tvoří stovky až tisíce malých semen, která obsahují malé množství zásobních látek. Němec (1941) ve své práci studoval hmotnost a počet semen u jednotlivých zkoumaných druhů, kdy vyšla nepatrná hmotnost semen (např. *Goodyera repens* – 2 mg, *Gymnadenia conopsea* – 8 mg) a jejich velké množství v tobolce (jedna tobolka *Cephalanthera damasonium* obsahovala asi 6 200 semen). Toto přizpůsobení pomáhá přemístění semen vodou pomocí disperze na dlouhé vzdálenosti, umožňuje tedy jejich šíření. Semena mají možnost vyklíčit v přírodě, ale dále nevyrostou bez infekce mykorhizními houbami rodu *Rhizoctonia* (McKendrick 2000). V laboratorních podmínkách mají všechna semena stejnou pravděpodobnost na vyklíčení, protože jim zajišťujeme ideální klimatické a výživové podmínky. Bylo vyvinuto mnoho druhů živných medií pro výsevy semen orchidejí. Prvním průkopníkem v tomto odvětví byl Ito z Japonska, který použil pro *in vitro* výsev nezralá semena rodu *Dendrobium* (Ito 1960).

Při aseptickém asymbiotickém výsevu se do živného média přidávají růstové regulátory (Halley 1970), aminokyseliny, dusíkaté organické látky, ale především zdroj uhlíku ve formě různých cukrů jako je sacharóza a glukóza, které nahrazují přítomnost mykorhizních hub, které jsou nezbytné při symbiotickém výsevu (Smith 1967, Andersen a Rasmussen 1996, Vejsadová 1996). Pro zpevnění média se přidává živného roztoku agar (Dušek a Křístek 1986).

Při symbiotických výsevech se aplikují houbové endofyty, které účinně stimulují klíčivost a růst rostlin. V prostředí s mykorhizními houbami, je proces růstu urychlen a další převod do podmínek *ex situ* je snazší než při asymbiotickém výsevu. Rostliny již mají vytvořenou symbiózu s houbami a při převodu do nového prostředí mají větší pravděpodobnost přežití (Baláž 1999).

## **1.9.2 Povrchová sterilizace**

Při symbiotickém i asymbiotickém výsevu je nezbytné, aby všechna média, nástroje, kultivační sklo a semena byly sterilní. Nesmí se stát, že se bakterie či spóry plísní dostanou do kultivačních nádob, kde mají zajištěné ideální podmínky s dostatkem živin pro rychlý růst a inhibici klíčení semen (McKendrick 2000).

Při přípravě výsevního média zajistíme sterilitu pomocí sterilizace v autoklávu. Musíme dodržet určitou teplotu, dostatečný tlak, správnou délku trvání sterilizace. Tyto podmínky zničí všechny bakterie a plísně nacházející se v médiu (McKendrick 2000).

Před umístěním do určených nádob musejí být sterilizována také semena. Povrchová sterilizací semen se odstraňují jak povrchové nečistoty, tak i inhibiční látky přítomné v testě. Odstraněním těchto negativních elementů je zvýšena pravděpodobnost vyklíčení. Některé práce poukazují na to, že dlouhodobým máčením semen lze odstranit nepropustnou testu (Burgeff 1959). Pokud máme semena v nezralé a neotevřené zelené tobolce, postačí pouze krátkodobě tobolku vystavit zvýšené teplotě nebo ji jinak povrchově sterilizovat. Jelikož většina sbíraných semen bývá ve zralém stavu, kdy je tobolka již naprasklá a infikována mikroorganismy, musíme využít jinou cestu dezinfekce. Semena se sterilizují se v roztoku chlornanu sodného nebo vápenatého (Wotavová et al. 2001) či pomocí peroxidu vodíku (McKendrick 2000).

## **1.10 Živná média**

*In vitro* média zajišťují semeni či rostlině potřebné množství živin, jak organických tak i anorganických. Dále jsou přidávány i organické regulační látky, které rostlina potřebuje pro další růst. V *in vitro* kulturách je také zajištěna vysoká vzdušná vlhkost pohybující se okolo 85 – 100%, výměna plynů je obvykle redukována pomocí polyesterové molitanové zátky ve víčku.

V dnešní době se používá mnoho druhů médií. Každé z nich bylo připraveno a využíváno pro jiný druh orchidejí. Jako první vytvořené médium a zároveň nejužívanější je MS (Murashige a Skoog 1962), jehož složení bylo publikováno v roce 1962. Složení je velice vyvážené, ale koncentrace solí je pro využití u

orchidejí vysoká, a proto se doporučuje používat poloviční koncentraci. Složení makro- a mikroelementů dalo základ pro ostatní druhy médií, která z těchto hodnot vycházela a liší se většinou odlišným obsahem organických dodatků.

Médium „Knudson C“ bylo využito jako první médium pro klíčení semen orchidejí, které využívá pouze anorganické látky společně se sacharózou, ale bez organických dodatků (Arditti 1964). Burgeff (1936) modifikoval médium „Knudson C“ na několik variant, kdy ve variantě „Eg1“ zaměnil sacharózu za glukózu a fruktózu. V „N3f“, které je vhodné pro kultivaci rodu *Paphiopedilum*, přidal kyselinu citronovou (Dušek a Křístek 1986).

### **1.10.1 Složení média**

Základními elementy, které se používají pro tvorbu média, jsou destilovaná voda (zdroj kyslíku a vodíku), anorganické a organické látky.

#### *Anorganické látky*

Anorganické látky jsou nedílnou součástí každého média. Řadíme sem makro- i mikroelementy. Mezi makroelementy řadíme dusík, draslík, fosfor, vápník, hořčík a síru. Dusík potřebuje rostlina pro tvorbu vegetačních orgánů. Dodává se do média ve formě amoniakální ( $\text{NH}_4^+$ ) nebo nitrátové ( $\text{NO}_3^-$ ).  $\text{NH}_4^+$  je špatně dostupná v kyselém prostředí, to znamená, že je zvýšen příjem  $\text{NO}_3^-$  (Dušek a Křístek 1986, Novák 1990).

Draslík je důležitý pro fotosyntézu, osmotický tlak a bobtnání protoplazmy. Ovlivňuje také tvorbu květů (Dušek a Křístek 1986). Využívá se i pro zvýšení klíčení, kdy se semena máčejí po určitou dobu v různých roztocích draselných solí, které poté zvyšují několikanásobně klíčivost (Arditti 1967). Fosfor stimuluje energetické pochody v buňkách a podílí se na tvorbě sloučenin a látkové výměně. Dodává se ve formě dihydrogenfosforečnanu. Vápník působí protikladně než draslík – zpevňuje stěny buněk, ovlivňuje dlouhivý růst buněk a neutralizuje kyselinu šřavelovou. Hořčík ovlivňuje tvorbu chlorofylu. Železo, zinek, molybden, bór a mangan řadíme k mikroelementům, které aktivují enzymy a ovlivňují metabolismus rostlin (Dušek a Křístek 1986).

## Organické látky

Základní organickou složkou média jsou sacharidy. I když u některých druhů terestrických orchidejí se prokázalo, že dokážou klíčit v *in vitro* podmínkách na pouhém agaru (Rasmussen 1995), většina druhů vyžaduje zdroj uhlíku ve formě sacharidů.

Rozpustné sacharidy (sacharóza, glukóza, fruktóza a maltóza), které mohou semena přímo využívat, se používají v asymbiotických kulturách (Rasmussen 1995, Wotavová et al. 2007). V symbiotických kulturách lze použít i ve vodě nerozpustné polysacharidy (škrob a celulóza), které jsou pro semena nedostupné, ale houbový symbiont je dokáže metabolizovat (Smith a Read 2008).

Dalšími látkami jsou aminokyseliny, které přidáváme jako zdroj dusíku a základní stavební jednotky bílkovin. Slouží i pro tvorbu chlorofylu a dalších složek buněčné plazmy. Do média přidáváme např. kvasničný extrakt, peptony či kaseinhydrolyzát, případně směsi známých aminokyselin jako nespecifický zdroj aminokyselin (Řízková 2001).

Nedílnou součástí média tvoří vitamíny. Přidává se především vitamín B<sub>1</sub> (thiaminu) a B<sub>6</sub> (proxidoxin), které pozitivně ovlivňují růst a látkovou výměnu a B<sub>3</sub> (niacin), který hraje roli v energetickém metabolismu buňky a podporuje klíčení orchidejí (Rasmussen 1995).

Růstové regulátory (fytohormony) regulují růst a vývoj rostliny. Mezi nejdůležitější regulátory řadíme auxiny a cytokininy. Auxiny podporují růst vrcholových meristémů stonku a kořenu. Nejběžněji užívané auxiny jsou syntetické (IBA, NAA), které nepodléhají tak snadno rozkladu jako indolyloctová kyselina (IAA), která je přirozeným auxinem. IAA podporuje prodlužování buněk a zakládání kořenů (Arditti 1967). Cytokininy stimulují dělení buněk a nepřímo i tvorbu pupenů. V kultuře *in vitro* se používá z přirozených cytokininů zeatin a 2iP, ze syntetických především kinetin, adenin či BAP (Vejsadová 2006, Beneš 2010).

Pro snížení pravděpodobnosti inhibice či tvorby nadměrného množství toxických metabolitů se do média přidává nejčastěji aktivní uhlí, které tyto nežádoucí látky dokáže na sebe absorbovat. Aktivní uhlí dále stabilizuje pH a také ztmavením média navozuje přirozené prostředí, a tím podporuje růst kořenové špičky (Řízková 2001).

V neposlední řadě se do média přidává agar, ztužovací agens. Tato látka je přírodní polysacharid s vysokou gelující schopností, který se vyrábí z mořských řas (*Gelidium Gracilaria* a *Acanthopeltis*). Agar se mění v tekutinu při teplotách nad 45°C a při ochlazení zase tuhne (Řízková 2001). Toho se využívá při přípravě média, kdy se všechny komponenty zahřejí na teplotu pod 100°C, aby se vše rozpustilo, a poté se nechá vzniklé médium ochladit. Teplota nesmí přesáhnout 100°C, aby nebyly poškozeny vodíkové můstky v molekulách polysacharidů. Aby médium ztuhlo, reguluje se pH, které se pohybuje okolo 6 – 7.

### ***1.11 Vegetativní rozmnožování***

V praxi se provádí vegetativní množení obtížněji než množení generativní. V podmínkách *ex situ* se uplatňují různé druhy množení (Sekerka et al. 2006). Všeobecně se využívá dělení zásobních orgánů, většinou rozdělením dospělé rostliny (Dušek a Křístek 1986). Další metodou je meristémové množení explantátů v *in vitro* podmínkách, které pracuje na principu preparace dělivého pletiva vzrostného vrcholu (apikální meristém) a jeho další pěstování v umělých podmínkách na živném médiu. Touto metodou vznikne velké množství nových dceřiných rostlin, které jsou identické s mateřskou rostlinou – klon (Procházka 1980b).

U terestrických druhů s hlízami vytváří většina pouze jednu novou hlízu (výjimka např. u *Dactylorhiza iberca*), která nahrazuje starou. Rozmnožování se provádí v době květu, kdy poškodíme rostoucí hlízu, a ta pro svou záchranu vytvoří jednu či více náhradních hlíz. U druhů, které vytváří listovou růžici přes zimu se odděluje zbytek rostliny od staré hlízy. Na staré hlíze vznikne několik rostlinek a u zbytku oddělené rostliny doroste nová hlíza a vykvete. Oddenkové orchideje se množí nejsnáze – pomocí dělení. Oddělená část musí mít dostatek zásobních látek pro regeneraci a zakořenění (Sekerka et al. 2006, Obdržálek et al. 2010).

U epifytických orchidejí rozhoduje o snadnosti vegetativního množení jejich větvení stonku. U sympodiálně rostoucích druhů (*Miltonia*) se provádí, podobně jako u terestrických orchidejí, dělením trsů dospělých jedinců či rozdělením dlouhých pahlíz (*Dendrobium*). U monopodiálně rostoucích druhů, pokud netvoří boční

rostliny, je množení až nemožné. Některé druhy (*Phalaenopsis*) dokáží vytvořit novou rostlinu na koncích květních stonků (Dušek a Křístek 1986).

### ***1.12 Převod do ex vitro podmínek***

Přenos do běžných kultivačních podmínek, kdy rostliny rostou v zahradnickém substrátu v nesterilním prostředí, může představovat velký problém. Jedinci rostoucí v podmínkách *in vitro* jsou přizpůsobeni na odlišné faktory než rostliny v podmínkách *ex vivo*. Nacházejí se v podmínkách s dostatkem snadno dostupných živin, bez přítomnosti patogenů a s vysokou relativní vlhkostí. Nemají dostatečně vyvinutou listovou kutikulu, která by regulovala výdej vody.

V první řadě při převodu do *ex vitro* je zapotřebí pomalé navyknutí mladé rostliny na změnu relativní vzdušné vlhkosti (tzv. aklimatizace), kdy využíváme různých polozavřených nádob, které vytvářejí a udržují mikroklima s dosti vysokou vzdušnou vlhkostí. Další nebezpečí se skrývá v intenzivním slunečním záření, které by mohlo poškodit až usmrtit mladé semenáčky bez vytvořené dostatečně tlusté kutikuly (McKendrick 2000).

Doporučuje se převádět do podmínek *ex vitro* pouze rostliny, které mají dobře vytvořenou kořenovou část a více zelených listů (Řízková 2001).

## 2 Materiál a metodika

### 2.1 Princip aseptické kultury

Aseptické kultury *in vitro* probíhají v kontrolovaných podmínkách, které zajišťují vhodné podmínky pro klíčení a růst semen. Tyto podmínky jsou určeny stálou teplotou, která se při počátečním klíčení a tvorbě protokormů ve tmě pohybuje okolo 17°C. Při další kultivaci ve světelných podmínkách se udržuje při  $\pm 23^\circ\text{C}$ . Vzdušná vlhkost se pohybuje okolo 95 – 100%, která je zajištěna uzavřením kultivačních lahví víčkem.

Další důležitá součást je sterilní prostředí bez patogenních organismů, které se zajišťuje dostatečnou dezinfekcí všech nástrojů, kultivačních lahví a semen, včetně vzduchu vhnávaného do flow-boxu. Výběr vhodného kultivačního média je další podmínkou pro úspěch aseptických kultivací.

Pro sestavení metodiky byly použity zkušenosti Mgr. Bohumila Vondruše (ústní sdělení), RNDr. Hany Vejsadové, CSc (ústní sdělení) a literárních pramenů, které jsou dále citovány. Pokusy byly prováděny na dvou odlišných pracovištích. Na prvním pracovišti (v Průhonicích) byly poskytnuty stabilní podmínky, které byly technicky regulovány pomocí termostatů, spínačů světla a dalších zařízení. Na druhé pracovišti (v Homolích) byly rostliny pěstovány v běžných provozních podmínkách. V kultivační místnosti byla teplota regulována pouze částečně s výkyvy o  $\pm 2^\circ\text{C}$  a délka fotoperiody byla 18 hodin.

### 2.2 Rostlinný materiál

V pokusech byla použita semena druhů *Bletilla striata*, *Cephalus longifolia*, *Cypripedium calceolus*, *Cypripedium macranthos*, *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina*, *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*, *Dactylorhiza praetermissa*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis gigantea*, *Epipactis helleborine*, *Habenaria dentata*, *Himantoglossum hircinum*, *Nigritela nigra*, *Spiranthes autumnolis* a *Spiranthes odorata*.

Druhy *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina*, *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata* a *Dactylorhiza praetermissa* jsou ohroženy a spadají pod ochranu Černého a červeného seznamu cévnatých rostlin (Procházka et al. 2001). Stejně jako všechny druhy z čeledi *Orchidaceae* jsou i zkoumané druhy rostlin chráněné mezinárodní úmluvou CITES.

Semena druhů *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina*, *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*, *Cypripedium calceolus* byla od sběru z lokalit do další manipulace skladována v mrazicím boxu dle metody Vejsadové a Malé (1996), kdy se zralá semena sušila v Petriho misce na vrstvě s bezvodným  $\text{CaCl}_2$  po dobu 2 týdnů při teplotě 4 – 5°C. Poté byla přemístěna do ampulí a uchována v hermeticky uzavřených nádobách se silikagelem při teplotě – 20°C. Před použitím se semena přemístila z mrazicího boxu do teploty 5°C. Ostatní semena byla získána z indexů semen botanicou zahradou v Táboře. Semena byla sebrána v roce, kdy byla použita.

### **2.3 Houbové izoláty**

V pokusech č. III byly použity houbové izoláty rodu *Rhizoctonia* odebrané z druhů *Dactylorhiza incarnata* a *D. majalis*, které byly kultivovány v čistých kulturách v Mykorhizní laboratoři PřF MU v Brně (příloha 2).

### **2.4 Příprava živného média**

Připravovaná média pro asymbiotický a symbiotický výsev byla upravená podle Rasmussenové (Rasmussen et al. 1990), Vejsadové (2006) a podle J. van Weas (modf. VŠ) (příloha 3 - 6). Zásobní roztoky pro jednotlivá média se smísily s vitamíny, růstovými regulátory a ostatními potřebnými látkami v Erlenmayerově baňce potřebné velikosti. Dále se upravovalo pH podle potřeby pomocí roztoku jednomolárního KOH nebo roztoku jednomolárního  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Po potřebném rozmíchání a úpravě pH se živná média umístila do vodní lázně při teplotě těsně pod 100°C a nechala se zde po dobu zhruba 60 minut, během níž se rozpustil agar spolu se zbylými nerozpuštěnými komponenty a vytvořil se roztok,



který po vychladnutí ztuhnul v gel. Následující den byla média sterilizována v autoklávu při teplotě 120°C po dobu 20 minut, kdy byly zničeny všechny nežádoucí mikroorganismy.

### **2.4.1 Metody založení výsevů**

Při všech výsevech na média byly postupy vesměs stejné. Byla provedena dezinfekce pomocí injekční stříkačky s jehlou ve flow-boxu. Nejprve byla semena smočena v 70% ethanolu po dobu 2 – 3 minut, poté vložena do 7,2% roztoku chlorového vápna s přídavkem 3 kapek smáčedla Tween 80 a protřepávána po určitou dobu (příloha 8) do odbarvení semen na slonovinově bílou barvu, kdy se odbourávají inhibiční látky bránící propustnosti minerálních látek přes testu semen. Po dosažení požadované barvy byla semena třikrát proplachována destilovanou vodou po dobu 20 minut. Pokud nenastalo požadované zbarvení do 30 minut, prováděla se výměna roztoku, kdy se aplikoval roztok ethanolu po dobu 1 minuty a poté došlo k opětovnému vložení semen do injekční stříkačky s roztokem chlorového vápna. Po posledním propláchnutí se nechalo určité množství destilované vody v injekční stříkačce, aby se lépe manipulovalo se semeny. Po vytvoření protokormů se začala vyhodnocovat jednotlivá stádia klíčení (příloha 7).

U symbiotického výsevu se nejprve připravil houbový izolát o přibližné velikosti 1 mm<sup>3</sup>. Poté byl izolát umístěn do nádoby a na druhou stranu média semena pokusných druhů orchidejí, aby bylo poskytnuto co nejvíce času pro nabobtnání. Při asymbiotických výsevech byl vzorek semen rovnoměrně rozmístěn na plochu media.

Manipulace v laboratoři paní RNDr. Hany Vejsadové, CSc se prováděla pomocí bakteriologické kličky, která při nabírání semen vytvořila „blánu“ z vody pro snazší sběr semen, poté byla semena rozprostřena rovnoměrně do zkumavky se šikmou plochou agaru. Tato šikmost umožnila kladení semen na větší plochu. Všechny provedené výsevy byly umístěny ve tmě při teplotě 17°C v termostatu a po vytvoření stádia protokormu přemístěny do kultivační místnosti při střídání světla a tmy po 12 hodinách v 22°C.

V laboratoři pana Mgr. Bohumila Vondruše se ponechalo malé množství destilované vody se semeny ve sterilní injekční stříkačce a poté pomocí jedné až dvou kapek směsi se rozmístila semena po povrchu media ve 100ml infuzních

lahvích s rovnou plochou. Pokusné lahve se semeny byly uloženy v místnosti v úložných boxech ve tmě při teplotě  $\pm 23^{\circ}\text{C}$  a po vytvoření protokormů umístěny na světlo, které se střídalo s temnostní periodou v intervalu 18/6 hodin při stejné teplotě jako při klíčení.

## **2.5 Použité programy**

V diplomové práci byl použit program Statistica 9.0 (Statsoft, USA) pro statistické vyhodnocení naměřených hodnot u všech pokusů. Byla využita metoda jednoduchá ANOVA. Voně dostupný program tpsDIG vyvinutý profesorem F. Jamesem Rohlfem ([life.bio.sunysb.edu/morph/](http://life.bio.sunysb.edu/morph/)) byl používán při měření délky a šířky listů v pokuse č.

## **2.6 Pokusy**

### **2.6.1 Pokus č. 1 - Vliv přídatku peptonu na klíčivost u vybraných druhů orchidejí**

Semena výše uvedených druhů byla v úplné zralosti. Byly použity 2 varianty média, které se lišily obsahem peptonu. Médium bez peptonu bylo označeno jako L1P a médium s peptonem L1P/A (příloha 3 a 4).

V Průhonicích byla ode dne 11.8. 2010 zkoumána semena druhů *Dactylorhiza incarnata* ssp. a *serotina* *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata* (příloha 1). Každá varianta obsahovala 22 opakování. Jedno opakování mělo 1 zkumavku, do které se umístilo přibližně padesát semen. V Homolích byla dne 13.8. 2010 vyseta semene druhů *Cephalus longifolia*, *Dactylorhiza praetermissa*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis gigantea*, *Epipactis helleborine*, *Himantoglossum hircinum*, *Nigritela nigra* a *Spiranthes autumnalis* v pěti opakováních po jedné infuzní lahvi s přibližně padesát semeny.

### **2.6.2 Pokus č. II – Vliv různých druhů médií na klíčivost orchidejí**

V tomto pokusu byl sledován vliv různého obsahu živných látek na klíčivost orchidejí. Byly vytvořeny dva druhy výsevního média, které se lišily různým složením mikroelementů a odlišným přidavkem sacharidů. V médiu L1P byla použita sacharóza, glukóza a nepřidaly se zde mikroelementy. V médiu *van Weas* (modf. VŠ) byly aplikovány tři druhy sacharidů (sacharóza, glukóza a maltóza) a několik mikroelementů (příloha 6). Pokus začal 23.1. 2010 v Homolích, kdy byla vysévána semena *Bletilla striata*, *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza praetermissa*, *Habenarie dentata* a *Spiranthes odorata*, po pěti opakováních od obou druhů média.

### **2.6.3 Pokus č. III – Vliv různých druhů mykorrhizních hub na klíčivost semen**

Byl srovnán vliv vybraných druhů mykorrhizních hub na klíčivost a růst semen. Bylo vytvořeno výsevní médium označené OV, do kterého byly přidány ovesné vločky (příloha 5). Na všechny druhy orchidejí byly aplikovány 3 varianty výsevu. V první variantě byl použit cca 1 mm<sup>3</sup> velký izolát *Rhizoctonia sp* odebraný z kořenů *Dactylorhiza incarnata*, v druhé cca 1 mm<sup>3</sup> velký izolát *Rhizoctonia sp* odebraný z kořenů *Dactylorhiza majalis*, a třetí varianta byla kombinace obou izolátů.

Od 20.10. 2010 v Průhonicích byla zkoumána semena *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* a *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*. Každá varianta se skládala z 22 opakování, které mělo přibližně padesát semen v jedné zkumavce. V Homolích dne 29.10 2010 byla využita semena *Cypripedium calceolus* a *Cypripedium macranthos*, každá varianta se skládala z pěti opakování po padesáti semenech v jedné infuzní lahvi.

### **2.6.4 Pokus č. IV - Vliv železitých solí na klíčivost a růst *Cypripedium calceolus***

V pokusu se srovnával příjem železitých solí v odlišné formě. Vytvořily se dva druhy médií s odlišným minerálním základem. V jednom byl použit roztok

chloridu železitého (označení 4MC) a v druhém roztok dusičnanu železitého (příloha 3 a 6).

Pokus byl prováděn v Průhonících od 9.2. 2011. Byla použita semena druhu *Cypripedium calceolus* v úplné zralosti. Každá varianta se skládala z 22 opakování po padesáti semenech v jedné zkumavce.

### **2.6.5 Pokus č. V – Vliv druhu substrátu na růst semenáčů při přenosu do ex vitro podmínek**

Pokus č. V byl započat dne 2.8. 2011. V pokusu byly použity 3 varianty substrátu, u kterých byl zkoumán jejich vliv na růst a vývoj rostlin *ex vitro*:

1. varianta - směs na orchideje Lukscheiter (příloha 11),
2. varianta - směs na orchideje Lukscheiter a Akadama v poměru 1:1,
3. varianta – směs lávového písku a Akadama v poměru 2:1.

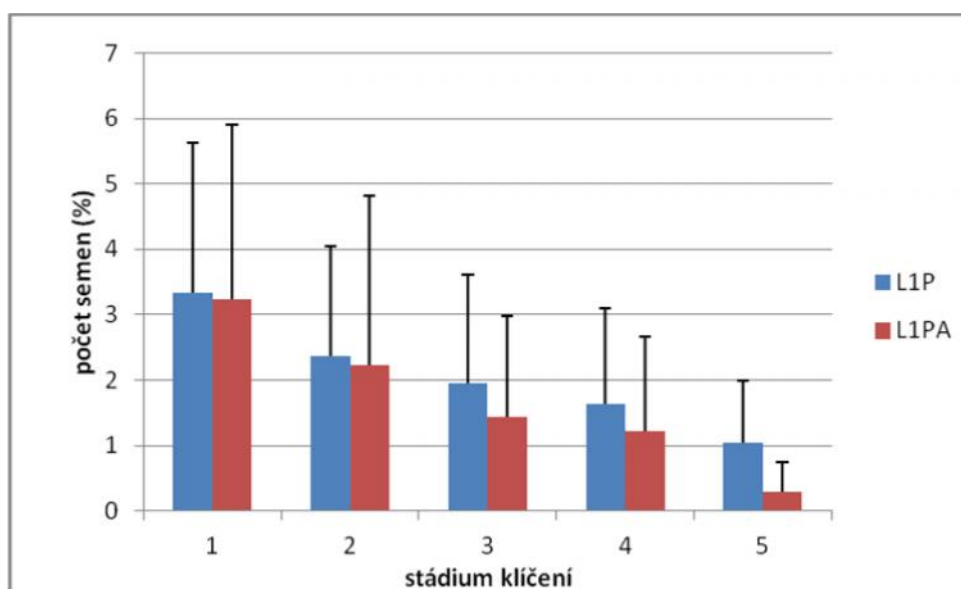
Tyto varianty byly umístěny do skleníku v plastových květináčích o velikosti 6 x 6cm při teplotě 25°C. Semenáče byly vyjmuty pinzetou z infuzních lahví, důkladně očištěny ve vodovodní vodě od zbytků média a přemístěny do nesterilních podmínek *ex vitro*.

Pokus byl prováděn v Homolích, kde byly přesazovány semenáče pocházející z výsevů *Bletilla striata*, *Dactylorhiza praetermissa* a *Spiranthes odorata*. Bylo použito 60 semenáčů, které byly po dvaceti měsících vyjmuty z kultivačních lahví a rozděleny po deseti rostlinách v každé variantě.

### 3 Výsledky

#### 3.1 Pokus č. I – Vliv přídavku peptonu na klíčivost orchidejí

V obr. 6 je srovnán počet vyklíčených semen druhu *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – srpen 1998) v jednotlivých stádiích klíčení, kde lze rozpoznat pozitivnější efekt média bez peptonu (značení L1P) s větším množstvím aktivních semen. V příloze 8 je porovnán vliv médií na jednotlivá stádia klíčení při průběžném sledování.



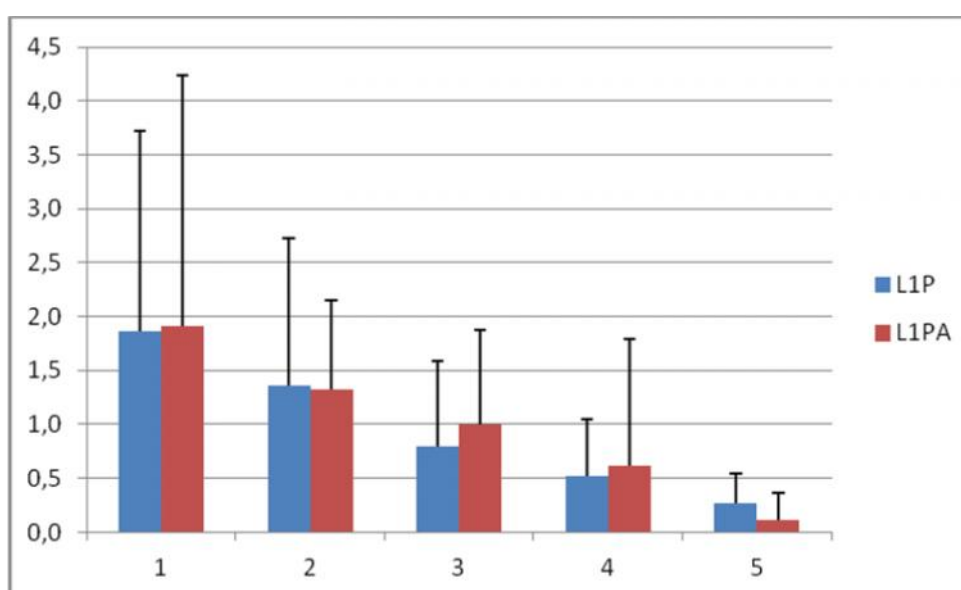
Obr. 6: Průměrné hodnoty počtu vyklíčených semen druhu *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – srpen 1998) v různém stádiu klíčení u zkoumaných médií. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. L1P – médium bez peptonu, L1PA – médium s peptonem.

V pokusu byl zjištěn průkazný rozdíl v klíčivosti semen mezi studovanými médii (tab. 1). Ovšem z pozorování klíčivosti bylo větší pro médium bez peptonu (L1P) než pro médium s peptonem (L1PA). Z těchto výsledků vyplývá, že pozitivní vliv peptonu v pokusu nebyl prokázán.

Tab. 1: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu peptonu na klíčivost u druhu *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – srpen 1998).

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Abs člen	0,380153	12,39197	5	38	0,000000
varianta	0,745841	2,58984	5	38	0,041246

U druhu *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – září 2004) nebyl zjištěn průkazný vliv vybraných médií pro jednotlivá stádia klíčení (obr. 7) (tab. 2)



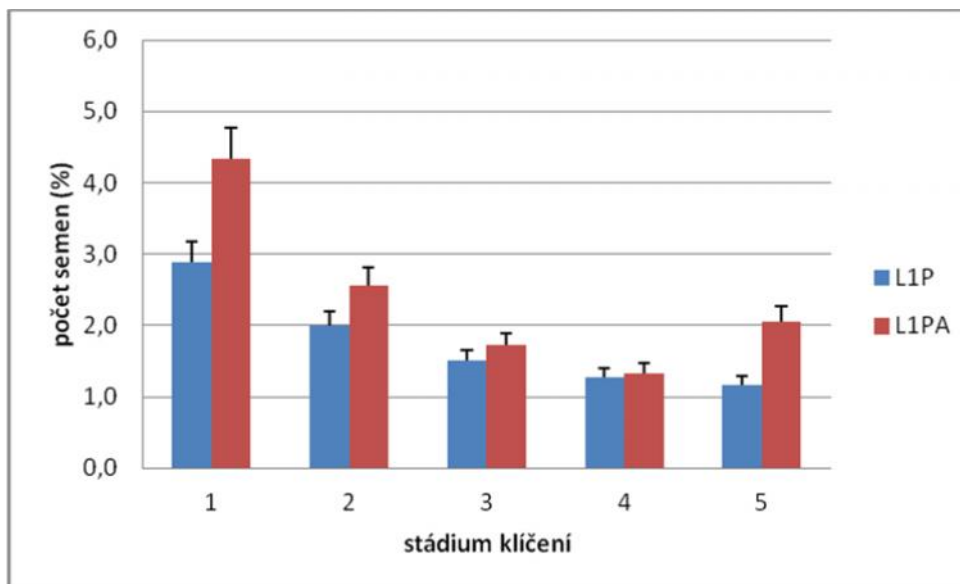
Obr. 7: Průměrné hodnoty v jednotlivých stádiích klíčivosti semen druhu *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – září 2004) u zkoumaných médií. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. L1P – médium bez peptonu, L1PA – médium s peptonem.

Tab. 2: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu peptonu na klíčivost u druhu *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – září 2004).

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Abs. člen	0,449928	9,291590	5	38	0,000008
varianta	0,928277	0,587207	5	38	0,709632

Při srovnání celkového počtu vyklíčených semen u druhu *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata* ve všech stádiích lze vidět, že na médiu s přísadkou peptonu

vyklíčil větší počet semen (obr. 8). Tento rozdíl mezi médii však nebyl statisticky průkazný (tab. 3).



Obr. 8: Průměrné hodnoty vyklíčených semen u zkoumaných médií u druhu *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. L1P – médium bez peptonu, L1PA – médium s peptonem.

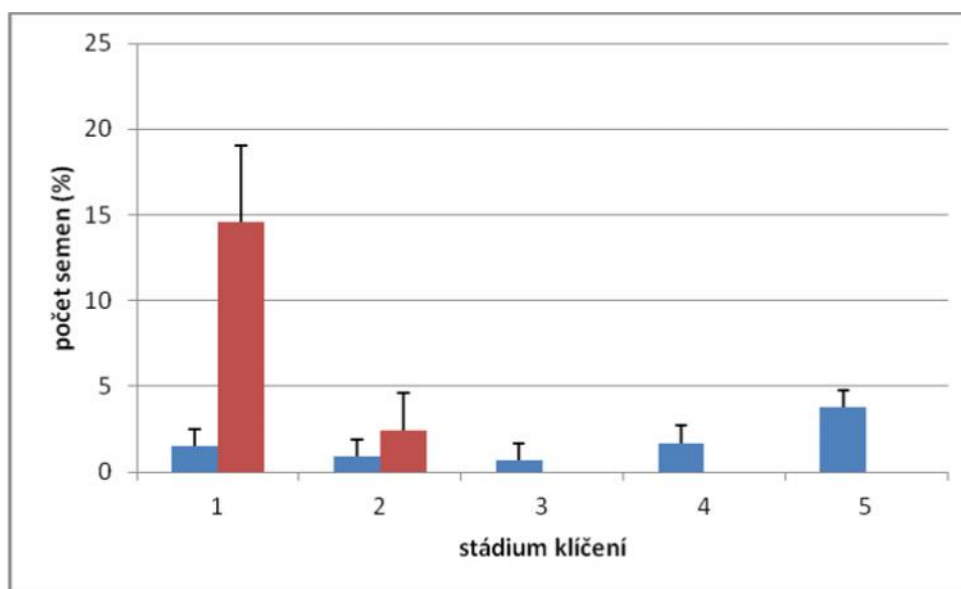
Tab. 3: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu peptonu na klíčivost u druhu *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*.

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Abs člen	0.242470	7.498124	5	12	0.002102
varianta	0.877761	0.334228	5	12	0.882602

Druhy *Cephalus longifolia*, *Dactylorhiza praetermissa*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis gigantea*, *Epipactis helleborine*, *Himantoglossum hircinum*, *Nigritela nigra* a *Spiranthes autumnalis* během doby pokusu (29.10. 2010 – 7.12. 2012) nevyklíčily ani na jednom médiu.

### 3.2 Pokus č. II – Vliv různých druhů médií na klíčivost orchidejí

U druhu *Habenaria dentata* byl prokázán rozdílný vliv různých mikroelementů a odlišných přísad sacharidů na klíčivost semen. V obr. 9 byl srovnáván počet vyklíčených semen v jednotlivých stádiích, kdy byl zjištěn větší vliv média *van Weas* (modf. VŠ). V příloze 9 je porovnáván vliv jednotlivých médií na různá stadia klíčících semen. Lze si všimnout, že do 5. stádia také dorostlo více semen na médiu *van Weas* (modf. VŠ).



Obr. 9: Průměrné hodnoty vyklíčených semen u zkoumaných médií u druhu *Habenaria dentata*. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. Modré sloupce – médium *van Weas* (modf. VŠ) červené sloupce – LIP médium.

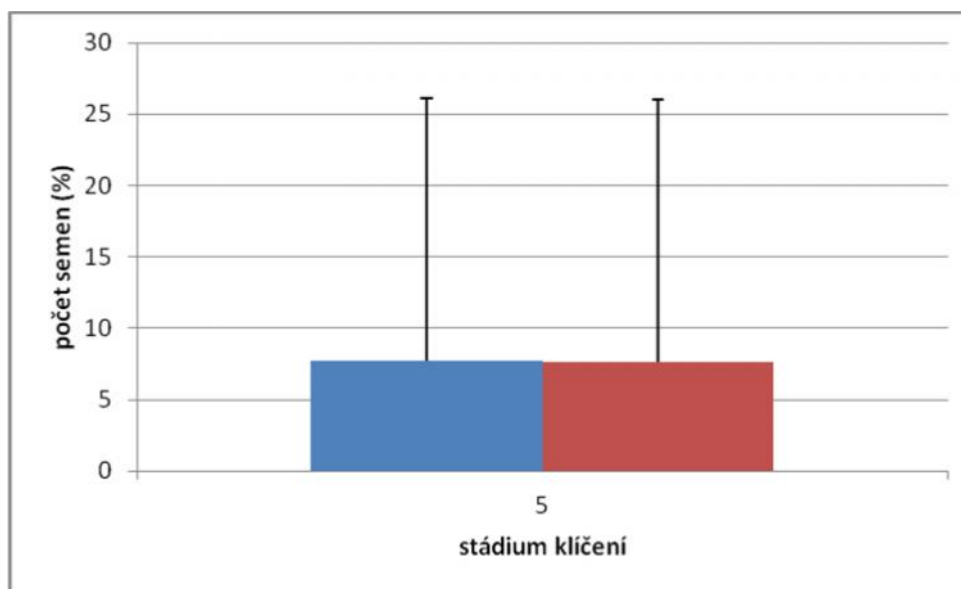
Statistické vyhodnocení prokázalo rozdílný vliv média *van Weas* (modf. VŠ) na klíčivost semen (tab. 4).

Tab. 4: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu různých médií na klíčivost u druhu *Habenaria dentata*.

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Abs. člen	0.019198	40.87134	5	4	0.001582
varianta	0.023661	33.01060	5	4	0.002392



U druhu *Spiranthes odorata* nebyl zjištěn rozdíl zkoumaných médií na klíčivost semen (obr. 10) (tab. 5).

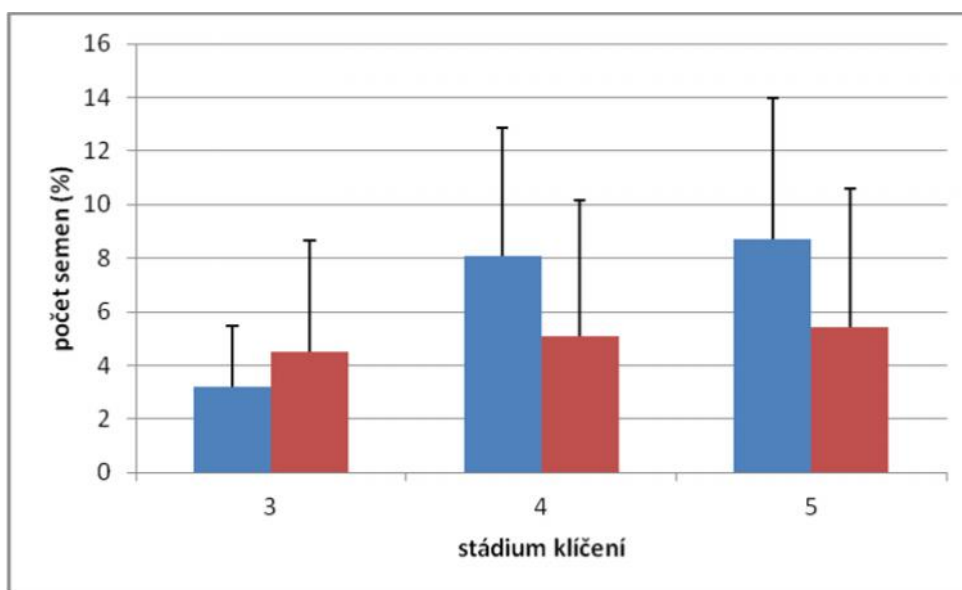


Obr. 10: Průměrné hodnoty vyklíčených semen u zkoumaných médií u druhu *Spiranthes odorata*. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. Modré sloupce – médium *van Weas* (modif. VŠ), červené sloupce – L1P médium.

Tab. 5: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu různých médií na klíčivost u druhu *Spiranthes odorata*.

Efekt	SS	Počet volnosti	MS	F	p
Abs. člen	2340.900	1	2340.9	8.496915	0.019441
varianta	0.100000	1	0.1000	0.000363	0.985266

U druhu *Dactylorhiza praetesmissa* bylo větší zastoupení rostlin v 1. stádiu na médiu L1P, ovšem na médiu *van Weas* bylo nalezeno více rostlin v 5. Stádiu. (obr. 11). Vliv různých elementů a odlišných přísad sacharidů na klíčivost semen nebyl statisticky prokázán (tab. 6).

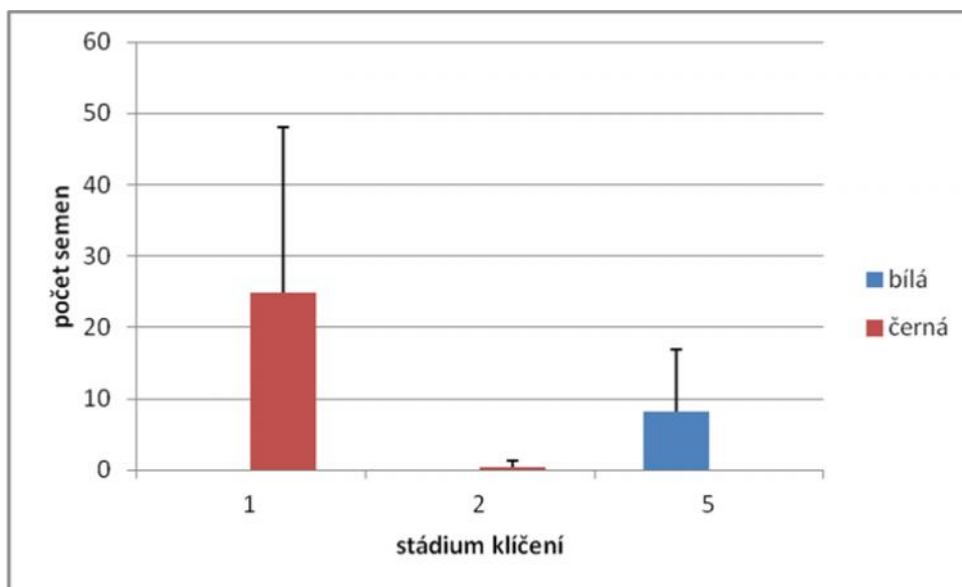


Obr. 11: Průměrné hodnoty vyklíčených semen u zkoumaných médií u druhu *Dactylorhiza praetesmissa*. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. Modré sloupce – médium *van Weas* (modf. VŠ), červené sloupce – L1P médium.

Tab. 6: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu různých médií na klíčivost u druhu *Dactylorhiza praetesmissa*.

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Abs. člen	0.439463	2.551007	3	6	0.151720
varianta	0.439463	2.551007	3	6	0.151720

Semena druhu *Bletilla striata* do dne 21.1. 2012 stoprocentně vyklíčila a dorostla do 5. stádia klíčení. Z tohoto důvodu byl vliv různých elementů a odlišných přísad sacharidů hodnocen z předešlého sledování ke dni 29.10. 2010. V obr. 12 lze vidět pozitivní vliv média (L1P) na klíčivost semen, který nebyl ale statisticky potvrzen (tab. 7).



Obr. 12: Průměrné hodnoty vyklíčených semen u zkoumaných médií u druhu *Bletilla striata* ke dni 29.10. 2010. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. Modré sloupce – médium van Weas (modf. VŠ), červené sloupce – L1P médium.

Tab. 7: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu různých médií na klíčivost u *Bletilla striata* ke dni 29.10. 2012.

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	G
Abs. člen	0.280496	5.130222	3	6	0.042874
varianta	0.479387	2.171994	3	6	0.192381

U semen druhu *Cypripedium calceolus* nebyla prokázána žádná aktivita při jednotlivých sledováních. Nebyl zde zjištěn ani náznak nabobtnání, proto nebyl tento druh statisticky vyhodnocován.

### 3.3 Pokus č. III – Vliv různých druhů mykorrhizních hub na klíčivost semen

V pokusu byla sledována symbióza mykorrhizních hub se semeny orchidejí, kdy na počátku pokusu semena nabobtnala a houbové izoláty pomalu prorůstaly živné médium. Po 6. týdnu bylo zjištěno, že houby začaly působit jako negativní element, který se stává spíše invazním mikroorganismem. Nabobtnalá semena byla pohlcena houbovými hyfami a dál v růstu pokračovaly pouze houby (tab. 13).

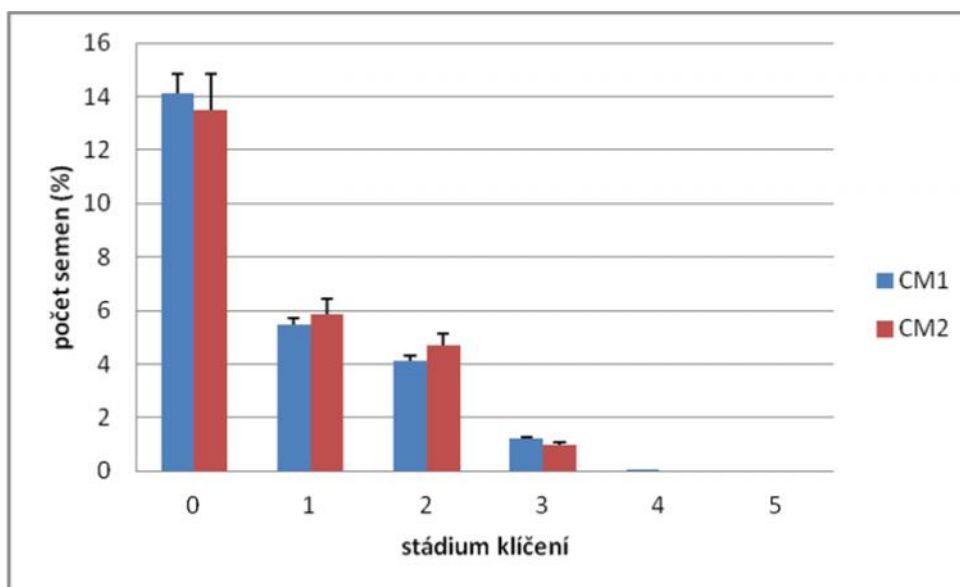
<i>druh houby</i>	<i>druh rostliny</i>	<i>doba pokusu</i>	<i>výsledek pokusu</i>
<b>Rhizoctonia sp. (488.93)</b>	<b>V Průhonicích</b>		
	<i>Cypripedium calceolus</i>	20.10.2010	žádná reakce
	<i>Dactylorhiza incarnata ssp. serotina</i>	21.10.2010	žádná reakce
	<i>Dactylorhiza maculata ssp. maculata</i>	22.10.2010	žádná reakce
	<b>V Homolích</b>		
	<i>Cypripedium calceolus</i>	29.10.2010	žádná reakce
	<i>Cypripedium macranthos</i>	30.10.2010	žádná reakce
<b>Rhizoctonia sp. (486.93)</b>	<b>V Průhonicích</b>		
	<i>Cypripedium calceolus</i>	20.10.2010	žádná reakce
	<i>Dactylorhiza incarnata ssp. serotina</i>	21.10.2010	žádná reakce
	<i>Dactylorhiza maculata ssp. maculata</i>	22.10.2010	žádná reakce
	<b>V Homolích</b>		
	<i>Cypripedium calceolus</i>	29.10.2010	žádná reakce
	<i>Cypripedium macranthos</i>	30.10.2010	žádná reakce
<b>kombinace obouch hub</b>	<b>V Průhonicích</b>		
	<i>Cypripedium calceolus</i>	20.10.2010	žádná reakce
	<i>Dactylorhiza incarnata ssp. serotina</i>	21.10.2010	žádná reakce
	<i>Dactylorhiza maculata ssp. maculata</i>	22.10.2010	žádná reakce
	<b>V Homolích</b>		
	<i>Cypripedium calceolus</i>	29.10.2010	žádná reakce
	<i>Cypripedium macranthos</i>	30.10.2010	žádná reakce

Tab. 13 Souhrn kombinací použitých druhů terestrických orchidejí a mykorrhizních hub

### **3.4 Pokus č. IV - Vliv železitých solí na klíčivost a růst**

#### ***Cypripedium calceolus***

Pokusem č. IV byl sledován vliv železitých solí na stimulaci semen druhu *Cypripedium calceolus*. V obr. 14 je patrný pozitivní vliv media s dusičnanem železitým (CM2). V příloze 10 jsou srovnány množství vyklíčených semen v jednotlivých stádiích klíčení, kde lze vidět nepatrné rozdíly ve vlivu železitých solí.



Obr. 14: Průměrné hodnoty vyklíčených semen u zkoumaných médií u druhu *Cypripedium calceolus*. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. CM1 – médium obsahující chlorid železitý, CM2 – médium s obsahem dusičnanu železitého.

Statisticky nebyl prokázán rozdílný vliv chloridu železitého a dusičnanu železitého na klíčivost a růst semen (tab. 7).

Tab. 7: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu železitých solí na klíčivost u druhu *Cypripedium calceolus*.

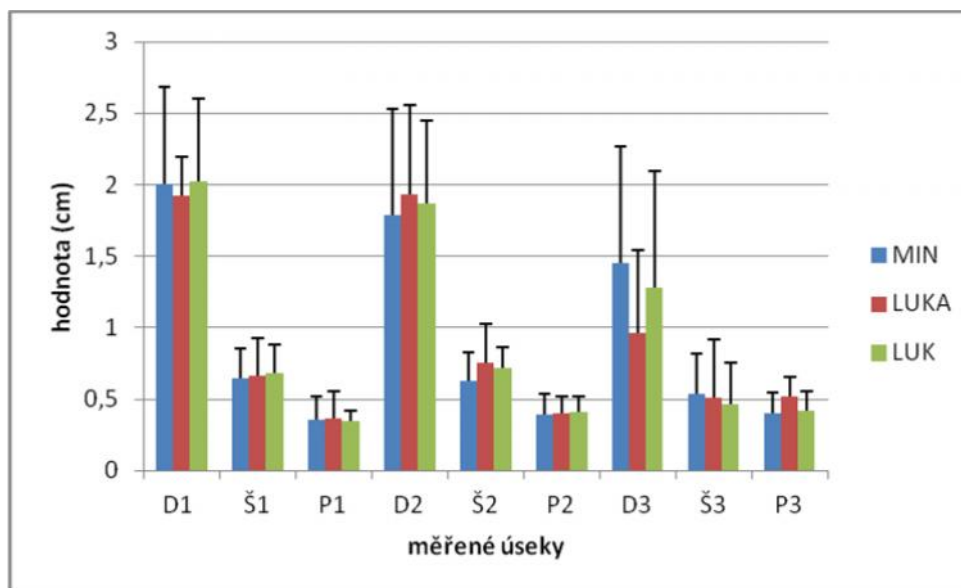
Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Absl. člen	0,105268	82,87072	4	39	0,000000
varianta	0,928982	0,74536	4	39	0,567026

### 3.5 Pokus č. V – Vliv druhu substrátu na růst semenáčů při přenosu do ex vitro podmínek

V pokusu byly zkoumány vlivy různých substrátů na třech druzích orchidejí. *Dactylorhiza pratermissa* byla z pokusu nakonec vyňata, neboť přešla do klidového stádia i přes fakt, že se udržovaly stejné podmínky jako při kultuře *in vitro*.

Dalším zkoumaným druhem byla *Spiranthes odorata*. V obr. 15 jsou vidět nepatrné rozdíly v délce a šířce listů a jejich poměru u měřených rostlin, kdy pozitivní vliv na délku listů měl minerální substrát (MIN), kdežto na šířku a poměr šířky a délky listu měla nejlepší vliv kultivační směs pro orchideje značky

Lukscheiter (LUK). Statistický test však rozdílný vliv různých substrátů neprokázal (tab. 8).

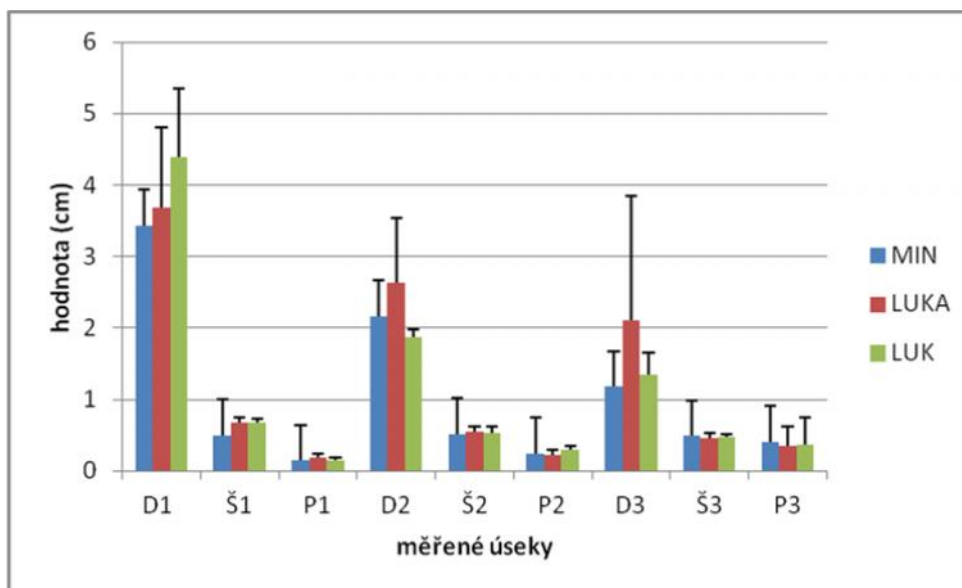


Obr. 15: Průměrné hodnoty délky listů u druhu *Spiranthes odorata* na různých substrátech. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. D1 – délka 1. (nejstaršího) listu, D2 – délka 2. listu, D3 – délka 3. listu, Š1 – šířka 1. (nejstaršího) listu, Š2 – šířka 2. listu, Š3 – šířka 3. listu, P1 – poměr šířky a délky 1. listu, P2 – poměr šířky a délky 2. listu, P3 – poměr šířky a délky 3. listu, MIN – minerální substrát, LUK – komerční substrát Lukscheiter, LUKA – komerční substrát Lukscheiter a Akadama.

Tab. 8: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu různých substrátů na klíčivost u druhu *Spiranthes odorata*.

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Abs. člen	0,007257	547,1629	9	36	0,000000
druh substrátu	0,670070	0,886500	18	72	0,595706

U druhu *Bletilla striata* lze usuzovat ne malý pozitivní vliv substrátu Lukscheiter s Akadamou (LUKA) na délku listů a substrát Lukscheiter (LUK) na šířku a poměr šířky a délky listu (obr. 16). Tento rozdíl však nebyl potvrzen statisticky (tab. 9).



Obr. 16: Průměrné hodnoty délky listů u druhu *Bletilla striata* na různých substrátech. Chybové úsečky znázorňují 95% interval spolehlivosti. D1 – délka 1. (nejstaršího) listu, D2 – délka 2. listu, D3 – délka 3. listu, Š1 – šířka 1. (nejstaršího) listu, Š2 – šířka 2. listu, Š3 – šířka 3. listu, P1 – poměr šířky a délky 1. listu, P2 – poměr šířky a délky 2. listu, P3 – poměr šířky a délky 3. listu, MIN – minerální substrát, LUK – komerční substrát Lukscheiter, LUKA – komerční substrát Lukscheiter a Akadama.

Tab. 9: Wilksův test významnosti pro stanovení vlivu různých substrátů na klíčivost u druhu *Bletilla striata*.

Efekt	Hodnota	F	Efekt	Chyba	p
Abs. člen	0,000012	17322,49	5	1	0,005768
druh substrátu	0,000680	7,470000	10	2	0,123726

## 4 Diskuze

U explantátových kultur závisí úspěšnost nejen na stavu vybavení, ve kterém jsou pokusy prováděny (flow-box, nástroje), ale i na dosavadních zkušenostech člověka s danou problematikou. U některých druhů orchidejí se vyskytl jev, kdy v jednom pokusu semena vyklíčila a v jiném nebyla žádná reakce (příloha 8). Tullock (2005) zdůrazňuje důležitost výběru správně dozrálé tobolky, kdy příliš zelená tobolka neobsahuje zralá semena. Dalším z důvodů, proč semena nevyklíčila, mohla být důvodem špatně zvolená délka dezinfekce semen, kdy buď nebyly odstraněny inhibiční látky v testě, nebo délka dezinfekce byla natolik dlouhá, že bylo semeno poškozeno. Při dezinfekci semen lze v principu použít dva rozdílné postupy, které se liší až v konečné fázi, kdy semena mění barvu z tmavé na světlou. Jedna skupina autorů používá při dezinfekci přesně danou dobu pro určité druhy orchidejí, které byly již někde publikovány (Illyes et al. 2005, Zettler a Hofer 1998, Ponert et al. 2011). Jiní autoři dobu dezinfekce, potřebnou pro změnu barvy, nepokládají za důležitý fakt a řídí se zkušeností, že přeměna barvy semen na slonově bílou je ideální (Vejsadová 2006, Řízková 2001). Podle mého názoru je nutné dbát na stupeň zralosti semen a tím i upravit samotnou dobu dezinfekce. Metoda použitá v této práci respektuje doporučení druhé skupiny, tj. doba aplikace dezinfekce se řídila změnou barvy semene.

Na klíčivost semen má vliv nejenom způsob dezinfekce, ale i složení použitého živného média. V experimentech byly využity dosavadní zkušenosti mých školitelů. Byla použita vyvážená živná média, která byla uzpůsobena pro dané pokusy (příloha 3 - 6).

Především bylo nutné věnovat pozornost formě dodávání dusíku. Je známo, že rostliny snáze využívají organické formy minerálních látek než anorganické (Kyte a Kleyn 2010). Klíčící semena orchidejí nejsou schopna přijímat anorganický dusík, což může souviset s nutnou symbiózou s mykorhizními houbami. Často se přidává do živných médií dusík organický (extrakt z kvasnic, pepton) (Látalová 2000). Nasib et al. (2008) zkoumal různé množství peptonu na stimulaci růstu, kdy nejlepší účinek měla koncentrace 0,5 g/l. Stimulační efekt peptonu (0,5g/l) byl prokázán na klíčení a růst u druhu *Dactylorhiza majalis* a *D. incarnata* (Wotavová a Vejsadová 2001). Rasmussen (1995) zmiňuje vliv peptonu na klíčení u druhu *Dactylorhiza incarnata* a



*D. maculata*. Stoutamire (1964) použil 2g peptonu/l u terestrických orchidejí z Ameriky, který měl kladný vliv na růst a vývoj semen. Liddell (1953) prokázal zlepšení klíčení u druhů rodu *Cypripedium* při přidání peptonu do média.

V pokusu č. I byl sledován vliv peptonu na klíčení semen vybraných druhů orchidejí. Pozitivní efekt peptonu (0,5g/l) nebyl prokázán u žádných zkoumaných druhů orchidejí (*Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – srpen 1998), *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – září 2004) a *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*). Vliv peptonu nemusel být prokázán z důvodu toho, že efekt nebyl statisticky potvrzen při provedeném počtu opakování. Pro další experimenty bych doporučil vytvoření většího počtu opakování pro koncentraci 0,5 g peptonu/l.

V dalším pokusu byl sledován vliv různých mikroelementů a odlišných přísad sacharidů na klíčivost semen orchidejí. V pracích Tokuhara a Mii (2003) a Sopalun et al. (2010) bylo zjištěno, že maltóza pomáhá růstu protokormů bez kalusového bujení, kdežto glukóza podporuje kalusové množení, ale nepodporuje růst protokormů. U druhu *Cattleya irianei* byl proveden pokus s různými přísadky sacharidů, kdy nejlépe klíčila semena v živném roztoku s maltózou (Arditti 1967). Rasmussen (1995) uvádí větší efekt kombinace sacharózy a maltózy než sacharózy a glukózy u druhů rodu *Bletilla*.

U druhu *Habenaria dentata* bylo statisticky prokázáno, že živné médium s přísadkou glukózy, sacharózy, maltózy a směsí neesenciálních aminokyselin (Sigma M7145) mělo pozitivní vliv na klíčivost ve srovnání s médiem, které obsahovalo pouze glukózu a sacharózu. Přídavek maltózy v médiu *van Weas* (modf. VŠ) stimuloval vývoj protokormů druhu *Dactylorhiza praetesmissa*, které vyrostly do 5. Stádia. Naproti tomu médium L1P s glukózou podporovalo klíčivost semen (obr. 6). U *Bletilla striata*, *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza praetesmissa* a *Spiranthes odorata* nebyl potvrzen vliv mikroelementů a přidávaných sacharidů na klíčení semen. Tento fakt mohl být způsoben malým počtem opakování. Také je možné, že přídatné látky neměly na zkoumané druhy orchidejí vliv.

Mnoho vědeckých prací bylo zaměřeno na problematiku symbiotického klíčení, kdy byla snaha o zlepšení úspěšnosti klíčení a růstu ohrožených druhů orchidejí. V pokusu byl použit podobný postup jako v práci Chou a Chang (2004) s živným roztokem obsahujícím ovesné vločky. Toto médium bylo šikmo umístěno do

zkumavek, aby se zvětšila výsevní plocha. V pokusu byl použit houbový izolát s velikostí 1 mm<sup>3</sup>, který měl pozitivní efekt i v práci Chou a Chang (2004). Tomito a Konno (1998) prováděli podobný pokus na devíti terestrických orchidejích, kdy použili houbové izoláty o velikosti 5 mm<sup>3</sup>. Další metodou je výsev na Petriho misku, kdy byl umístěn houbový izolát doprostřed média a okolo semena pokusného druhu (Bonnardeaux et al. 2007, Shimura et al. 2009, Liyang et al., Peterson et al. 1997, Muir 1898). Jinou výsevnou technikou bylo použití nepřímého výsevu, kdy byla semena vyseta na filtrační papír, který se poté umístil na kultivační médium a až poté se přidal blok houbového mycelia (Zettler et al. 2001, Wilkinson et al. 1989). V pokusu č. III byl zkoumán vliv mykorhizních druhů hub u druhů *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza maculata* a *Dactylorhiza incarnata* (v Průhonicích) a *Cypripedium calceolus* a *Cypripedium macranthos* (v Homolích), kdy nedošlo k vyklíčení semen ani jednoho pozorovaného druhu. Kotlínek (2010) uvádí problematiku interakce mykorhizních hub se semeny, kdy mohlo nastat parazitování houby na semeni a následující zničení semen či odmítnutí houby semenem.

V pokusu č. IV byl sledován vliv železitých solí na klíčivost semen u druhu *Cypripedium calceolus*. Niemann (2007) srovnával efekty různých druhů živných roztoků a zjistil, že médium obsahující chlorid železitý působí negativně na růst orchidejí do fáze, kdy rostlina vytváří další (třetí) kořen. V provedení experimentu jsem se měl více informovat o nedostatku materiálu ke srovnání pokusu s ostatními pracemi. Další fakt je i to, že kdyby se vytvořil větší rozsah možných kombinací železitých solí, mohly být výsledky prokazatelnější.

Tento pokus byl proveden i přes fakt, že obě použité železité soli po rozpuštění disociují na tentýž kation Fe<sup>3+</sup>. Pokus mohl být dále komplikován rizikem, že ionty Fe<sup>3+</sup> mohly reagovat s H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> za vzniku sloučeniny Fe(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (Marschner 1995). Domníval jsem se, že se potvrdí teorie, že při zvýšeném příjmu NO<sup>3-</sup> se redukuje příjem Fe proto, že při přeměně nitrátů vznikají OH<sup>-</sup>, které zvyšují pH buněčných šťáv a to potlačoval příjem železa (Dušek a Křístek 1986, Novák 1990, [www.agrokrom.cz](http://www.agrokrom.cz)).

V posledním pokusu byly zkoumány vlivy odlišných substrátů při převodu rostlin do prostředí *ex vitro*. Přejít rostlin z *in vitro* podmínek do *ex vitro* je velice náročný proces. Na rostliny působí mnoho stresujících abio- a biotických faktorů (Hazarika 2003). Pospíšilová et al. (1999) doporučuje postupnou aklimatizaci rostlin,

aby se snižoval rozdíl relativní vzdušné vlhkosti a zabránilo se tím velkému vysychání a fotoinhibici. Nebyl nalezen žádný vědecký článek, který by se zabýval efektem lávového písku a Akadamy. Patrný je pouze rozdíl v lepším udržení vlhkosti a živin Akadamou než lávovým pískem. Akadama je pálený jííl, a proto neobsahuje žádné nežádoucí organismy ([www.bonsai-dnes.cz](http://www.bonsai-dnes.cz)). Prodejní substrát pro orchideje značky Lukscheiter byl zvolen proto, že se dlouhodobě osvědčuje Mgr. Vondrušovi, který používá výhradně tento substrát při převodech rostlin do podmínek *ex vitro*. U druhu *Dactylorhiza pratermissa* nebyl hodnocen vliv substrátů, protože započalo zimní klidové stádium, i přes fakt, že druh byl pěstován ve stejných podmínkách jako při kultuře *in vitro*. U rostliny druhu *Bletilla striata* a *Spiranthes odorata* nebyl prokázán odlišný efekt substrátů na jejich růst.

## 5 Závěr

V diplomové práci jsem se zabýval generativním množением druhů *Bletilla striata*, *Cephalus longifolia*, *Cypripedium calceolus*, *Cypripedium macranthos*, *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina*, *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*, *Dactylorhiza praetermissa*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis gigantea*, *Epipactis helleborine*, *Habenaria dentata*, *Himantoglossum hircinum*, *Nigritela nigra*, *Spiranthes autumnolis* a *Spiranthes odorata*. Aseptické množení je jednou z důležitých možností ochrany ohrožených druhů orchidejí.

V pokusu č. I byl prokázán pozitivní efekt peptonu na klíčivost a jednotlivá stádia u druhu *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – srpen 1998). U ostatních druhů (*Cephalus longifolia*, *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* (sběr – září 2004), *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*, *Dactylorhiza praetermissa*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis gigantea*, *Epipactis helleborine*, *Himantoglossum hircinum*, *Nigritela nigra* a *Spiranthes autumnolis*) nebyl tento efekt prokázán. V průběhu pokusu nebyla zaznamenána žádná nekróza, hnědnutí či odumírání při klíčení a vývoji protokormů.

V pokusu č. II byly nalezeny statisticky významné rozdíly vlivu mikroelementů a sacharidů (sacharóza, glukóza a maltóza) na klíčivost a vývoj semen druhu *Habenaria dentata*. U *Bletilla striata*, *Dactylorhiza praetermissa* a *Spiranthes odorata* nebyl vliv statisticky prokázán. Semena druhu *Cypripedium calceolus* nejevila žádné známky bobtnání a aktivity. Na základě těchto výsledků bych doporučil použít tuto směs mikroelementů a sacharidů pro další experimenty s druhem *Habenaria dentata*.

V pokusu č. III nebyl zjištěn vliv různých mykorhizních druhů hub na semena druhu *Cypripedium calceolus*, *Cypripedium macranthos*, *Dactylorhiza incarnata* ssp. *serotina* a *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*. U semen nebyla zjištěna žádná známka aktivity. Pro další experimenty doporučuji zvolit jinou metodiku výsevu, která by zabránila mykorhizním houbám se stát invazivním organismem ničícím semena orchidejí.

V pokusu č. IV byl zkoumán vliv různých železitých solí na klíčivost semen orchidejí. U druhu *Cypripedium calceolus* nebyl statisticky potvrzen rozdílný

vliv chloridu železitého a dusičnanu železitého. Pro budoucí experiment bych zvolil větší množství různých železitých solí a různé druhy orchidejí s odlišnou náročností na kultivaci.

V pokusu č. V byl sledován efekt různých substrátů na růst a vývoj orchidejí při přechodu do podmínek *ex vitro*. Pro sledování byly použity 20 měsíců staré semenáčky druhu *Bletilla striata* a *Spiranthes odorata*. Byly použity tři druhy substrátů, u kterých se nepotvrdily rozdílný efekt na růst semenáčků. Při opakování tohoto pokusu bych zvolil odlišnější druhy substrátů, které by byly vhodnější pro srovnávání než mnou zvolené substráty.

I když výsledky většiny mých pokusů nebyly statisticky průkazné, přesto zahrnují důležité informace pro úspěšné vypěstování vybraných druhů orchidejí. Do stádia přechodu podmínek *ex vitro* byly plně vyvinuty rostliny druhu *Bletilla striata*, *Dactylorhiza praetarmissa* a *Spiranthes odorata*.

## 6 Seznam literatury

- Andersen TF., Rasmussen HN. (1996). The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: *Shizoctonia* species: taxonomy, molecular, biology, ecology, pathology and disease control. Netherlands: 379-390.
- Arditti J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review* 33 (1): 1 – 97.
- Baumann H., Künkele S a Lorenz R. (2009). *Orchideje Evropy a přilehlých oblastí*. Academia, Praha.
- Baláž M. (1999). Orchideoidní mykorhiza – mýty a skutečnost. *Roezliana* 28: 48-51.
- de Bary A. (1887). Comparative morphology and biology of the fungi, mycetozoa and bacteria. English translation. Clarendon Press, Oxford, Velká Británie.
- Beneš M. (2010). Izolace a identifikace orchideoidních mykorhiyních hub a symbiotickéúasymbiotické klíčení semen terestrických orchidejí *in vitro*.
- Bonnardeaux, Y., Brundrett M., Batty A., Dixon K., Koch J a Sivasithamparam K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatability webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological research*. 182(9):2069-2085.
- Burgeff H. (1959). Mycorrhiza of orchids. In: Withner, C.L. (ed.) *The orchids*. New York: The Roland Press.
- Dykyjová D. (2003). *Ekologie středoevropských orchidejí*. Ropp., České Budějovice.
- Dušek J. a Křístek J. (1986). *Orchideje*. Academia, Praha.
- Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J. a Vosátka M. (2004). Mykorhizní symbióza – O soužití hub s kořeny rostlin. *Academi*, Praha.
- Chou Ling-Chin a Chang Doris Chi-Ning (2004). Assymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F1 hybrids. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 143-147.
- Illyés Z., Rudnóy S. a Bratek Z. (2005). Aspects of in situ, in vitro germination and mycorrhizal partners of *Liparis loeselii*. *Acta Biologica Szegediensis* 49(1-2): 137-139.

Ito I. (1960). Culture of orchid seedlings by way of completing the growth of ovaries of cut flowers. Japan Orchis Soc. Bull 6: 4-7.

Jersáková J. a Kindlmann P. (2004). Zásady péče o orchidejová stanoviště. Kopp, České Budějovice.

Hadley G. (1970). The interaction of kinetin, auxin and other factors in the development of north temperate orchids. New Phytologist 69: 549–555.

Hazarika NB. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. Current science 85 (12): 2-4.

la Croix I. (2008). The new encyclopedia of orchids. Timber Press, Portland, Oregon.

Látalová K. (2000). Generativní množení terestrických orchidejí mírného pásu in vitro. Diplomová práce, Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha.

Liddell RW. (1953). Notes on the germinating *Cypripedium* seeds. – II. Amer. Orch. Soc. Bull. 22(10): 195-197.

Liyang T., Thame A. a Wing YT. Studies on the growth rate of tropical orchid seeds in symbiotic cultures.

Kagawa Univ. 20, 74.

Kotlínek M. (2010). Je rozšíření orchidejí limitováno rozšířením jejich mykorhizních partnerů?. Univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Kyte L. a Kleyn J. (2010). Plants from test tubes. Timber Press. Inc., London.

Malmgren S. (1996). Orchid propagation: theory and practice. North American native terrestrial orchids – propagation and production: 63-71.

Marschner H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press, London

McKendrick S. (2000). In vitro germination of orchids: a manual. Ceiba Foundation of tropical conservation.

Muir IH. (1989). Germination and mycorrhizal fungus compatibility in European orchids. Modern methods in orchid conservation: 39-56.

Murashige T. a Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, 493-497.

- Nasib A., Ali K. a Khan S. (2008). In vitro propagation of croton (*Codiaeum variegatum*). Plant tissue culture and Biotechnology Division 40(1): 99-104.
- Němec B. (1941). Život rostlin. Sfinx, Praha.
- Niemann D. (2007). The effect of various media on the germination and development of several north american native orchids. North american native orchid journal Vol. 13(2): 85-111.
- Novák FJ. (1990). Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Academia, Praha.
- Obdržálek J. (2009). Cultivation of *Cypripedium calceolus* L. *ex vitro* seedlings. Horticultural science 36 (4): 162-170.
- Peterson RL., Uetake Y a Zelmer C. (1998). Fungal symbioses with orchid protocorms. Symbiosis, 25(1998): 29 – 55.
- Ponert J., Vosolsobě S. Kmecová K. a Lipavská H. (2011). European orchid cultivation – from seed to mature plant. European journal of environmental sciences. 1 (2): 95-107.
- Pospíšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D. a Plzánková Š. (1999). Acclimatization of micropropagates plants to *ex vitro* conditions. Biologia plantarum 42 (4): 481-497.
- Pridgeon A. (1992). The illustrated encyklopedia of orchids. Timber Pres, Portland, Oregon.
- Procházka F. (1980)a. Jak poznáme naše orchideje. Roetziana 11: 13-16.
- Procházka F. (1980)b. Naše orchideje. Krajské muzeum východních Čech, Pardubice.
- Procházka F. a Velíšek V. (1983). Orchideje. Krajské muzeum východních Čech, Pardubice.
- Procházka F et al. (2001). Černý a červený seznam květeny České republiky (stav v roce 2000). – Příroda 18: 1-146.



Rasmussen HN., Andersen T.F. a Johansen B. (1990). Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell Environ* 13: 171–177.

Rasmussen HN. (1995). *Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge, UK.

Reissek S. (1847). Über endofytem der Pflanzenzelle, eine Gesetzmässige den Samenfaden oder beueglichen Spiralfasern analoge Erscheinung. *Naturwissenschaft. Abhandlungen* 1: 31-46.

Řízková R. (2001). Ověření vybraných metod pro posílení biodiverzity Vstavačovitých ve vybraných biotopech.

Sekera P, Obdržálek J a Ponert J. (2006). *Orchideje na zahradě*. Grada Publishing, Praha.

Shimura H., Matsuura M., Takada N a Koda Y. (2007). An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *Rebunense* (Orchidaceae). *Phytochemistry* 68: 1442-1447.

Smith SE. (1967). Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 66: 371-378.

Smith SE a Read DJ (1997). *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition. Academic Press, London.

Smith SE. a Read DJ. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edition. Academic Press, London.

Stoutamire W. P. (1964). Seeds and seedling of native orchids. *Michigan Botanist* 3: 107-119.

Tokuhara K. a Mii M. (2003). Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate source. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36: 635-639.

Tomita M. a Konno S. (1998). A preliminary report on the symbiotic germination of nine Japanese terrestrial orchids. *Japan. Soc. Hort. Sci.* 67(5): 696-698.

Tullock J. (2005). *Growing hard orchids*. Timber Press. Oregon.

Vejsadová H. a Malá M. (1996). Seed germination of some endangered terrestrial orchids under aseptic conditions. *Acta Průhonice* 63: 77-83.

Vejsadová H. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids under in vitro conditions. *Acta Biologica Cracoviensia (IF)* 48: 109-113.

Wilkinson, DG., Bhatt S. a McMahon AP. (1989). Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene *int-2* suggests multiple roles in fetal development. *Development* 105: 131-136.

Wotavová K. a Vejsadová H. (2001). Klíčivost rodu *Dactylorhiza* v *in vitro* podmínkách. – In: Jankovský L., Matoušková J., Juroch J. (eds.): *Interorchid 2001*, s. 105–107. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.

Wotavová, K., Vejsadová, H. a Kindlmann P. (2007). Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia Plantarum* 51 (1): 198-200.

Zettler LW., Stewart SC., Bowles ML. a Jacobs KA. (2001). Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *American midland naturalist* 145 (1): 168-175

Zettler LW. a Hofer CJ. (1998). Propagation of the little club- spur orchid (*Platanthera clavella*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany* 39: 189–195.

Webové stránky:

[life.bio.sunysb.edu/morph](http://life.bio.sunysb.edu/morph)

[sites.google.com](http://sites.google.com)

[www.bonsai-dnes.cz](http://www.bonsai-dnes.cz)

[www.bottany.cz](http://www.bottany.cz)

[www.efloras.org](http://www.efloras.org)

[www.hewo.com](http://www.hewo.com)

[www.icimod.org](http://www.icimod.org)

[www.orchidspecies.com](http://www.orchidspecies.com)

[www.naturabohemica.cz](http://www.naturabohemica.cz)

[www.speciesorchids.com](http://www.speciesorchids.com)

[www.unep-wcmc-apps.org](http://www.unep-wcmc-apps.org)

[www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

## 7 Přílohy

Příloha 1: Popis lokalit použitých druhů orchidejí v Průhonicích.

Taxon	lokalita	Datum odběru	Stav ohrožení
<i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) SOÓ spp. <i>maculata</i> <b>(DM)</b>	Českolipsko  Popis místa: zrašelinělá louka Molinia caerulea a rákos) o rozloze 200m <sup>2</sup> , pod Konvalinkovým vrškem, severně od kvóty Bývalý hrádek	Srpen 1998	Kritický
<i>Cypripedium calceolus</i>	Soukromý zahradním p. Stupka	Podzim 2009	Kritický
<i>Dactylorhiza incarnata</i> (L.) SOÓ spp. <i>serotina</i> <b>(DI)</b>	Českolipsko  U Máchova jezera	Září 2004	Kritický
<i>Dactylorhiza incarnata</i> (L.) SOÓ spp. <i>serotina</i> <b>(DIS)</b>	Českolipsko  Popis místa: zrašeliní louka s ostřicovými buly s převládajícím <i>Menyanthes trifoliata</i> u borového lesa směrem k silnici Česká Lípa – Bělá p. bezdězem o rozloze 80 m <sup>2</sup>	Srpen 1998	

Příloha 2: Seznam použitých mykorhizních izolátů.

CBSnr	488.93
Name	<i>Rhizoctonia sp.</i>
Isolated from	<i>Dactylorhiza incarnata</i>
Location	Denmark, Zealand, Holmegaard
Isolated by	Botanical Laboratory, University of Copenhagen, Denmark, D
Deposited by	T.F. Andersen
Date of accession	Sep 1993
Conds for growth	MEA, OA
Preservation	AG (6 mo),LN,LY,MO
Supply	Active

CBSnr	486.93
Name	<i>Rhizoctonia sp.</i>
Isolated from	<i>Dactylorhiza majalis</i>
Location	Denmark, Zealand, Tryggevaelde
Isolated by	Botanical Laboratory, University of Copenhagen, Denmark, D 93-
Deposited by	T.F. Andersen
Date of accession	Sep 1993
Conds for growth	MEA, OA
Preservation	LN,LY,MO
Supply	Active

Příloha 3: Popis živného média L1P a jeho komponenty.

Zásobní roztoky	g/ 150 ml	ml/ 250 ml	ml/L
AV KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.20	0.5	2
Mg SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	18.45		
KCl	11.25		
BV CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.9 g/100 ml	0.25	1
CV kys. Citronová	19.2 g/100 ml	0.25	1
D1V (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13.2 g/100 ml	0.25	1
E1V	mg/ 100 ml		
biotin	10	2.5	10
pyridoxin	10		
thiamin	10		
inositol	10		
kys. Listová	10		
niacinamid	10		
Ca pantothenát	10		
			g/L
glukóza			10
sacharóza			10
aktivní uhlí			1
casein hydrolyzát			0.5
yeast extrakt			0.5
Fytoagar	7,5 g/l, pH 5,3		

Příloha 4: Popis živného média L1P/A a jeho komponenty.

Zásobní roztoky	g/ 150 ml	ml/ 250 ml	ml/L
AV KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.20	0.5	2
Mg SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	18.45		
KCl	11.25		
BV CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.9 g/100 ml	0.25	1
CV kys. Citronová	19.2 g/100 ml	0.25	1
E1V	mg/ 100 ml		
biotin	10	2.5	10
pyridoxin	10		
thiamin	10		
inositol	10		
kys. listová	10		
niacinamid	10		
Ca pantothenát	10		
			g/L
pepton (org. N)			0,5
glukóza			10
sacharóza			10
aktivní uhlí			1
casein hydrolyzát			0.5
yeast extrakt			0.5
Fytoagar	7,5 g/l, pH 5,3		

Příloha 5: Popis živného média podle Malmgren (1996), upraveno podle H. Vejsadové.

1MC	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	4 ml/l
2MC	$\text{KHPO}_4$	4 ml/l
3MC	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	4 ml/l
4MC	$\text{FeCl}_3$	1 ml/l
5MC	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1 ml/l
biotin		0,005 g/l
kyselina listové		0,5 g/l
inositol		100 mg/l
thiamin		0,5 g/l
kyselina nikotinová		5 g/l
pyridoxin		0,5 g/l
glycin		2 g/l
aminokyseliny (SIGMA R 7131)		10 ml/l
ananasový džus		20 ml/l
aktivní uhlí		1 g/l
sacharóza		7,5 g/l
glukóza		7,5 g/l
agar dánský		12 g/l
pH 5,6		



Příloha 6: Popis živného média podle J. Van Weas (modf. VŠ).

Casein hydrolyseta	500 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300 mg/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	27,8 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	37,2 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	25 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
Myo-inositol	600 mg/l
1-glutamine	100 mg/l
1-glycine	2 mg/l
Niacin	5 mg/l
Thiamine	0,5 mg/l
Pyridoxine	0,5 mg/l
Biotin	0,05 mg/l
Kyselina listová	0,5 mg/l
Sacharóza	10 g/l
Glukóza	5 g/l
Maltósa	5 g/l
směs aminokyseli (Sigma M 7145)	1 ml/l

Příloha 7: Růstové stupně užívané pro hodnocení klíčení a vývoj vybraných druhů orchidejí v podmínkách *in vitro* (Zettler et al. 1998).

*Vysvětlivky:*

0 - neklíčící semeno,

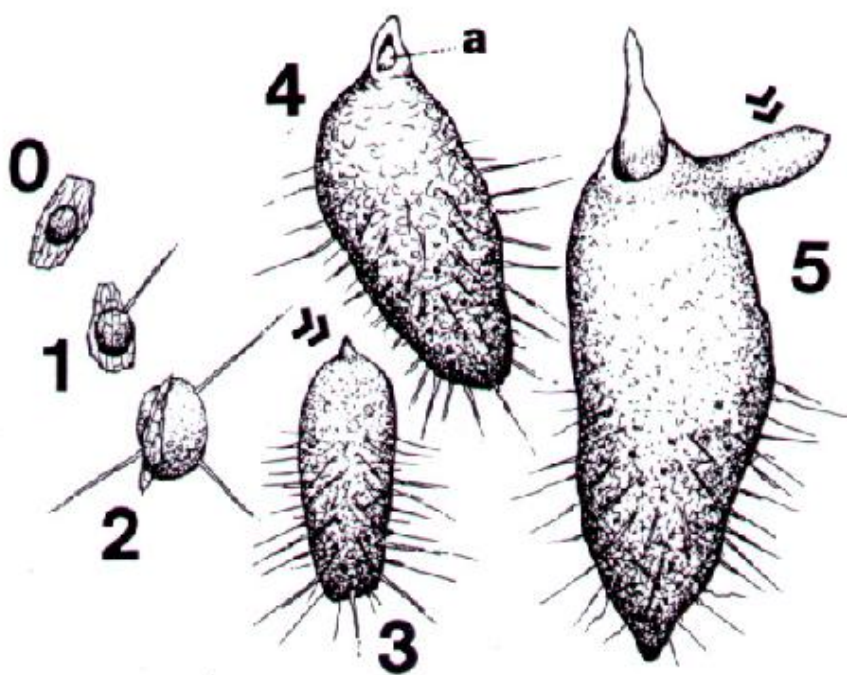
1 - produkce rhizoidů (klíčení),

2 - protržení testy a zvětšování embrya,

3 - objevení promeristému, označené šipkou,

4 - objevení prvního pravého listu (a),

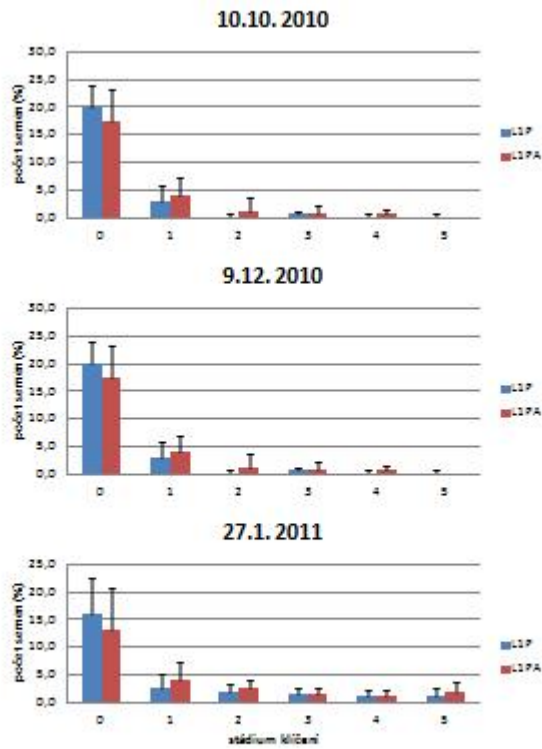
5 - prodlužování pravého listu a formování větvícího se kořene, označené šipkou. měřítko = 1 mm



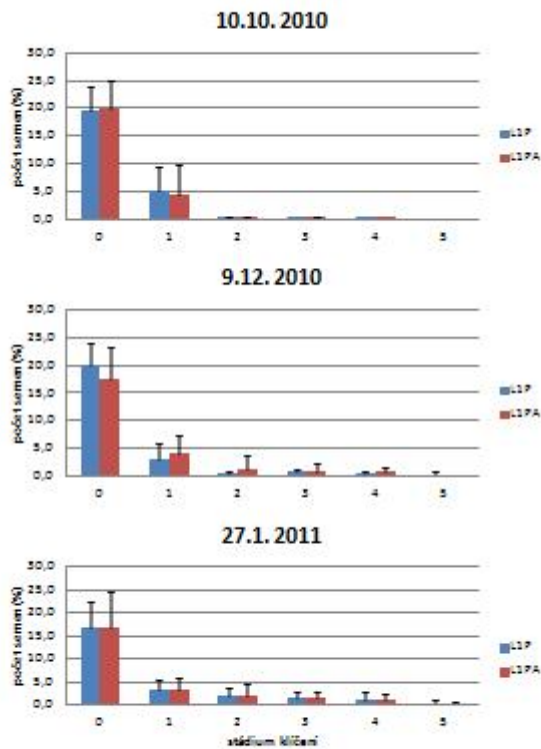
Příloha 8: Přehled použitých druhů orchidejí při dezinfekci semen a jejich doba dezinfekce.

<b>pokus č.</b>	<b>druh orchideje</b>	<b>délka dezinfekce (min)</b>
<b>I</b>	<i>Bletilla striata</i>	16
	<i>Cypripedium calceolus</i>	113
	<i>Dactylorhiza praetermissa</i>	37
	<i>Habenaria dentata</i>	27
	<i>Spiranthes odorata</i>	39
	<i>Dactylorhiza incarnata</i> ssp. <i>serotina</i> (S1998)	54
	<i>Dactylorhiza incarnata</i> ssp. <i>serotina</i> (Z2004)	58
	<i>Dactylorhiza maculata</i> ssp. <i>maculata</i>	35
<b>II</b>	<i>Cephalus longifolia</i>	71
	<i>Epipactis atrorubens</i>	92
	<i>Epipactis gigantea</i>	20
	<i>Epipactis helleborine</i>	37
	<i>Himantoglossum hircinum</i>	31
	<i>Nigritela nigra</i>	47
	<i>Spiranthes autumnalis</i>	28
<b>III</b>	<i>Cypripedium calceolus</i>	191
	<i>Cypripedium macranthos</i>	152
	<i>Dactylorhiza incarnata</i>	27
	<i>Dactylorhiza maculata</i>	28
<b>IV</b>	<i>Cypripedium calceolus</i> (s. Morava)	54
	<i>Cypripedium calceolus</i> (s. Čechy)	99
	<i>Cypripedium calceolus</i> (p. Stupka)	178

Příloha 8: Průběh klíčení u jednotlivých druhů orchidejí v pokusu č. I.

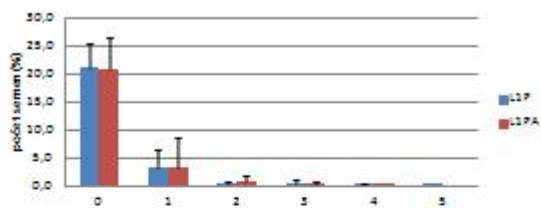


Průběh klíčení semen u druhu *Dactylochiza maculata* spp. *maculata* v pokusu č. I, který začal 11.8. 2010 ... L1P – médium bez peptonu, L1PA – médium s peptonem.

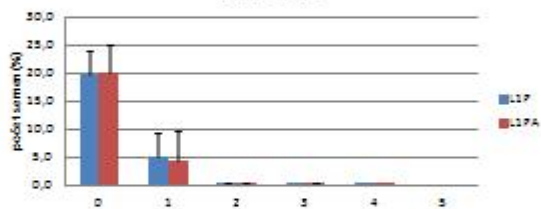


Průběh klíčení semen u druhu *Dactylochiza incamata* spp. *serotina* (srpen 1998) (DIS) v pokusu č. I, který začal 11.8. 2010 ... L1P – médium bez peptonu, L1PA – médium s peptonem.

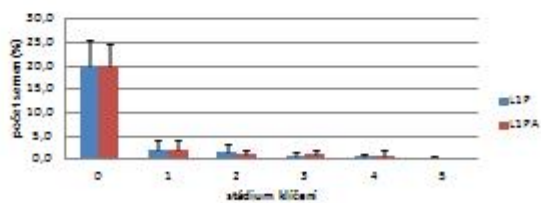
10.10.2010



9.12.2010

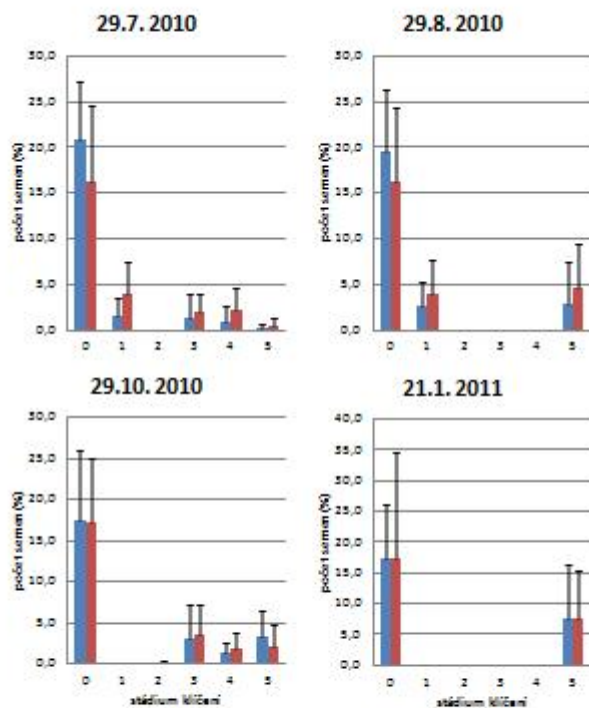
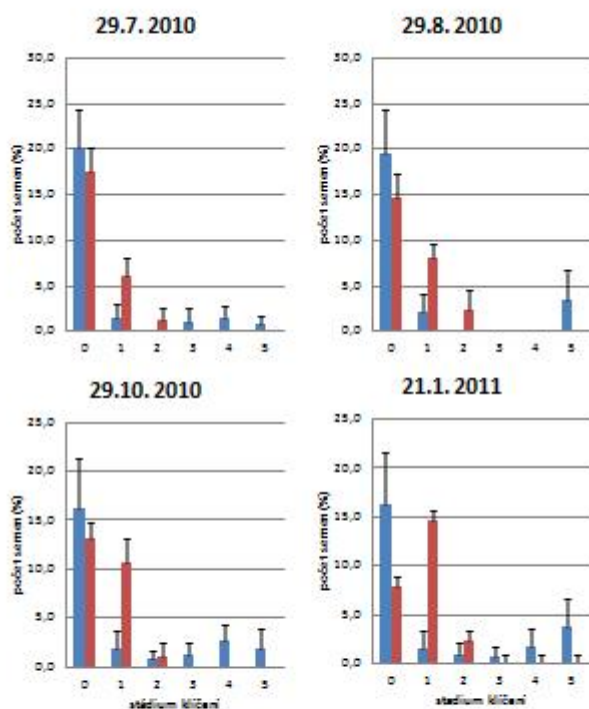


27.1.2011

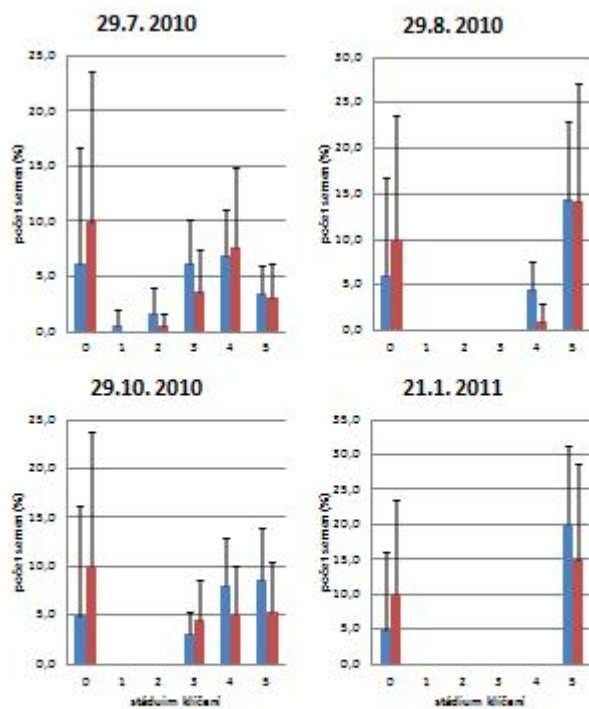


Příloha klíčení semen u druhu *Decylovlize incanata* ssp. *serotina* (zdřň 2004) (D1) v pokusu č. 1, který začal 11.8.2010 . . L1P – médium bez peptonu, L1PA – médium s peptonem.

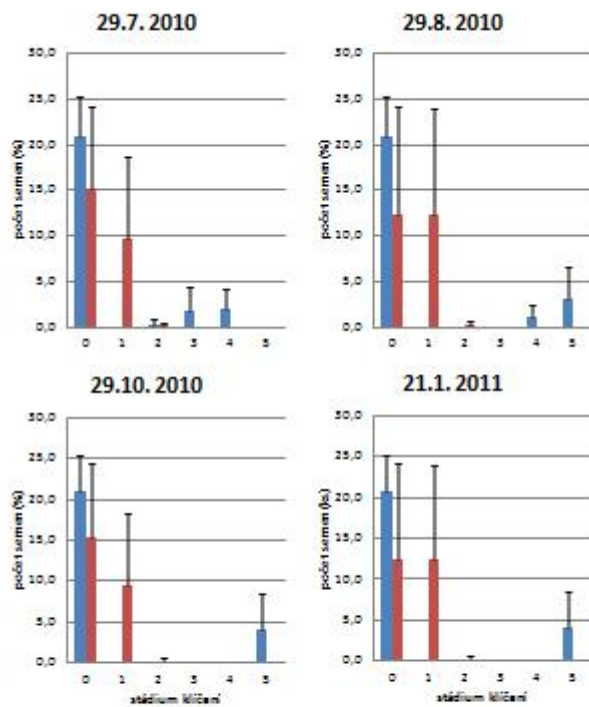
Příloha 9: Průběh klíčení u jednotlivých druhů orchidejí v pokusu č. III.



Průběh klíčení semen u druhu *Spiranthes odorata* v pokusu č. II, který začal 21.3. 2010. Modré sloupce – médium van Veen (mod. Vondruš), červené sloupce – LIP médium.

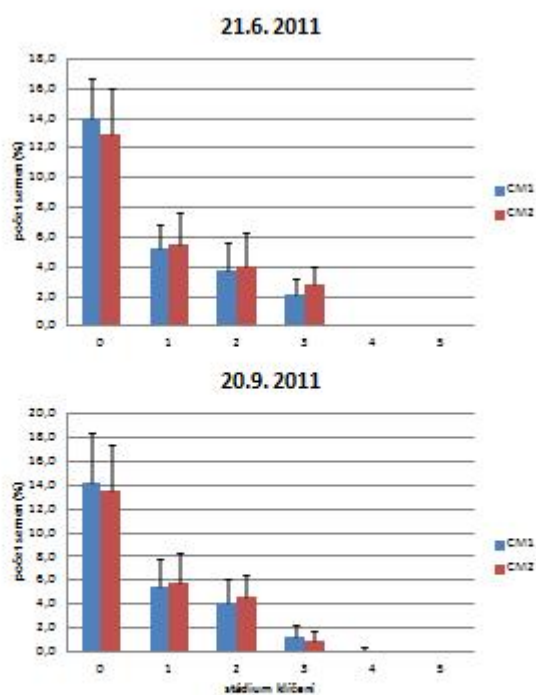


Příloha klíčení semen u druhu Bletilla striata v pokusu č. II, který začal 21.3. 2010. Modré sloupce – médium van Veas (mod. Vondruš), červené sloupce – L1P médium.



Příloha klíčení semen u druhu Dactyloctenium aegyptium v pokusu č. II, který začal 21.3. 2010. Modré sloupce – médium van Veas (mod. Vondruš), červené sloupce – L1P médium.

Příloha 10: Průběh klíčení u jednotlivých druhů orchidejí v pokusu č. IV.



Průběh klíčení semen u druhu *Cypripedium calceolus* v pokusu č. IV ve dvou různých médiích (CM1 a CM2). Pokus začal 9.2. 2011. CM1 – médium obsahující chlévčí izolát; CM2 – médium s obsahem dusičnanu izolátového.



## Příloha 11: Složení pokusného substrátu Lukscheiter.

### *Složení:*

- Drcená piniová kůra,
  - Vláknitý rašeliník (*Sphagnum*),
  - Hnojivo NPK se stopovými prvky.
- vlhkost – max. 70%
  - spalitelné látky – min. 80%
  - pH 5,5 – 7,5
  - částice nad 20 mm – max. 15%
  - elektrická vodivost – max. 0,8 ms/cm (ve vodním výluhu v poměru 1:25)

Příloha 12: Klíčící semenáček ve 2. – 3. stupni asymbiotickém pokusu.



Příloha 13: Zkumavka s lehce infikovanou mykorhizní houbou v symbiotickém pokusu.

