

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Obnova orchidejových populací

na narušených stanovištích

Bakalářská práce

Lada Klimešová

Školitel: RNDr. Tamara Těšitelová Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jana Jersáková Ph.D.

České Budějovice 2016

Klimešová, L., 2016: Obnova orchidejových populací na narušených stanovištích. [The restoration of orchid's populations in disturbed habitats. Bc. Thesis, in Czech.] – 75 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

This thesis is composed of two parts: 1) review of techniques used in restoration of orchid's populations and research which is connected with them; 2) practical application of *in vitro* techniques for isolation, identification of mycorrhizal symbionts and evaluation of their potential for germination of *Dactylorhiza majalis*.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 12. 2016

.....

Poděkování

Za pomoc s bakalářskou prací bych především ráda poděkovala své školitelce Tamaře Těšitelové a také konzultantce Janě Jersákové, která mi pomáhala v době nepřítomnosti mé školitelky. Za pomoc s mými prvními molekulárními výsledky vděčím Lucii Jonátové. Chtěla bych zde však poděkovat i Melisse McCormick, která sice přímo nepřispěla ke vzniku této práce, ale spolu s Dennisem Whighamem a Jay O'Neillem značně rozšířila můj pohled na studium orchideoidní mykorhizy. Za úvod do techniky symbiotického výsevu vděčím Tomáši Figurovi, stejně tak i za cenné rady především v počátcích mého studia, kterými se mi spolu s Janem Ponertem snažili pomoci. Dále bych chtěla poděkovat Jiřímu Košnarovi, za rady ohledně molekulárních technik, Hélène Vogt-Schilb za pomoc s izolacemi mykorhizních hub i udržování jejich kultur a Jakubovi Staňkovi za pomoc při vyhodnocování výsevu a poskytnuté fotografie.

Na závěr děkuji své rodině, která mi byla oporou při psaní této práce. Především bych chtěla poděkovat Adamu Klimešovi, za pomoc se statistickým vyhodnocením dat a Jitce Klimešové za mnohé korektury a psychickou podporu.

Obsah

Obsah	9
1. Úvod.....	6
1.1 Cíle práce	8
2. Čeleď Orchideaceae.....	8
2.1 Orchideoidní mykorhizní symbióza.....	9
2.1.1 Houby tvořící orchideoidní mykorhizu.....	10
2.1.2 Přenos živin.....	11
2.1.3 Druhovú specifita	11
2.2 Životní cyklus orchidejí	13
2.3 Co ovlivňuje rozšíření orchidejí v přírodě.....	15
2.4 Obnova orchidejových stanovišť a populací.....	16
2.4.1 Ochrana lučních orchidejí.....	18
2.4.2 Možnosti výzkumu ochrany.....	19
2.4.3 Dlouhodobé uchovávání semen a mykorhizních hub	20
2.5 Přehled metod používaných při obnově orchidejových populací.....	21
2.5.1 Klíčení semen <i>in situ</i>	21
2.5.2 Izolace mykorhizních hub do kultury	23
2.5.3 Identifikace kultur pomocí molekulárních metod.....	28
2.5.4 Symbiotický a asymbiotický výsev semen <i>in vitro</i>	29
2.5.5 Udržování houbových kultur	32
2.5.6 Výsev semen přímo do půdy	33
2.5.7 Transplantace orchidejových semenáčků	36

3. Materiál a metody	38
3.1 Popis druhu <i>Dactylorhiza majalis</i>	39
3.1.1 Odběr materiálu	39
3.1.2 Sterilizace kořenů a izolace pelotonů	40
3.1.3 Udržování a čištění houbových kultur	41
3.1.4 Identifikace houbových kultur za použití molekulárních metod	42
3.1.5 Symbiotický a asymbiotický výsev	44
3.1.6 Vyhodnocení výsevu.....	46
3.1.7 Statistická analýza dat.....	47
4. Výsledky	48
5. Diskuse.....	52
6. Závěr	55
7. Literatura.....	57
8. Přílohy.....	70
8.1 Přehled médií	70
8.2 Obrázky.....	74

1. Úvod

Rostlinná společenstva jsou v současné době ohrožena v naší kulturní krajině zejména ztrátou vhodných stanovišť, vlivem změn půdních vlastností, nepůvodními výsadbami nebo změnami obhospodařování (Tsiftsis et al. 2011). To vede k ochuzení druhové bohatosti nebo změně druhového složení. Proto některé typy společenstev chráníme nebo se je snažíme obnovovat tam, kde byla původní společenstva zničena (Swarts a Dixon, 2009).

Ekologická obnova má za cíl pomocí technických a biologických opatření umožnit vznik rostlinných společenstev, která jsou v krajině vzácná nebo hostí vzácné druhy. Při obnově je možné použít aktivního přístupu, kde v zájmu dosažení cílového stavu je upravován terén, dosévána semena, odstraňována biomasa apod. Alternativou je pasivní přístup, kdy je plocha ponechána spontánní sukcesi (Jongepierová et al., 2012). Zatímco aktivní přístup je nezbytný při obnově společenstev vyžadujících obhospodařování (louky) nebo substrátů, které jsou kontaminovány, mají změněný vodní režim apod., pasivní obnova je vhodná, je-li cílovým společenstvem les či lom (Prach a Hobbs, 2008). Jaký přístup při obnově se zvolí, závisí na cílovém stavu, na tom, jestli biotické a abiotické podmínky dovolují cílového stavu dosáhnout; svou roli hrají také ekonomické podmínky, tedy jaké prostředky můžeme na obnovu vynaložit (Swarts et al., 2010).

Cíle obnovy společenstev mohou být definovány cílovými druhy, druhovou bohatostí nebo produkcí biomasy, cílovými životními formami apod (Maunder, 1992). Některé druhy jsou nejen vzácné a tedy žádoucí při obnově narušených lokalit, ale mohou být současně symboly druhově bohatých společenstev a snadno mohou sloužit jako motivace obnovy pro širokou veřejnost. Takovou skupinou mohou být orchideje, jakožto skupina rostlin, která vyžaduje kvalitní, nedegradovaná stanoviště, je na pohled velmi estetická a navíc známá i neodborné veřejnosti. Příčinou jejich vzácnosti jsou kromě nízké konkurenceschopnosti také jejich komplikované vztahy s ostatními organismy, jako jsou opylovači, nebo symbiotické houby. Z toho důvodu jsou velice náročné na prostředí, to musí být vhodné nejen pro ně, ale také pro jejich symbionty a

opylovače (Cribb et al., 2003; Seaton et al., 2010). Protože většina orchidejí je v přírodě ohrožených, často jde o tzv. vlajkové druhy ochrany přírody i ekologické obnovy (Swarts a Dixon, 2009).

Ke vzniku orchidejových populací dochází spontánně při sukcesi na haldách po těžbě nerostných surovin, na lávových tocích, těžebních polích, písečných dunách či místech konstrukce (Light et al., 2003), pro které je typický živinami chudý substrát (Shefferson et al., 2008). Na druhou stranu, při obnově luk na orné půdě, je spontánní kolonizace orchidejemi problematická (Vandepitte et al., 2012; Kull et al., 2016).

Lokality vhodné k osídlení orchidejemi jsou často limitovány disperzí semen (Těšitelová et al., 2012; De hert et al., 2013). Dále pak jejich schopností uchytit se v porostu (De hert et al., 2013). Limitace šířením semen se však týká nejen orchidejí, ale i ostatních druhů. Řešením této situace je vysévání regionální směsi semen z druhově bohaté lokality (Prach et al., 2012). Jiným způsobem obnovy cílových druhů může být výsadba semenáčků či celých bloků půdy (Mudrák et al., 2016).

Dalším významným důvodem je přítomnost velkého množství živin v půdě a mezidruhovú konkurence (Jersáková et al., 2002). Velká živinová bohatost se řeší pravidelnou sečí a odstraňováním biomasy. Disperze a nadbytek živin však nejsou jedinými faktory limitujícími výskyt orchidejí. Díky druhově specifickým vztahům s opylovači, může být obnova populací limitována jejich přítomností. Opylovači jsou mnohem náročnější na velikost lokality a na jejím propojení (koridory) s ostatními populacemi (Hanula et al., 2016). V současné fragmentované krajině izolované a vzdálené populace mohou trpět nedostatečnou výměnou genetického materiálu (Roberts, 2003).

Obnova orchidejových populací je z těchto důvodů náročná a komplexní. Já se ve své práci zabývám problematikou symbiotických hub a jejich úlohou v životním cyklu rostliny. Význam mykorhizních hub je největší v průběhu klíčení a růstu semenáčků, což je první krok v obnově populace (Swarts a Dixon, 2009). O důležitosti navázání vztahu mezi klíčícím semenem a houbou, svědčí fakt, že většina literatury zabývající se obnovou orchidejových populací, se věnuje právě jemu.

1.1 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámit se s technikami používanými při obnově orchidejových populací a výzkumu, který se s touto problematikou váže. Moje práce má dvě části:

(1) Vybrané metody jsem měla co nejlépe popsat v rámci literární rešerše a to jak metody *in situ*, tak i metody *ex situ*. Abych co nejlépe porozuměla celé problematice, postupovala jsem v literární rešerši podle životního cyklu orchidejí ve vztahu k možnostem obnovy populací, zaměřila jsem se především na orchideoidní mykorrhizní symbiózu.

(2) V praktické části jsem si metody *ex situ* měla osvojit na vybraném druhu orchideje *Dactylorhiza majalis*.

2. Čeleď Orchideaceae

Orchideje jsou jednou z nejbohatších čeledí rostlin, obsahující téměř 10% všech krytosemenných druhů rostlin (McCormick et al., 2016). Odhadovaný počet druhů je 25 000, čímž tvoří více než 40% jednoděložných rostlin (Dressler, 2005). Ačkoliv jsou orchideje převážně tropickými epifytickými rostlinami, vyskytují se až po boreální pásmo.

Orchideje mají obrovskou strukturní a funkční diverzitu a nejen proto jsou ideální vlajkovou skupinou ohrožených rostlin (Swarts a Dixon, 2009). U žádné jiné čeledi není možné nalézt tak různorodé formy opylování s rozličnými mimikry lákající opylovače (od hmyzu, hlodavců až po ptáky). Jako odměny zde slouží nektar i oleje, setkáme se ale i s velkým množstvím šálivých květů (Tremblay, 2006). Důvodem je společná koevoluce orchidejí a jejich opylovačů, např. u rodu *Ophrys*. Orchideje jsou charakteristické spodním semeníkem, zygomorfním okvětím a redukovanými tyčinkami (alespoň částečně přeměněné v gynostemium) (Rasmussen a Rasmussen, 2014).

Jediným unikátním znakem orchidejí je však nefotosyntetické mykotické stádium semenáčku (Rasmussen a Rasmussen, 2014). Symbiotický vztah se nazývá

Orchideoidní mykorhiza a provází orchidej během celého životního cyklu. Orchideje, a v některých případech i jejich růstová stádia, asociují s širokou škálou různých druhů mykobiontů. Hlubším vztahům v této problematice se věnuji v samostatné kapitole nazvané „2.1.1 Orchideoidní mykorhizní symbióza“.

U orchidejí byl také pozorován stav zvaný vegetativní dormance, který souvisí s významností mykorhizní symbiózy. Během této doby se orchidej zmenší jen na podzemní struktury, které mohou přežít v podzemí i několik let (Whigham et al., 2014). Faktory ovlivňující pravděpodobně přechod orchideje do dormance jsou: snížené množství světla, změna hydrobiologie, špatný stav mykorhizního symbionta či jeho abundance (McCormick a Whigham, 2012).

2.1 Orchideoidní mykorhizní symbióza

Orchideoidní mykorhizní symbióza je jev, kterým je popsáno soužití orchideje s mykorhizní houbou. Symbiotický vztah s houbou je pro orchidej nezbytný zejména v prvních stádiích vývoje, (např. Whigham et al., 2002), později je míra závislosti nejasná a množství mykorhizního symbionta v kořenech u dospělého se liší druh od druhu.

Závislost orchidejí na mykorhizní symbióze byla zkoumána například v práci Gebauera a Meyerové (2003). Většina terestrických orchidejí má i v dospělosti jen malé množství nevětvených tlustých kořenů s přítomnými mykorhizními strukturami (Rasmussen, 1995), které jsou schopné získávat živiny a vodu z konkurenčního půdního prostředí jen v omezené míře. Tuto funkci za ně přebírají právě mykorhizní houby, které se u terestrických orchidejí nachází v bohatě vyvinuté primární kořenové kůře (kortexu) (Rasmussen a Whigham, 2002). Orchideoidní symbióza není známá z žádné jiné čeledi než z čeledi Orchidaceae, ačkoliv samotná schopnost rostlin tvořit mykorhizu je značně rozšířená (Gryndler, 2004).

U orchideoidní mykorhizy popisujeme typ růstu hub v kořeni jako tolypofágní (vyskytující se u většiny orchidejí) a ptyofágní (zaznamenán jen u malého počtu vysoce mykoheterotrofních tropických orchidejí) (Rasmussen, 1995). Dále je tento typ

mykorhizy endotrofní, což znamená, že mykorhizní houba proniká do vnitřního prostoru buněk kořene hostitele a to skrze buněčnou stěnu v místech kde je slabá či zcela chybí (Rasmussen, 1995). Mimo orchideoidní mykorhizu do této skupiny patří i mykorhiza arbuskulární a erikoidní. Orchideoidní mykorhiza je charakteristická právě způsobem růstu hyf uvnitř buněk kořene (v prostoru mezi buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou), kde se tvoří klubka hyf, nazývané pelotony a také jeho dvojí kolonizací. K první kolonizaci dochází ihned po vyklíčení semene, ke druhé fázi kolonizace dochází v kořenových pletivech orchideje, kdy po proniknutí skrz pokožku kolonizuje houba buňky kořenové kůry (Gryndler, 2004). Růst houby uvnitř kořenového pletiva je po celou dobu usměrňován rostlinou pomocí fungicidních phytoalexinů (Beyrle et al. 1995). Některé druhy pravděpodobně potřebují být kolonizovány znovu každý rok, jako například orchideje v západní Austrálii. Symbiont je během letní aestivace redukován a následně jsou kořeny opět kolonizovány na začátku sezóny (Ramsey et al., 1986).

2.1.1 Houby tvořící orchideoidní mykorhizu

Orchideje se váží převážně na nepříbuzné čeledi hub ze skupiny Basidiomycetes, a to Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae a Sebacinaceae, jež se často označují společným názvem „rhizoktonie“. Jedná se o saprotrofní, parazitické či endofytní (v případě Sebacinaceae) druhy hub (Dearnaley et al., 2012). Mnoho nefotosyntetizujících druhů a některé fotosyntetizující orchideje, které rostou ve stinném prostředí, tvoří mykorhizu s ektomykorhizními houbami či slabě patogenními houbami (Rasmussen, 2002). Některé orchideje tvoří symbiózu také s druhy čistě parazitickými (Rasmussen, 2002), obecně se jedná u patogenních rhizoktonií o nekrotrofické parazity, které napadeného hostitele nejprve zabijí a následně žijí saprotrofně (Roberts, 1999). Příkladem jsou houby *Armillaria* a *Armillariella* (Brundrett, 2002).

U ektomykorhizních hub tvořících zároveň orchideoidní mykorhizu bylo potvrzeno, že tentýž houbový jedinec je schopen vytvořit typické ektomykorhizy na kořenech stromu a orchideoidní mykorhizní struktury v kořeni orchideje (McKendrick et al. 2000). Tento vztah je označován jako „trojstranná symbióza“. Orchidej se

v takové interakci chová jako epiparazit na jiné rostlině a mykorhizní symbiont jako prostředník, příkladem je orchidej *Corallorhiza maculata* (Taylor a Bruns, 1997). Tato skutečnost byla potvrzena metodou izotopového značení, čímž byl demonstrován přenos uhlíku ze stromu do orchideje skrze mykorhizní houby (McKendrick et al., 2000).

2.1.2 Přenos živin

Dlouhou dobu byl vztah mezi dospělou fotosyntetizující orchidejí a jejím mykobiontem popisovaný jako oboustranně prospěšný. Je známo, že nefotosyntetická stádia orchideje jsou plně závislá na příjmu živin, včetně potřebného uhlíku, od symbiotické houby. Tento způsob výživy je popsán jako mykoheterotrofie (Rasmussen a Rasmussen, 2009). Nicméně u fotosynteticky aktivních dospělých jedinců je míra závislosti na uhlíku získaném od houby různá a jejich způsob výživy popisujeme jako autotrofii či mixotrofii (kombinující zisk uhlíku od hub a z vlastní fotosyntézy).

Získávání živin ve prospěch orchideje má převahu nad oboustrannou výměnou, která je jinak charakteristická pro ostatní typy mykorhiz (Alexander a Hadley, 1985; Rasmussen a Rasmussen, 2009). Není známý žádný případ, kdy by houby tvořící mykorhizu s orchidejemi byly na tomto vztahu závislé (Rasmussen a Rasmussen, 2009). Nicméně bylo navrženo, že se u orchidejí a jejich symbiontů může vyskytovat mutualistický vztah a to na základě *in vitro* pokusu s druhem *Goodyera repens* a s ní pojící se saprotrofní houbou (Cameron et al., 2006). V rámci tohoto výzkumu bylo ¹⁴CO₂ poskytnuto listům orchideje a následně byl změřen 2% tok značeného uhlíku do mycelia vyrůstajícího ze sterilizovaných kořenů.

2.1.3 Druhová specifita

Druhová specifita orchideoidní mykorhizy je často zkoumaným jevem. Najdeme jak druhy orchidejí zcela specifické a vázající se jen na jeden druh houby, tak i druhy, které jsou jen málo specifické a tvoří mykorhizu s větším množstvím druhů hub.

Fotosyntetizující orchideje nemají větší diverzitu symbiontů v porovnání s orchidejemi neschopnými fotosyntézy (McCormick et al., 2004).

Jediná orchidej může tvořit mykorhizní symbiózu s jedním i více druhy hub najednou, či postupně vystřídat symbionty během svého růstu. McCormick et al. (2006) tyto typy soužití přirovnávají k monogamii, polygamií a sériové monogamii. V této teorii je předpokládáno, že u druhů polygamiích se orchidej při změně symbionta nevyskytne zcela bez mykorhizy. V případě sériové monogamie se má za to, že orchidej musí být schopná přežít krátkodobě bez symbiózy. Změna hostitelské houby je náročným aktem, který však dovoluje orchidejím vypořádat se se špatnými podmínkami prostředí. Orchideje, které tvoří symbiotický vztah s omezeným množstvím mykorhizních hub, jsou tak oproti ostatním více limitovány svou schopností tolerovat distribuci symbionta a environmentální změny (McCormick et al. 2004). Takovým příkladem může být výměna symbionta způsobena suchem (McCormick et al. 2006).

. V období náhlého sucha bylo prokázáno, že se zmenšuje množství symbionta asociujícího s orchidejí. Špatný stav mykorhizní houby má na orchidej negativní vliv a může mít za následek její upadnutí do dormance. Populace orchidejí, které jsou ohrožené a počty jejich jedinců se snižují, mají vždy zvyšující se množství jedinců dormantních, kteří následně mizí zcela, pokud se podmínky na dané lokalitě nezlepší (Shefferson et al., 2003, McCormick a Whigham, 2012).

Příbuzné druhy orchidejí mívají podobné symbionty. Ukazuje se však, že sympatricky rostoucí příbuzné druhy orchidejí tvoří symbiózu s rozdílnými druhy hub a tím se vyhýbají kompetici mezi sebou. Například dva sympatrické druhy z rodu *Corallorhiza* sice tvořily symbiózu s houbami ze skupiny Russulaceae, ale v konkrétních druzích hub se mezi sebou nepřekrývaly (Taylor a Bruns, 1999). Také ploidie může mít určitý vliv na soužití s vhodnými symbionty, například u druhu *Gymnadenia conopsea* dochází s polyploidizací i ke změně mykorhizních symbiontů. Tato skutečnost ulehčuje soužití různých cytotypů na jedné lokalitě, protože dochází mezi nimi k menší konkurenci (Těšitelová et al., 2013).

Podobně jako dospělci, i plně mykoheterotrofní stádium protokormu je různě specifické a specifická k houbovým symbiontům se může měnit během života

orchideje. Například Zelmer et al. (1996) zjistili, že semenáčky orchidejí často tvoří mykorhizu s širším spektrem hub než dospělí jedinci. Ale může nastat i opačná situace – např. Rasmussen (2002) ukázala, že houby vyizolované z pelotonů z kořenů dospělců neměly vždy pozitivní efekt na klíčení semen *in vitro* a tvořily tedy mykorhizní symbiózu pouze s dopělci.

Zajímavý výzkum byl proveden ve studii *in vitro* (McCormick et al., 2006) s druhem *Goodyera pubescens*, kde bylo zjištěno, že mykorhizu tvoří jen s jedním druhem houby a pokud je protokorm nucen (v tomto případě přesazením na médium prorostlé jinou mykorhizní houbou) vyměnit svého symbionta, je to pro něj často smrtící. Ačkoliv k této změně může v přírodě docházet, laboratorní výsledky poukazují právě na vysokou mortalitu protokormů. Tyto výsledky však není možné jednoduše zobecnit, a to z důvodu velké specifity symbiontů u zkoumaného druhu *Goodyera pubescens*, v průběhu celého životního cyklu se pojí s malou skupinou blízce příbuzných hub z rodu *Tulasnella* (McCormick et al., 2004).

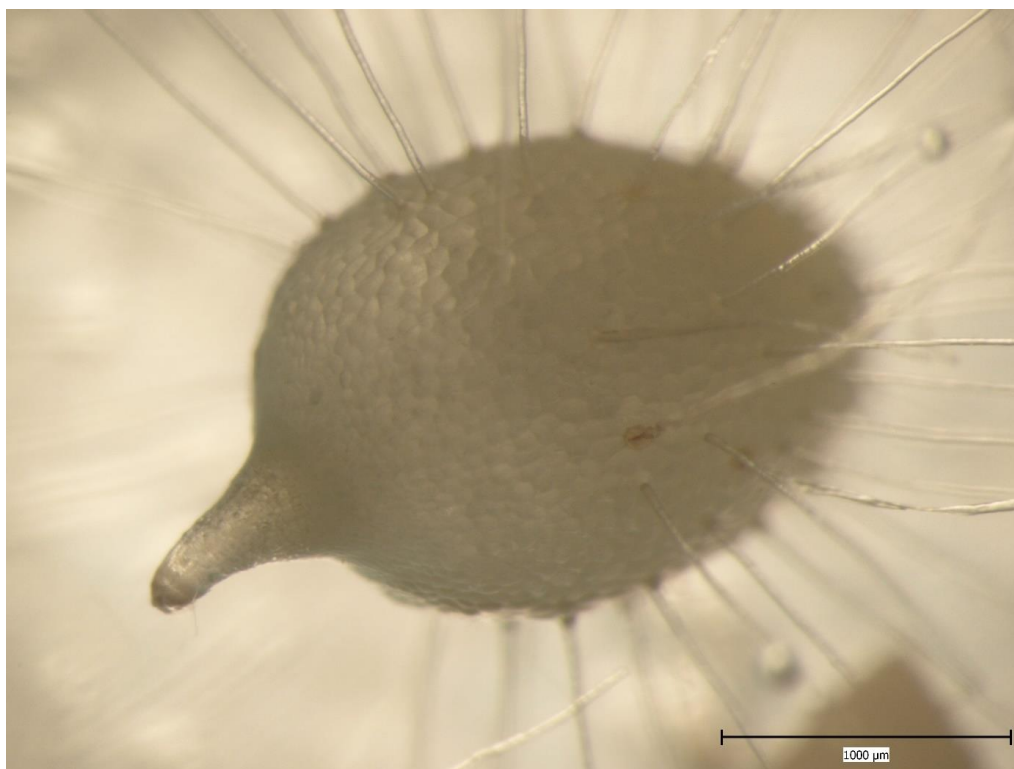
2.2 Životní cyklus orchidejí

Životní cyklus orchidejí je komplexní, od samotného embrya až po dospělého jedince zde dochází k velké míře selekce jedinců (Rasmussen a Whigham, 1998a). Pochopení životního cyklu orchidejí je důležitým krokem k jejich ochraně. Jednotlivé druhy se mezi sebou liší v míře specializace na mykorhizního symbionta, ale i vlastnostmi jednotlivých životních stádií a délkou jejich trvání.

Semena orchidejí jsou charakteristická svou malou velikostí – (0,05 – 6 mm) a váhou (0,31 – 24 µg), kvůli které je nazýváme „prachová semena“. Orchideje produkují takovýchto semen i několik tisíc (Arditti a Ghani, 2000). Semena jsou tak malá, že neobsahují téměř žádný endosperm, potřebný k výživě během raných fází růstu (Rasmussen, 1995). Dále je na nich nápadná testa, což je obal, který kryje zárodek. Testa má druhově specifický tvar a zabarvení a během bobtnání a růstu semene v protokorm praská. Skrze testu je embryo vidět a tak je celý tento proces možné jednoduše zaznamenat pod světelným mikroskopem.

Většina druhů je schopna začít klíčit bez symbionta, ale následně je pro ně nutné vhodné mykorhizní symbionta nalézt. Houba tvořící orchideoidní mykorhizu zásobuje embryo všemi potřebnými živinami, včetně uhlíku (Rasmussen, 1995).

Dalším stádiem růstu je protokorm. Jedná se o nefotosyntetické stádium vývoje orchideje, které je plně závislé na mykorhize (Obr. 1). V tomto stádiu přežívá orchidej pod půdním povrchem několik měsíců až let (např. Rasmussen a Whigham, 1998b). Během této doby se postupně protokormy vyvíjí, zvětšují a mění svůj tvar. V určité fázi vyrůstá z protokormu nadzemní prýt a životní cyklus je završen stádiem převážně fotosyntetizujícího dospělého.



Obr. 1: Protokorm druhu *Dactylorhiza majalis* pocházející z *in vitro* symbiotického výsevu. Protokorm je již ve fázi hruškovitého tvaru se zřetelným růstovým vrcholem a rhizoidy.

2.3 Co ovlivňuje rozšíření orchidejí v přírodě

Ačkoliv jsou semena orchidejí způsobilá k přenosu na větší vzdálenosti a to i na několik tisíc kilometrů vzdálené sopečné ostrovy (Arditti a Ghani, 2000), většina semen orchidejí nepadá daleko od mateřské rostliny, což vede k limitaci dostupnosti semen (Jersáková a Malinová, 2007). Na druhé straně semena vysemeněná poblíž mateřských orchidejí mají výrazně lepší podmínky pro svůj růst kvůli zvýšené pravděpodobnosti získání vhodného houbového symbionta, který se nachází v okolí dospělých rostlin (Whigham et al., 2002; McCormick et al., 2016). Semena některých druhů i přes svou nepatrnou velikost mohou zůstat v bance semen i několik let, kde čekají na příhodné podmínky k vyklíčení (Whigham et al., 2006).

Při výzkumu klíčení *in situ* bylo zjištěno, že klíčení semen je pozitivně korelované s výskytem dospělých jedinců (Batty et al., 2001; Diez 2007; Jacquemyn, et al., 2009). Předpokládá se, že důvodem je rozmístění mykorhizních hub a edafické podmínky. Naopak ve studii Těšitelové et al. (2012) se ukázaly být dobrým prediktorem klíčení protokormy v pokročilejším stádiu růstu a ne dospělí jedinci. Dospělé rostliny některých druhů mohou být náročnější na prostředí než jejich juvenilní stádia. Během vývoje orchideje může také dojít k posunu niky a tak jsou semenáčky schopné se vyvinout na širším spektru lokalit, než rostou dospělci (Těšitelová et al., 2012).

Orchidejová semena i dospělci však nejsou limitovány jen svou disperzí, ale i biotickými a abiotickými podmínkami na ni působící (Batty et al., 2001; Diez 2007; McCormick et al., 2012). Mezi abiotické faktory řadíme pH, vlastnosti půdy, množství organické hmoty, vlhkost, světelné podmínky atd. Například zimní teploty a srážky se ukázaly být určující pro přežití orchideje (Pfeifer et al. 2006). Co se týče biotických podmínek, vhodný symbiont je spolu s opylovači pro úspěšný růst orchideje nepostradatelný. Důležitá je i interakce mezi jednotlivými faktory, což má za následek velkou úmrtnost semenáček (Rasmussen, 2002). I přes poměrně velké množství klíčících semen, od 30 do 89% na vhodných mikrostanovištích (Rasmussen a Whigham, 1993; McKendrick et al., 2000), stádia protokormu dosáhne méně než 1% semen (Batty et al., 2001). Například druh *Caladenia arenicola* průměrně vyprodukuje za rok 1200 semen, 50% z nich se dostane do semenné banky, vhodného mikrostanoviště ke klíčení

dosáhne 10% a stádia semenáčku dosáhne jen přibližně 0,4 jedinců na mateřskou rostlinu za rok (Batty et al., 2001).

Ukázalo se však, že ačkoliv mají orchideje složitý a komplexní vztah s prostředím, ve kterém rostou, mohou i ony být jedněmi z prvních kolonizátorů. V Estonsku byly pozorovány orchideje rostoucí na environmentálně degradované lokalitě popelových výsypek a haldách po těžbě, s půdou a vodou kontaminovanou sírou a toxickými kovy (Shefferson et al., 2008). U všech zkoumaných orchidejí byly nalezeny mykorhizní houby, které se nelišily od populací rostoucích v přirozených místech výskytu (Shefferson et al., 2008).

Je zřejmá snaha o rozpoznání vhodných podmínek pro výskyt orchidejí, za účelem jejich případné reintrodukce. U orchidejí vázajících se na ektomykorhizní (ECM) houby bylo zjištěno, že množství ECM kořenových špiček není určující pro abundanci houby v půdě, či její dostupnosti pro orchidej. Nicméně množství potencionálního hostitele nebo kolonizace ECM kořenů může být lepším indikátorem distribuce orchidejí než jen samotný výskyt vhodného symbionta (McCormick et al., 2009). O distribuci saprotrofních hub toho není příliš známo. Pro dřevokazné houby McCormick et al. (2012), Rasmussen a Whigham (1998a) zjistili, že výskyt hub rozkládající dřevo je pozitivně ovlivněn organickým substrátem – dřevem, stářím ekosystému a jeho vlhkostí.

Kvůli malé úspěšnosti přežití semenáčků a složitým mezidruhovým vztahům je vhodné zabývat se obnovou orchidejí jako komplexním problémem. Této problematice se věnuji v kapitole „2.5 Přehled metod používaných při obnově orchidejových populací“.

2.4 Obnova orchidejových stanovišť a populací

Ochrana a obnova populací orchidejí je problematická kvůli jejich složitému a často dlouhému životnímu cyklu, ale i faktorům, které jejich výskyt ovlivňují. Stejně jako ostatní rostliny ovlivňuje výskyt orchidejí biotické a abiotické faktory. Obzvláště však u orchidejí je potřeba pamatovat i na organismy žijící s orchidejemi v úzkém

vztahu, jako jsou mykorhizní houby, které jsou pro orchidej nezbytné, tak i na často druhově specifické opylovače. Výskyt orchideje je tedy podmíněn nejen vlastními biotickými a abiotickými faktory, ale i biotickými a abiotickými podmínkami svých symbiontů, které mohou být od orchideje různé (McCormick a Whigham 2012).

Například u druhu *Tipularia discolor*, který byl zkoumaný v jedné z prvních *in situ* studií, bylo zjištěno, že klíčí jen na rozkládajícím se dřevě. To bylo způsobeno tím, že mykorhizní houba asociující se semeny během klíčení je saprotrofní a rozkládá odumřelé dřevo. V dospělosti nejsou orchideje na tlejícím dřevě závislé a tak je možné je nalézt i v prostředí bez něj a to z důvodu změny mykobionta. Proto můžeme usuzovat, že abiotické podmínky (v tomto případě přítomnost tlejícího dřeva v substrátu) přímo limitují mykorhizní houbu a jen nepřímo orchidej v jejích časných stádiích. *Tipularia discolor* je tedy orchidejí, u které každý jedinec prožívá výraznou změnu abiotických podmínek během svého životního cyklu (Rasmussen a Whigham, 1998a).

V některých případech může být problém rozeznat na jaké stádium změna biotických či abiotických podmínek působí. Případem tohoto problému je lesní druh *Cypripedium acaule*, kterého během třináctiletého pozorování bylo nalezeno jen malé množství semenáčků, jejich velký nárůst byl zaznamenán teprve po narušení stromového korunového zápoje ohněm a okusem housenek. Po prosvětlení se objevilo velké množství nových rostlin, u kterých však nebylo známo, zda šlo jen o jedince v dormanci či nově vyklíčené semenáčky. Z toho důvodu nebylo možné říci, zda narušení prostředí působilo dobře na vznik nových semenáčků, přerušení dormance v podzemí rostoucích jedinců, či obojího (Gill, 1996). Rozlišit vyrůstající jedince je možné jen tím, že odkryjeme svrchní vrstvu půdy. Tento způsob je nutný, protože jedinci v dormanci se mohou výrazně zmenšit například kvůli herbivorii (Whigham, 1990).

2.4.1 Ochrana lučních orchidejí

V České republice nalezneme orchideje jak v lesních tak lučních ekosystémech. Ač ohroženy lidskou činností jsou obě skupiny, problematika obnovy populací lesních druhů je složitá kvůli jejich časté asociaci s ektomykorhizními houbami a nutné přítomnosti dlouhověkých mykorhizních dřevin. Ochrana těchto druhů je tak často závislá na zachování či jen citlivých zásazích do lesních porostů a je mimo zaměření této práce.

Orchideje rostoucí v lučních ekosystémech se pojí se saprotrofními houbami, které lze úspěšně pěstovat i *ex situ*, což umožňuje testovat v laboratorních podmínkách vliv různých podmínek prostředí na houby, ale i na symbiózu s orchidejí a tak i aktivnější přístup k obnově jejich populací na narušených stanovištích (Ponert et al., 2013). Luční ekosystém může být ohrožen několika způsoby, kromě hnojení luk i nevhodným časem seče (tedy při vrcholu vegetační sezóny), odvodňováním, přeměňováním luk v hospodářské pozemky (příliš intenzivní pastva či rozorávání) a jejich zvětvování ve větší a jednotné celky (Wotavová et al., 2004).

Často světlomilné a málo konkurenčně zdatné orchideje jsou negativně ovlivněny jak zástínem okolní vegetace, tak i přebytkem živin jako takovým (Janečková et al., 2006). Se zvyšující mírou živin (dusíku a fosforu) v půdě roste i vzrůst rostlin a postupně dochází k selekci nitrofilních druhů, kterým svědčí na živiny bohatý substrát (Ponert et al., 2013). Tím se stávají louky druhově méně bohaté a spolu se snižující diverzitou mizí i orchideje (Wotavová et al., 2004). Byla také zjištěna pozitivní korelace mezi výskytem orchidejí a množstvím bylin a naopak negativní korelace mezi výskytem orchidejí a trav (Dijk a Olf, 1994).

Příkladem konkrétního výzkumu je druh *Dactylorhiza majalis*, pro který bylo zjištěno, že je nejlepším plánem péče seč dvakrát ročně a to po odplození a následně před začátkem zimy. Při zkoumání vlivu teploty na růst byl potvrzen heliofytický status této orchideje (Jersáková a Kindlmann, 2004), květnové teploty měly vysoce signifikantní vliv na celkový povrch listů (Wotavová et al., 2004).

Důsledkem toho je nutné po seči odvážet rostlinnou biomasu, aby nedocházelo k zástínu orchidejí a k pomalé změně ku živinami bohatému, ale na druhy chudému

stanovišti. Tento management byl shledán nejlepším v porovnání s kosením ob rok či jeho naprosté absenci (Wotavová et al., 2004; Janečková et al., 2006).

Vliv hnojení zkoumali i Hejzman et al. (2010) a to u druhů *Dactylorhiza maculata*, *Platanthera bifolia* a *Listera ovata* v dlouhouletém pokusu „Rengen Grassland Experiment“. Zjistili, že záleží na kombinaci použitých hnojiv, Ca a CaN není pro orchideje problematická, na rozdíl od CaN a P. Z dlouhodobého hlediska neměl vliv dusíku na orchideje fatální následky, ale k jejich vitalitě nepřispíval. Nicméně destruktivní vliv měla na orchideje kombinace fosforu a dusíku. Tyto výsledky jsou podporou pro starší květináčové výzkumy. Příkladem je druh *Dactylorhiza fuchsii*, který hnojení dusíkem přežil, ale obzvláště růst kořenů byl redukován (McKendrick, 1996). Orchideje se však reakcí na různá hnojiva liší. Příkladem toho může být druh *Dactylorhiza majalis*, který rostl ze zkoumaných orchidejí nejlépe při vysoké míře fosforu, na rozdíl od druhu *D. praetermissa*, který tímto hnojivem trpěl nejvíce ze zkoumaných druhů (Dijk and Eck, 1995).

2.4.2 Možnosti výzkumu ochrany

Výzkum orchidejí vede k rozšíření vědomostí ohledně složitých životních cyklů a prostředí, které ovlivňuje životaschopnost orchidejí a persistenci v krajině. To co platí pro jeden druh, může být úplně jiné u jiného druhu a tak je třeba často zaměřit výzkum více druhově specificky a zároveň použít více druhů metod (McCormick a Jacquemyn, 2014).

Některé asociace mezi orchidejemi a houbami mohou fungovat pouze v laboratorních podmínkách, či se jedná o symbiotický vztah, který je kompetitivní i za přirozených podmínek. Rasmussen (2002) tedy navrhuje, aby specifická byla zejména zkoumána v přirozeném prostředí „*in situ*“, či za realistických klimatických podmínek v laboratoři „*in vitro*“ (s použitím přírodě blízkého substrátu a nedormantních semen).

Díky metodám „*in situ*“ je možné získat reálný pohled na věc. Studují se biotické a abiotické faktory ovlivňující danou lokalitu, je snaha měřit, analyzovat a pozorovat změny, ke kterým v přirozených populacích dochází. Oproti práci s jinými

druhy rostlin, jsme u orchidejí často limitováni zásahy, které je možné na jednotlivých družích provést z důvodu jejich ohroženosti a vzácnosti. Kvůli tomu je nutné získávat příslušná povolení a zaměřit se na výzkum nedestruktivní.

Výzkum *in vitro* dovoluje zabývat se často problematikou mnohem detailněji a s přesnějším měřením. Biotické a abiotické faktory je možné v laboratoři manipulovat a lépe porozumět tomu, jaký mají význam v přírodě pro rostlinu či mykobionta.

Používání molekulárních technik zcela změnilo možnosti výzkumu. Sekvence a další molekulární techniky umožňují popsat diverzitu, abundance a fylogenetické vztahy nejen samotných orchidejí, ale i jejich mykobiontů.

2.4.3 Dlouhodobé uchovávání semen a mykorhizních hub

Co se týče samotné ochrany, je snaha chránit mizející orchideje i *ex situ*, například uchováváním semen orchidejí v semenných bankách, čímž dochází k prezervaci velkého množství diverzity na malém prostoru. Primárně je tento program zaměřen na země s vysokou diverzitou orchidejí v Asii, Jižní a Střední Americe. Takto uchovaná semena můžou být následně použita na reintrodukcii restaurovaných lokalit i v případě, že by pokles populací *in situ* tyto možnosti nedovoloval (Seaton et al., 2010).

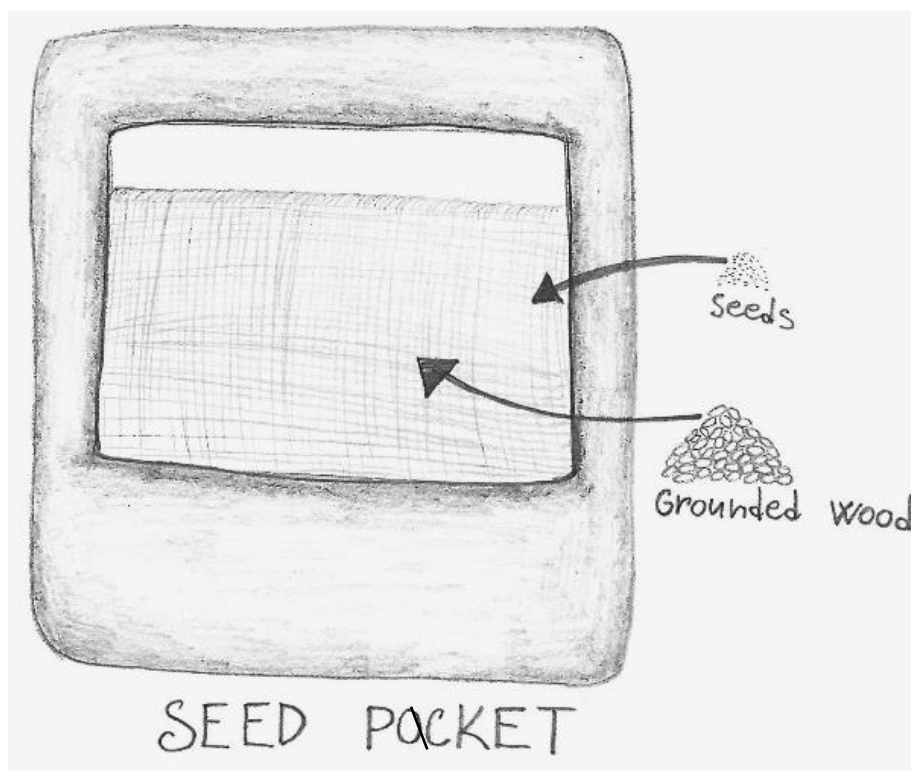
Orchidejová semena se stejně jako semena ostatních skupin liší v nárocích na typ skladování (teplota, vysušení, délka skladování), nicméně nejpoužívanější je skladování zralých semen a jejich následné suché zmrazení na - 20 °C (Seaton a Pritchard, 2003). Spolu se semeny orchidejí je nutné uchovávat i jejich symbiotické houby, což je možné dlouhodobě dělat při teplotě pod nulou v alginátových kapslích (Sommerville et al., 2009). Výzkum v tomto oboru se nicméně stále vyvíjí, nověji je například možnost skladovat orchidejová semena či mykorhizní houby v tekutém dusíku při - 196 °C (Seaton et al., 2010).

2.5 Přehled metod používaných při obnově orchidejových populací

Pro obnovu populací orchidejí v přírodě je nutné získat vhodné mykorhizní houby, jejichž absence či nedostatečná abundance je pravděpodobně nejčastější příčinou neúspěšného vyklíčení rostliny. Saprotrofní druhy hub lze izolovat na živném médiu jak ze semen klíčených v polopřirozených podmínkách v půdě tak z kořenů dospělců. Díky molekulárním metodám je možné izoláty účinně identifikovat a posléze testovat jejich schopnost opravdu podpořit klíčení zkoumaného druhu *in vitro*. Nabízí se pak různé přístupy, jak se pokusit o uchycení rostlin v přírodě. Všechny zmíněné metody rozebírám podrobně níže.

2.5.1 Klíčení semen *in situ*

Jak již bylo zmíněno, semena orchidejí jsou tak malá, že je nazýváme prachová. Z tohoto důvodu je velice těžké, až nemožné hledat semena v půdě ať už pro získávání mykorhizních hub nebo pro sledování jejich klíčivosti v různých podmínkách. Na výsev semen byly použity různé metody (Van der Kinderen, 1995), měkké kapsy vytvořené pomocí zatavení nylonové síťoviny (Batty et al., 2001), či několikakomorové kapsy pro porovnání klíčivosti jednotlivých druhů (Brundrett et al., 2003). Nejpoužívanější je nicméně metoda vynalezena Whighamem a Rasmussenovou (1993), kteří poprvé použili rámečků na diapozitivy, do kterých vložili přeloženou nylonovou síťovinu ve tvaru obdélníku o rozměrech 40 mm x 60 mm (Nutex. číslo 35), nylonová síťovina měla velikost pórů 35 μm . Do takto připravené kapsy byla vložena orchidejová semena, skladována krátkodobě při pokojové teplotě až do doby výsevu (Rasmusen a Whigham, 1998a). Tato metoda se dnes používá po celém světě a to i při výzkumu na epifytických orchidejích (Zi et al., 2014). Hustota síťoviny, je taková, aby hyfy mykorhizní houby byly schopné ji prorůst a dostat se k semenům. Spolu se semeny je možné přidat do rámečků i drcené dřevo, které může pomoci udržovat vlhké mikroklima (D. Whigham – osobní komunikace, McCormick et al., 2012, Obr. 2).



Obr. 2: Schématický obrázek rámečku se síťovinou a semeny s drceným dřevem, které vložíme dovnitř.

Kvůli malé velikosti semen je obtížné jich do rámečku vložit přesné množství. Počet semen se v rámečku obvykle pohybuje mezi 100 – 300 a nejlepším způsobem měření je použití kalibrované odměrky, která snižuje množství variabilitu. Uzavřené rámečky jsou následně vloženy do půdy horizontálně (Rasmussen a Whigham, 1998a) či vertikálně (pro velké množství použití krabičky na diapozitivy (Whigham et al., 2002), do hloubky vhodné na klíčení semen, tj. přibližně pěti centimetrů (Van der Kinderen 1995). Místo lze označit například navázáním rámečků za nylonový vlasec na hřebík, který je možné zpětně nalézt za použití detektoru kovu.

Výhodou této metody je také možnost postupného odběru rámečků na dlouhodobě zkoumaných plochách. Před vyhodnocením je vhodné rámeček jemně očistit a až poté vlhkou síťovinu přiložit na misku s jednoduchým vodním agarem (recept v příloze) (Rasmussen a Whigham, 1993) na kterém se semenáčky přichytí, či přímo na sklíčko. V obou případech je přítomnost klíčících semen a protokormů

vyhodnocena za použití binolupy (Whigham et al., 2002). Nevýhodou je, že rámečky se semeny dokáží odhalit, zda je na daném místě vhodná mykorhizní houba a environmentální podmínky, nicméně není možné tyto faktory oddělit (Nantel a Neumann, 1992). Nevyklíčená semena lze ještě po vykopání analyzovat použitím tetrazoliového testu, pomocí něhož lze zjistit, zda jsou nevyklíčená embrya ještě živá (Rasmussen, 1995).

2.5.2 Izolace mykorhizních hub do kultury

Mykorhizní houby tvořící pelotony je možné vyizolovat na médium z kořenů dospělých jedinců i z protokormů. Saprotrofické houby, typické pro luční zelené orchideje, jsou většinou jednoduše kultivovatelné v porovnání s houbami ektomykorhizními. Snaha o kultivace těchto problematických druhů vedla před dobou molekulární identifikace k velkému množství izolovaných kontaminací (McCormick et al., 2004). Mykorhizní houby lze získat z řezů mykorhizním kořenem a to jejich položením na živné médium nebo z mykorhizních struktur – pelotonů. První přístup je sice mnohem méně pracný, nicméně jen málo úspěšný v získávání mykorhizních hub (Kohout et al., 2013; Zettler et al., 2005), budu se proto dále věnovat pouze izolacím z pelotonů.

K izolaci pelotonů je možné použít kořeny dospělých jedinců, které je snaha odebírat co nejméně destruktivně (Zhu et al., 2008), či celé protokormy vypěstované za tímto účelem *in situ* v rámečcích od diapozitivů. V některých případech je nutné izolovat pelotony z obou stádií, protože dospělý jedinec se může pojit s jiným druhem symbionta než protokormy stejného druhu (Zelmer et al., 1996).

Pro izolaci pelotonů z kořenů je nutné odebrat několik kořenů, protože míru jejich mykorhiznosti lze zjistit jen v laboratoři pod binolupou. Kořeny jsou následně jemně kartáčkem očištěny vodou od hlíny a povrchově sterilizovány (Tab. I). V poslední z kádinek s destilovanou vodou je možné kořeny nechat do doby, než mohou být postupně zpracovány.

Tab. I: Přehled sterilizace mykorhizních tkání (příklady metod)

	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3	Metoda 4
Reference	<u>kořeny</u> Kohout et al., 2013	<u>kořeny</u> Zhu et al., 2008	<u>protokormy</u> Kohout, ústní sdělení <u>kořeny</u> Currah et al., 1987	<u>kořeny a</u> <u>protokormy</u> Zettler a Piskin, 2011
krok 1	5 % NaClO a 1 % NaCl (Savo) (30 s)	5 x sterilní destilovaná voda	1 díl (Savo) : 5 dílů vody protokormů (30s) kořenů (1 min)	Roztok: 5% absolutní ethanol + 5% (5.25% NaOCl; Clorox® bleach) + 90% sterilní destilovaná voda (1 min)
krok 2	2 x destilovaná voda (30 s)	10 ml st. dest. voda + 150 ug/mg streptomycin sulfát + 150 ug/ml potassium Penicillin G (10 min)	2 x sterilní destilovaná voda (30s)	2 x sterilní destilovaná voda
krok 3	sterilní destilovaná voda	sterilní destilovaná voda	sterilní destilovaná voda	

S povrchově sterilizovanými kořeny musí být dále nakládáno jen za použití sterilních nástrojů, či alespoň nástrojů a ploch otřených 70% ethanolem, případně i opálených nad plamenem. Kořen je nutné nakrájet pomocí žiletky na půlcentimetrové úseky (Kohout et al., 2013; Zhu et al., 2008), na kterých je možné určit, zda se jedná o mykorhizní části. Část mykorhizních kusů lze pak použít na izolaci pelotonů a přiléhající části je nutné zamrazit pro případ, že by mykorhizní houby na médiu nevyrostly a bylo by nutné je identifikovat pomocí molekulárních analýz.

Při izolaci hub z pelotonů je možné mykorhizní kusy kořenů ještě ztenčit a to až na 0,5 mm tenké řezy a následně z pletiva pomocí preparační jehly uvolnit pelotony, do kapky zautoklávované destilované vody (Kohout et al., 2013). Jiným způsobem uvolnění pelotonů z kořene je jeho stlačení skalpelem (O'Neill, ústní sdělení; Currah et al., 1987), či roztrhání pomocí jehel (Warcub a Talbot, 1967; Zhu et al., 2008) s případným odstraněním jeho pokožky (Zettler a Piskin, 2011; Zhu et al., 2008).

Po rozvolnění tkáně vzniká vazký roztok pelotonů a škrobu. Proto je při izolaci pelotonů klíčové promytí a následné získání co nejčistější houbové biomasy, vzniklý roztok se promývá cca 4 krát - 6 krát (Rasmussen a Whigham, 1998a) až 7 krát (Kohout et al., 2013).

Další možností separace pelotonů ze starých kořenů je jejich inkubace po dobu 4 – 24 hodin ve 2 ml zkumavkách (v případě delší než 10 hodinové inkubace s přidanými látkami: (100 ug/ml streptomycin sulfátu a 100ug/ml potassium Penicillin G)). Pomocí této metody je možné rozlišit živé pelotony od mrtvých tím, že z živých začnou po nějaké době vyrůstat rozpoznatelné hyfy (Zhu et al., 2008).

Vhodné pelotony je možné vybírat pod binolupou za použití skleněné (O'Neill, ústní sdělení) či automatické pipety (Kohout et al., 2013), pipetou je vazký roztok ředěn v několika kapkách zautoklávované vody (Rasmussen a Whigham, 1998a), či jedenkrát ve větším množství (10 ml) – (Zhu et al., 2008). Postupným promýváním a vybíráním vhodných pelotonů je nakonec dosaženo roztoku s minimálním obsahem škrobových zrn a částí buněčných stěn.

Z roztoku jsou postupně odebírány jednotlivé pelotony v malém objemu vody a vstříkovány na připravené pevné médium (Tab. II) nebo PDA disk (Zhu et al., 2008). Vzdálenost pelotonů na misce by měla být několik centimetrů, aby do sebe kolonie vyrůstající z jednotlivých pelotonů neprorůstaly příliš brzy (Kohout et al., 2013). Vhodné pelotony mohou mít různý tvar u různých druhů, ale vždy pro ně platí, že by měly být spíše mladší, s neohrazenými okraji, ze kterých je patrné, že se jedná o smotek volných hyf. U takto vybraných pelotonů bývá nejlepší úspěšnost při izolaci houbové kultury (Rasmussen a Whigham, 2002; Zhu et al., 2008; Kohout et al., 2013).

Jednotlivé pelotony lze získat i jejich separací na dně Petriho misky a následným přelitím MMN či FIM médiem (Currah et al. 1987) (Tab. II), či přidáním pelotonů do média (Warcub a Talbot, 1967) s jeho následným ztuhnutím (Zettler a Piskin, 2011).

Celý tento proces je nutné udržovat ve sterilním prostředí, aby nedocházelo ke kontaminacím, probíhá v ethanolem očištěném a UV světlem sterilizovaném Flow Boxu. Také misky s médiem použité na izolaci mykorhizních hub musí být nalévány a skladovány ve sterilních podmínkách. Aby nedošlo ke kontaminaci budoucích kultur, je nutné misky po izolaci důkladně uzavřít za použití Parafilmu či potravinové fólie (O'Neill; ústní sdělení). I přes všechna tato opatření se většinou používá při izolaci médium s antibiotikem Novobiocin (Whigham et al., 2002), či streptomycin sulfát a potassium Penicillium (Zhu et al., 2008).

V médiích určených pro izolaci orchideoidních mykorhizních hub je často sníženo množství cukrů (jako sacharóza, sladový extrakt), aby nebyly pomalu rostoucí mykorhizní houby rychle přerůstány kontaminanty (Kohout et al., 2013). Pokud není řečeno jinak, jedná se o média tuhá (s agarem) (Tab. II). Houby se mezi sebou liší v reakci na jednotlivá média, z toho důvodu není možné používat jen jeden druh a je potřeba je testovat.

Izolace pelotonů z protokormu je obdobná té z dospělých rostlin (Whigham et al., 2002). Na rozdíl od ní, však dochází k odběru destruktivnímu, protože mladá rostlina nemá žádné kořeny, které by jí mohly být odebrány se zachováním zbytku. Převážně se však izoluje z protokormů klíčích v orchidejových rámečcích, čímž není volně rostoucí populace nijak ohrožena. Při izolaci z protokormů je vhodné pracovat jen s většími vzorky (cca od 1,5 mm), přičemž mykorhizní část je pouze na jejich bázi (Rasmussen, 1995). Vybrané protokormy jsou buď sterilizované povrchově v ředěném roztoku Sava (např. 1 díl Sava: 5 dílů vody, (Jersáková – osobní komunikace) a následně promyty ve vodě, příp. jsou pouze omyty vodou, což může mít za následek zvýšenou kontaminaci. U malých protokormů není nutné řezat je na tenčí plátky, je možné ihned vydlabávat pelotony a následně je promývat ve zautoklávované vodě. Zbytek metodiky je stejný jako při izolaci pelotonů z kořene.

Tab. II - Přehled nejčastěji používaných živných medií na izolaci saprotrofních mykorhizních hub orchidejí a vzkličování orchidejových semen. Složení médií je uvedeno v Příloze.

Použití	Název média	Reference použití
Izolace hub z pelotonů	modifikované Melin Norkrans (MMN) / (tekuté tuhé, 55°C)	Kohout, ústní sdělení Currah et al., 1987
	E-medium	McCormick et al., 2006
	Fung. Isol. Med. (FIM)	Zettler a Piskin, 2011
	Potato dextrose agar (PDA)	Zhu et al., 2008; Zettler a Piskin, 2011; Zi et al., 2014
Uchovávání houbových kultur	BS médium při 20 °C	O'Neill, ústní sdělení
	modif. Melin Norkrans (MMN) při 20 °C	Whigham et al., 2002
	Potato dextrose agar (PDA) při 4 °C	Whigham et al., 2002
	Oatmeal media (OMA) při 4 °C	Clemets et al., 1985; Jersáková, ústní sdělení
Asymbiotický výsev semen (bez zdroje jednoduchých cukrů)	Oatmeal media (OMA)	Zettler a Hofer, 1997
	Vodní médium (Water agar)	Rasmussen a Whigham, 1998a
Symbiotický výsev semen	Oatmeal media (OMA)	Clemets et al., 1985
	Řídké médium se dřevem	McCormick et al., 2004

Houby vyrůstající z pelotonů však nemusí být pouze mykorhizní houby, protože ty mohou být přerůstány rychle rostoucími endofytickými houbami žijícími v kořeni. Schopnost houby tvořit mykorhizu se zkoumaným druhem orchideje je proto nutné ověřit pomocí symbiotického výsevu, nestačí pouze molekulární identifikace (Prosser, 2013).

2.5.3 Identifikace kultur pomocí molekulárních metod

Při identifikaci izolovaných hub je nutné se spolehnout na molekulární techniky, protože houby v kultuře jen vzácně vytváří spory, jež by umožnily identifikaci a i tak by bylo obtížné určit přesný druh pouze podle morfologie.

DNA je možné extrahovat jak z mykorhizní tkáně, tak i z čisté kultury modifikovanou metodou CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Piercey-Normore a DePriest, 2001), Dneasy Plant Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) (Těšitelová et al., 2012) či metodou extrakce NaOH (Košnar, ústní sdělení). Houbová kultura za účelem k extrakci DNA pochází buď z tuhého (Těšitelová, ústní sdělení), či tekutého média (McCormick et al., 2004). Je vhodné pracovat s přibližně stejně velkými vzorky tkání hub, aby se snížila variabilita koncentrace vyextrahované DNA (Košnar, ústní sdělení).

Vyextrahovanou DNA je následně možné amplifikovat pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na nejčastěji sekvenovaném úseku ITS. Za tímto účelem jsou vybrány vhodné primery a to univerzální, či velmi specifické, podle výběru primerů se následně amplifikuje DNA vzorku. V případě práce s čistými kulturami je dostatečné použití univerzálních primerů. Úspěšnost amplifikace v PCR produkty je možné si ověřit pomocí vizualizace vzorků na gelové elektroforéze.

K rozlišení jednotlivých druhů hub lze použít metodu Polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), která umožňuje štěpit DNA pomocí enzymů v místech s konkrétní sekvencí. Při zobrazení na gelu dovoluje srovnat jednotlivé kultury podle jejich unikátních, druhově specifických vzorů. Protože míra opakování druhů hub mezi izoláty je vysoká, je snížení jejich počtu vhodným řešením,

jak omezit náklady na sekvenaci. Samotná sekvenace je však pro určení identity mykorhizních hub nutná.

Vzhledem k tomu, že většina hub získávaných z orchidejí není zařazena do morfologických druhů, standardně se používají operační taxonomické jednotky (OTU) které jsou analogické k určení do druhů u jiných lépe popsáných organismů. Ty se u Basidiomycet obvykle vylišují na základě 97 % podobnosti v ITS úseku (Hughes, 2009).

2.5.4 Symbiotický a asymbiotický výsev semen *in vitro*

K ověření mykorhizního potenciálu u hub vyizolovaných z kořenů je nutné zjistit, zda podporují klíčení semen (McCormick et al., 2004). Výsev *in vitro* je možné provést dvěma způsoby a to symbioticky a asymbioticky. Symbiotický výsev je metodou pracující se semeny klíčového druhu a zkoumanou (mykorhizní) houbou (Tab. II). Asymbiotický výsev je definován, jako výsev bez izolátu houby (Tab. II). Jedná se o a) kontrolu k výsevu symbiotickému, použité médium je stejné jako pro výsev symbiotický – bez orchideji dostupných cukrů; b) kontrolu efektu životaschopnosti a stratifikace semen (Whigham et al., 2002), použité médium je kompletní – i s cukry (Rasmussen, 1995). Symbiotický výsev má typicky rychlejší a vyšší klíčivost než výsev asymbiotický (Rasmussen et al., 1990a). Izolát zkoumané houby lze považovat za mykorhizní, pokud podpoří semena v růstu do pokročilejšího stádia než na kontrolním asymbiotickém výsevu bez zdrojů orchideji dostupných cukrů.

Pro symbiotické výsevy orchidejí pojičích se se saprotrofními houbami rozkládajícími dřevní hmotu jsou doporučena hodně řídká média s obsahem mletého dřeva či půdy (recept v příloze; Whigham et al., nepublikováno). Některé orchideje dokonce neklíčí v jiných než symbiotických výsevech, příkladem je druh *Liparis lilifolia* (Rasmussen a Whigham, 1998a).

Bylo zjištěno, že semena dokáží reagovat i druhově nespecificky a jejich klíčení mohou spustit i méně vhodné mykobionti a v některých případech dokonce i některé houby či jiné mikroorganismy, které nejsou schopné tvořit orchideoidní mykorhizu.

V případě symbiocy mezi semenáčkou a houbou, která není zcela kompatibilní, dochází k velké míře úhynu semenáčků (Zettler et al., 1999). Na druhou stranu, v podmínkách *in vitro* je známá celá řada úspěšných výsevů, kdy spolu byly klíčeny v přírodě nekompatibilní dvojice orchideje a houby. Mezi jeden z příkladů patří výsev orchideje *Spiranthes sinensis* s houbou *Rhizoctonia solanii* (= *Thanatephorus cucumeris*), ačkoliv jejím běžným symbiontem je *Tulasnella deliquescens* (Masuhara et al., 1993).

2.5.4.1 Sterilizace a výsev semen

Semena je před samotným výsevem nutné sterilizovat a to z důvodu zničení možných původců kontaminace ale i narušení testy, kterou je semeno kryté. V důsledku sterilizace dochází ke změně chemizmu semenného obalu a testa je tak přístupnější pro vodu (Barsberg et al., 2013).

Typické pro sterilizaci jsou roztoky $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a NaOCl doplněné o smáčedlo. Podle Rasmussen (1995) se lepších výsledků dosahuje za použití $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Ačkoliv obě látky jsou oxidačními činidly, NaOCl je silnější než $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Roztok $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ je obecně používán v rozmezí 7,5 – 5% na rozdíl od NaOCl 0,2 – 5%. I když se jednotlivé druhy mezi sebou liší v délce vyžadované sterilizace (J. Ponert, ústní sdělení), největšího vlivu na semena se dosáhne během prvních 15 minut (Barsberg et al., 2013). Nicméně Rasmussen a Whigham (1998a; Van Waes a Debergh, 1986) sterilizují běžně semena i 1 – 8 hodin (použití saturovaného roztoku $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ se smáčedlem). Působením sterilizačních roztoků se zesvětlí barva testy, výsledný odstín je popisovaný jako barva slonovinové kosti (Jersáková, ústní sdělení).

Při symbiotickém výsevu jsou vysévána sterilizovaná semena na tuhé médium (Tab. II) přímo, či na kousek papíru (Zettler a Hofer, 1997). Jednou z možností je výsev pomocí sterilní injekční stříkačky s jehlou (metoda 1 -Tab. III). Orchidejová semena jsou přenesena do stříkačky. Mezi stříkačku a jehlu (1,2 x 40 mm) je vložen malý kousek nylonové síťoviny (velikost ok cca 42 μm) z důvodu udržení semen ve stříkačce a jednodušší manipulaci během sterilizace i výsevu. Ke sterilizaci dochází uvnitř stříkačky a to postupným promýváním jednotlivými roztoky. Posledním krokem je natáhnutí odpovídajícího objemu vody, určeného na výsev semen (Ponert et al., 2011).

Jehla je sejmuta spolu se síťovinou a vyměněna za jehlu větší (1,8 x 40 mm). Při výsevu je část suspenze vstříknuta na připravené médium s následným přidáním houbového izolátu o velikosti cca 4 mm³. Na závěr jsou Petriho misky uzavřeny pomocí Parafilmu. Asymbiotický výsev je proveden stejným způsobem, jen bez přidání houbového symbionta.

Tab. III: Přehled používaných způsobů sterilizace pro výsev orchidejových semen.

postup	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3
Ref.	<u>Sterilizace semen ve stříkačce</u> (Ponert et al., 2011)	<u>Sterilizace semen plodu</u> (Zi et al., 2014) (Rasmussen et al., 1990b)	<u>Sterilizace plodu</u> (Zi et al., 2014)
krok 1	70% ethanol (4 minuty)	5% NaOCl + 0,3 % Tween (x min)	75 % ethanol
krok 2	3 x zautoklávovaná destilovaná voda (15 s)	3 x zautoklávovaná dvakrát destilovaná voda (15 s)	3 x zautoklávovaná dvakrát destilovaná voda (15 s)
krok 3	5 % roztok Ca (OCl) ₂ + 0,3 % Tween (x minut)		
krok 4	3 x zautoklávovaná destilovaná voda (15 s)		

Další možností výsevu semen je jejich sterilizace podle Zi (Zi et al., 2014). Semena jsou uzavřena v omývatelné kapse, která je následně otevřena ve sterilních podmínkách. Semena jsou vsypána do 0,1 % sterilní suspenze agarů a pomocí pipety je odebráno vždy 150 µl agarového roztoku s přibližným množstvím 140 semen. Roztok se semeny je vstříknut na půlkruh nylonové síťoviny o poloměru 6 cm, která je vložena do Petriho misky s OMA médiem (Tab. II) o poloměru 9 cm. Na závěr je výsev doplněn o 5 mm³ houbového inokula (Zi et al., 2014).

Všechny misky jsou následně standardně umístěny do temného termostatu (Hadley, 1982) o teplotě cca 22 °C a udržovány takto po dobu trvání experimentu. Bylo ale zjištěno, že pro zkoumaný druh *Dactylorhiza majalis* je nejvhodnější kombinace světla a tmy během klíčení. Nejlepších hodnot bylo dosaženo při počátečních 14 dnech

světla a následných 35 dnech tmy, ke klíčení však docházelo až během periody tmy (Rasmussen et al., 1990b).

Výsev semen je na konci experimentu vyhodnocen na základě míry vyklíčených semen (Rasmussen et al., 1990b), stádia přeměny v protokorm a změření několika největších jedinců (Těšitelová et al., 2012).

2.5.5 Udržování houbových kultur

Přesazení je prováděno ve sterilních podmínkách Flow Boxu a za použití vysterilizovaných nástrojů. Za tímto účelem je vybrána jen malá část vyrůstající hyfy, aby se snížila pravděpodobnost možné kontaminace, či se jí zbavily právě samotným přesazením. V případě, že už byla mykorhizní kultura zbavena všech kontaminací, je možné vynechat antibiotikum Novobiocin, které může mít negativní vliv i na růst některých mykorhizních hub (O'Neill, ústní sdělení).

Houbové kultury jsou po dosažení určité velikosti (kolonie o průměru cca 4 cm) za ideálních tepelných podmínek (22 °C) přeneseny do lednice o teplotě 6 °C, což má za následek zpomalení růstu a tedy i jejich delší přežití. Tímto způsobem je možné houbové kultury uchovávat i půl roku (Whigham et al., 2002). Po vypršení této doby je vhodná kultura opět přesadit na nové médium, pár dnů ji držet v klimaboxu při teplotě 22 °C a po vzniku malé životaschopné kolonie ji opět dát do lednice. Nicméně je známo i uchovávání kultur mykorhizních hub při pokojové teplotě (Whigham et al., 2002). Například v laboratoři Dennise Whighama se osvědčilo uskladňovat velkou řadu hub ve zkumavkách na šikmém BS médiu (recept v příloze). Tyto kultury jsou při skladování v pokojové teplotě přesazovány po třech měsících (O'Neill, ústní sdělení).

Některé výzkumy nasvědčují tomu, že mykorhizní houby mají vlastní endofytické bakterie, které mají nepřímý pozitivní vliv na orchidej to tím, že přímo působí na mykorhizní houbu (Zhu et al., 2008). Množství bakterií v houbových kulturách *in vitro* bohužel klesá se stářím kultury (McCormick, ústní sdělení).

2.5.6 Výsev semen přímo do půdy

Mnohými studiemi bylo zjištěno, že orchideje jsou často limitovány disperzí svých semen a padají v blízkosti mateřské rostliny (Jacquemyn et al., 2007; Jersáková a Malinová, 2007). Jednou z možných technik obnovy orchidejových populací je rozsévání semen na příhodná stanoviště (De hert et al., 2013; McKendrick et al., 2000), které je vhodné obzvláště pro orchideje tvořící mykorhizu s širokou škálou hub. Ačkoliv pro některé druhy a lokality může být levným a jednoduchým zákrokem (Těšitelová et al., 2012), pro jiné, pojící se se saprotrofními houbami, nemusí být vhodné. Důvodem toho je velký význam abundance mykorhizní houby, který je důležitější než jen samotná její přítomnost (McCormick et al., 2012).

Výskyt vhodného symbionta v půdě je možné testovat pomocí molekulárních technik. Za tímto účelem je používána kvantitativní PCR metoda (qPCR). Vede ke kvantifikaci množství houbové DNA, tedy rozšíření symbionta v půdním prostoru. Další možností je použití metody rámečků se semeny, aplikace této metody naznačí i vhodnost podmínek prostředí pro vyklíčení semen (popsáno v kapitole 2.3.1 klíčení semen *in situ*). Oba způsoby jsou časově i finančně náročné, proto může být jednodušší inokulum vhodné houby do půdy přidat spolu s vysetými semeny.

Samotné přidání houbového inokula lze provést několika způsoby, či jejich vzájemnou kombinací. První je použití houbové kultury rostoucí na tuhém médiu. V tomto případě je vhodné otevřít Petriho misku až při samotném výsevu a tak zaručit, že kultura nebude kontaminována a degradována (Mursidawati, 2004; Jersáková, ústní sdělení). Nejprve se vykope do země díra pomocí lopatky či půdní sondy do hloubky cca deseti až třinácti centimetrů, tedy svrchní část půdy s největším přirozeným výskytem mykorhizních hub (Van der Kinderen, 1995). Vyjmutá půda je následně promísena s tuhým médiem a vložena spolu se semeny zpět do půdy.

Další možností je použití tekutého média (bez agaru) na místo tuhého. V tomto případě je napěstovaná mykorhizní houba v tekutém BS médiu či tekutém E-médiu (McCormick et al., 2012). Kultura je následně zhomogenizována a aplikována pomocí automatické pipety s uříznutou špičkou. I v tomto případě je vhodné dávkovat mykorhizní houbu buď do celého objemu zeminy, či alespoň pod povrch země

(Whigham, ústní sdělení). Množství nutného inokula je třeba standardizovat (Mursidawati, 2004).

Poslední možností vytvoření houbového inokula má více podob, je možné totiž nechat mykorhizní houbu vrůst do drceného dřeva, sena, jahel, či celulózových smotků (Mursidawati, 2004). V tomto případě je nutná delší příprava inokula, protože vrůstání houby do těchto materiálů trvá i několik týdnů (McCormick et al., 2012; osobní pozorování). Vhodný materiál je dobré si vybrat podle druhu mykorhizní houby, například při práci s lesními saprotrofy je vhodné pracovat s drceným dřevem (McCormick et al., 2012) či celulózovými smotky (O'Neill, ústní sdělení). Pro luční druhy je vhodné zkusit seno či jáhly. Podrobnější výzkum na preferenci vhodného materiálu však nebyl proveden. Ve všech případech je ale nutné pracovat ve sterilních podmínkách a materiál musí být předem zvlhčen vodou či tekutým médiem a následně zautoklávován (McCormick et al., 2012). Do sterilního materiálu je později vložena kultura mykorhizní houby ve formě kousků tuhého média prorostlého danou kulturou, či tekutého média obsahující daný druh symbionta. V průběhu růstu je dobré rostoucí inokulum udržovat v termostatu o přibližné teplotě 23°C a případně je i promíchat za použití sterilního nástroje. Takto připravené inokulum je následně mísáno s půdou a vkládáno do vykopané díry spolu se semeny (McCormick et al., 2012).

Typy výsevů je možné mezi sebou kombinovat, například použitím inokula vrostlého do přírodního materiálu doplněného o aplikaci samotného inokulovaného tekutého či tuhého média. Tím je možné se vyhnout případným nepříjemnostem a nevýhodám, které jednotlivé techniky mají. Nevýhodou aplikace tuhého média je, že houba v médiu často neroste symetricky a její koncentrace v částech misky i mezi izoláty se může značně lišit (osobní pozorování). Z tohoto důvodu není možné ovlivnit, kolik houbového inokula je nakonec do půdy přidáno. Naopak výhodou je snadná manipulace a jednoduché rozeznání rostoucí kolonie v médiu.

Houba rostoucí v tekutém médiu v porovnání s tuhým médiem není tak jednoduše detekovatelná a při použití je nutné počítat s nutností manipulace s jednou kulturou během krátkého času, což je možné vyřešit přípravou více sterilních nádob. Výhodou tekutého média je jeho poměrně přesné dávkování a po homogenizaci média

s kulturou houby je možné očekávat, že i koncentrace houby v jednotlivých dávkách bude přibližně stejná (Whigham, ústní sdělení).

Použití inokulačních materiálů jako je drcené dřevo, seno, jáhly, či celulózové smotky se zdá být nejvíce přirozené (Rasmussen et al., 1998a), nicméně manipulace s těmito kulturami vrostlými do přírodního materiálu je výrazně náročnější, jak časově, tak i prostorově. Takto připravená inokula je třeba také před samotnou aplikací ještě jednou zkontrolovat, zda se houbě podařilo prorůst daný materiál a zda se nejedná o nežádoucí kontaminaci (O'Neill, ústní sdělení). Provedení takového testu je třeba naplánovat krátce před použitím (či opakovaně během této doby). Na tuhé médium je položen ve sterilních podmínkách malý vzorek přírodního materiálu a během tří dnů je pozorován případný růst hyf, začínajících se šířit do podkladového tuhého média. To je známka úspěšné kolonizace cílového materiálu (McCormick et al., 2012). Aby byla vyloučena možná kontaminace, je nutné vyrůstající hyfy identifikovat pomocí molekulárních metod. Jedině tak je možné si ověřit, že zamýšlená kultura mykorhizní houby je čistá. Tento úkon není třeba při použití tekutého a tuhého média provádět, protože kontaminace je zde často rozpoznatelná a je mnohem jednodušší se jí vyhnout. Další nevýhodou použití kolonizovaných přírodních materiálů jako nosiče houbového inokula je jejich velmi obtížná homogenizace (obzvláště při použití sena). O to složitější je tento proces, pokud je použita k inokulaci materiálu kultura houby rostoucí na tuhém médiu. Výhodou této kultury je její přirozenost a dodání potencionálně prospívajícího substrátu při vývoji mykorhizní houby v půdě.

Jednou ze studií úspěšně používající inokulum mykorhizní houby k podpoře klíčení semen je například práce Hollick (2004), která detekovala rozrůstající mykorhizní houby i po třech letech od založení pokusu. Kontrola byla provedena jak za pomoci molekulárních metod, tak i rámečků se semeny, které úspěšně klíčily v těsné blízkosti inokula (5 – 10 cm). Zalévání jedenkrát týdně mělo pozitivní efekt na klíčení semen. Mursidawati (2004) testovala použití inokula v podobě vhodné mykorhizní houby na květináčovém sterilním pokusu. V tomto pokusu bylo vyzkoušeno inokulum z tekutého média, tuhého média a jahel. Častým problémem byla špatná sterilita, pomalý růst mykorhizní houby a nedostatečné množství přidaného inokula.

Ačkoliv tento typ výsevu je běžné provádět za účelem výzkumu a tedy i s rámečky na orchidejová semena, domnívám se, že by neměl být problém stejného postupu použit i při samotné obnově.

Kromě nosiče mykorhizní houby je možné manipulovat i se obsahem výplně, tedy vyplnit vzniklou díru jiným vybraným substrátem. Dodání organického materiálu má pozitivní vliv na klíčení semen, tím že pozitivně ovlivňuje růst mykorhizní houby (Rasmussen 1998a; McCormick et al., 2012). Zároveň dochází i ke změně lokální podmínky pro růst vysazené houby či semen. Bylo například zjištěno, že díry o výměře 25 centimetrů v průměru a hloubce 13 centimetrů se liší ve své schopnosti zadržování vlhkosti v závislosti na výplni. Tento vztah byl zkoumán v USA v raně sukcesním stádiu lesa (původně kukuřičná pole 4 roky osázené semenáčky domácích dřevin). Jako výplň zde byla použita hlína z místa výzkumu, dále pak hlína pocházející z dospělého lesa z blízkosti výskytu orchidejí *Goodyera pubescens* nebo *Liparis lilifolia* a zautoklávované dřevěné štěpky (Whigham et al., 2002). Po jednom roce byla v těchto dírách v průběhu sezóny měřena vlhkost půdy. Ukázalo se, že nejlépe vlhkost zadržují díry s výplní z dospělého lesa, následovaly díry naplněné dřevěnými štěpkami a jako nejméně úspěšný byl vyhodnocen substrát v podobě hlíny pocházející z místa výzkumu (Klimešová, McCormick a Whigham 2016 nepublikováno). Výplň organickým materiálem však může být prospěšná i pro saprotrofní mykorhizní houby (Rasmussen a Whigham, 1998a).

2.5.7 Transplantace orchidejových semenáčků

Mnoho druhů orchidejí, které jsou ohrožené, pravděpodobně setrvává v populacích, které jsou již letité a schopnost vysemenění či růst semenáčků se u nich vytrácí. Toto platí obzvláště pro lokality, které byly degradovány či redukovány (Rasmussen et al., 2015). Neschopnost orchidejové populace tvořit semena je jednoduše rozpoznatelná případně i řešitelná například ručním opylením (Newman et al., 2007).

Problém však může nastat v rozpoznání nových semenáčků, pokud víceletí dospělci setrvávají v populaci a liší se navzájem ve velikosti (Whigham, 1990;

Rasmussen et al., 2015). Příkladem nesnadného rozpoznání stáří rostlin mohou být dvě populace orchideje *Cypripedium calceolus* ze studie Pedesona et al. (2012), jedna senilní a upadající, ve které zbývající rostliny byly nejméně 72 let staré, a druhá juvenilní a expandující.

Limitace semeny i semenáčky je jedním z důvodů obnovy pomocí výsadby napěstovaných rostlinek, takzvané „asistované migrace“ (Swarts a Dixon, 2009). Jde o snahu, vyhnout se velké úmrtnosti během klíčení ještě před stádiem stabilnějšího protokormu (Batty et al., 2001a). Pro úspěšnou výsadbu je však nutné semenáčky orchidejí vysadit na příhodné místo s potencionální mykorhizní houbou (pokud není vysazena spolu s rostlinou) a vhodnými opylovači (Swarts a Dixon, 2009). Hlavním problémem transplantace orchidejí je změna prostředí zejména pro mykorhizní houbu (McCormick a Whigham, 2012). Je třeba dbát i na splnění abiotických nároků, kladených orchidejí na stanoviště. Těmi jsou především vegetační charakteristiky, složení substrátu, geologie a hydrologie (Swarts a Dixon, 2009), hrozí totiž vytvoření umělého a neudržitelného systému (Hobbs, 2007). Problematická je velká různorodost prostředí tzv. mikrostanoviště (Phillips et al, 2011) a jejich proměnlivost v čase (Rasmussen et al., 2015). Monitoring orchideoidní mykorhizy, opylovačů i stavu orchidejí je na obnovené lokalitě žádoucí, jedině tak je možné dosáhnout stabilních populací (Hobbs, 2007).

Semenáčky je možné transplantovat z *in vitro* podoby buď asymbiotické (vyrostlé na kompletním symbiotickém médiu, jako je například médium MS 1/4-2 (recept v příloze)), či symbiotické. Symbiotické semenáčky je vhodné před vysazením do přírody nejprve nasadit do květináčů, aby se snížil stres samotného zásahu.

Nejběžnější je používaná výsadba symbiotických semenáčků, které jsou vypěstovány technikou symbiotických výsevů. Když se začnou objevovat listy, je nutné semenáčkům poskytnout světlo. Scade et al. (2006) píše ve své práci, že semenáčky s listem větším než 5 mm byly přesazeny do částečně písečné kultury (Batty et al., 2006). Tyto semenáčky byly po třech týdnech dány do skleníku na aklimatizaci a jejich nádoby byly otevřeny týden před výsevem, v době výsevu byly rostliny 5 měsíců staré. Obdobný proces aklimatizace popisuje i McKendrick (1994), která zkoumala přežití

orchideje *Dactylorhiza praetermissa* a vlivu vegetace a herbivorie v průběhu tří let od vysazení.

Ve své práci McKendrick (1994) uvádí, že rostliny trpěly okusem malých hlodavců i plžů a to především během prvního roku od vysazení, také úmrtnost orchidejí byla zaznamenána největší během první sezóny. Ve třetím roce 47 % přeživší populace kvetlo, vytvořilo novou růžici listů, či obojí. Tyto výsledky jsou kompatibilní s těmi v práci Scade et al. (2006), kde se projevila velká míra herbivorie hmyzem, která nebyla nijak ovlivněna ochranou rostlin. Pomocí techniky výsevu semen v rámečcích (Rasmussen a Whigham, 1993), byla schopnost semenáčků přežít porovnávána i s výskytem vhodné mykorhizní houby, nicméně rozdíl mezi nimi nebyl a celkové procento přeživších se pohybovalo od 21 % (*Caladenia arenicola*) do 49 % u *Microtis media*, orchideje rostoucí na narušovaných stanovištích.

Kromě jednotlivých rostlin, je možné transplantovat i celé půdní bloky (Mudrák et al., 2016), které jsou stabilnější a méně trpí samotným aktem přesazení. Transplantace bloků půdy je finančně náročná a v případě orchidejí se používá jen v případě zániku původní populace (např. konstrukce atd.).

Úspěch obnovy orchidejových populací je často v jednotlivých studiích opomenutý, nebo se vyskytuje jen v těžko dostupné literatuře, která není v internetových databázích a psána v angličtině. Se vzrůstajícím se množstvím translokací však roste význam dokumentace i neúspěšných pokusů. Například v práci zabývající se obecně translokací rostlin Liu et al. (2015), bylo zjištěno, že jen pro méně než 50 % čínských translokací existují záznamy o přežití.

3. Materiál a metody

V rámci vlastní bakalářské práce jsem se snažila získat základní dovednosti v oblasti izolace, kultivace a identifikace mykorhizních hub a následných symbiotických výsevů semen *in vitro* na lehce kultivovatelném druhu luční orchideje *D. majalis*.

3.1 Popis druhu *Dactylorhiza majalis*

Druh *D. majalis* (Příloha, Obr. p1) patří mezi druhy s širší ekologickou amplitudou. Můžeme ho nalézt od nížin až po hory s těžištěm výskytu na vlhkých loukách. Ačkoliv v minulosti bývala poměrně častým druhem, v dnešní době je i přes svou vyšší toleranci k zvýšenému množství živin v půdě (Jatiová a Šmiták, 1996) na ústupu. I přes velké množství populací dochází ke snižování počtu jedinců na jednotlivých lokalitách (Wotavová et al., 2004).

Její poměrně dlouhá rezistence na stanovištích se zvýšenou mírou živin (v porovnání s ostatními terestrickými orchidejemi) (Procházka, 1980) z ní dělá vhodného bioindikátora zlepšujících, či zhoršujících se podmínek prostředí (Wotavová et al., 2004). Snižování počtu a vymírání této orchideje je způsobeno především absencí kosení, intenzivní fertilizací a splavováním živin z živinami obohacovaných polí (Wotavová et al., 2004). Tyto důvody měly za následek její zařazení do kategorie celostátních ohrožených druhů, v Červeném seznamu ČR (Grulich, 2012) jí byla přiřazena kategorie C3 a stejně tak i v Komentovaném Červeném seznamu květeny jižní části Čech (Chán, 1999). Tento druh orchideje byl vybrán díky svému relativně hojnému výskytu v některých oblastech a rychlé klíčivosti semen (Rasmussen et al., 1990b).

3.1.1 Odběr materiálu

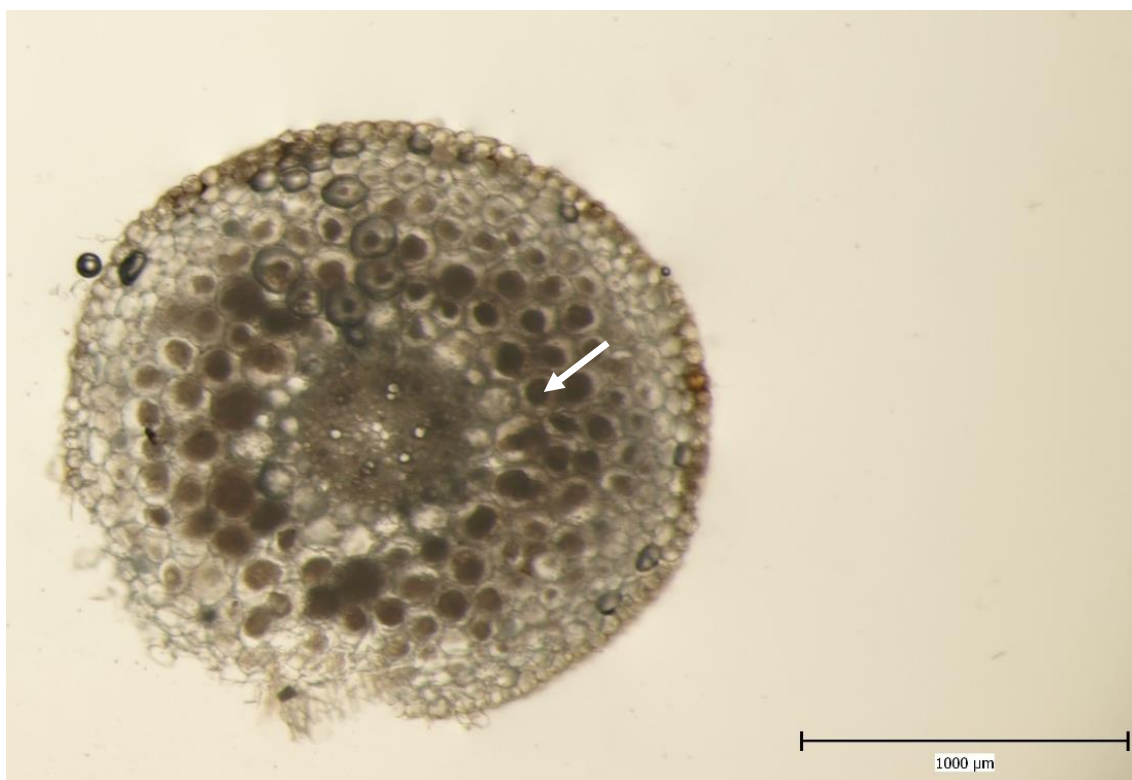
Místem odběru byla louka pod kopcem Klet', Vyhlídka u obce Krasetín (48.8787858N, 14.3013350E), nedaleko Českých Budějovic, z důvodu příhodné vzdálenosti a dostatečně velké orchidejové populace.

Vzorky jsem odebírala 3. 5. 2014 v době květu, což je považováno za vhodný čas kvůli životaschopnosti mykorhizních hub (Kohout et al., 2013). Snažila jsem se při odběru kořenů, rostliny i okolní rhizosféru co nejméně porušit, proto jsem odebrala jen tři kořeny na orchidej. Rostliny jsem vybrala náhodně s minimální vzdáleností 5 metrů od sebe, jak kvetoucí, tak i nekvetoucí jedince v celkovém počtu čtyř kusů. Odebrané

kořeny jsem dovezla do laboratoře, uchovávala v lednici a zpracovala během následujících dvou dnů, aby nedošlo k degradaci materiálu.

3.1.2 Sterilizace kořenů a izolace pelotonů

Kořeny jsem očistila od hlíny a podrobila povrchové sterilizaci popsané v kapitole „2.5.2 Izolace mykorhizních hub do kultury a ověření mykorhizního potenciálu“ (Tab. I). Takto očištěné kořeny jsem následně nařezala pod binolupou a vyhledala úseky s mykorhizní kolonizací, ze kterých byla část použita na izolaci hub z pelotonů a další část zamražena pro případnou identifikaci molekulárními technikami, zbylé úseky byly uschovány za účelem foto-dokumentace (Obr. 3).



Obr. 3: Řez kořenem *Dactylorhiza majalis* s viditelnými smotky hyf tzv. pelotony (označeno bílou šipkou).

Po celý proces izolace bylo třeba pracovat se sterilními nástroji, sterilizovala jsem roztokem ethanolu a následným opálením nad plamenem. Samotnou izolaci jsem prováděla na řezech o tloušťce 0,5 mm, ze kterých bylo možné vydlabat jednotlivé

pelotony. Pelotony jsem promývala 3 krát až 7 krát a následně vložila vždy 15 pelotonů po obvodu Petriho misky o průměru 10 cm na tuhé Melin-Norkrans médium s polovičním obsahem cukru (MMN; složení viz příloha).

Z každého kořene jsem vyizolovala cca 30 pelotonů. Celkem jsem vysela 295 pelotonů (z rostliny číslo 3 bylo vyizolováno jen 55 pelotonů z důvodu jejich malého množství v kořenech, u rostliny číslo 4 byly nalezeny jen dva kořeny). Izolace velkého množství izolátů je nutná z důvodu malé úspěšnosti růstu a snahy vyizolovat všechny vyskytující se druhy hub. Petriho misky utěsněné Parafilmem jsem umístila do temného klimaboxu o teplotě 22 °C. Kontroly jsem prováděla cca po třech dnech. Houby začaly vyrůstat z pelotonů již po dvou až třech dnech, během prvních pěti dnů bylo nutné přesadit hyfy vyrůstající z pelotonů z důvodu možného prorůstání s hyfami z jiných pelotonů či kontaminací. Postupně začínaly růst i zbylé životaschopné pelotony, proto jsem misky schovávala až do doby překrytí porostem rychleji rostoucích hub (cca okolo tří týdnů). Čisté kultury byly udržovány na miskách o průměru 6 cm. Každá jednotlivá kultura byla nasazena do vlastní popsané misky.

3.1.3 Udržování a čištění houbových kultur

Přesazení jsem prováděla ve sterilních podmínkách Flow Boxu a za použití vysterylizovaných nástrojů v 70 % roztoku ethanolu a opálením nad kahanem (opakovaně po každém použití nástroje). Přenesla jsem jen malou část média s hyfou (cca 3 mm²) a tím se zbavila případných kontaminací. Houbové kultury jsem zpočátku držela v ideálních tepelných podmínkách (22 °C) a po dosažení velikosti kolonie cca 4 cm v průměru (Obr. 4) přenesla do lednice o teplotě 6 °C, což způsobilo zpomalení růstu a tedy i delší přežití jednotlivých vzorků. Tímto způsobem jsem uchovávala houbové kultury půl roku. Po vypršení této doby jsem postup opět opakovala a houby přesadila na nové médium.

3.1.4 Identifikace houbových kultur za použití molekulárních metod

Kultury hub jsem se pokusila rozřadit pomocí morfologických charakteristik, (tj. rozřadit je do tzv. morfotypů). Tento způsob u hub vyizolovaných z orchideje *D. majalis* bylo možné použít jen na odstranění kontaminací, protože zbylé izoláty vypadaly stejně. Z tohoto důvodu bylo nutné se zcela spolehnout na identifikaci pomocí molekulárních technik.

Z čistých kultur jsem vyřízla malou část mycelia prorůstající médium a uskladnila ji v mrazícím boxu na pozdější extrakci DNA. Zmrzlé vzorky jsem rozmačkala sterilním drátkem a pomocí metody extrakce NaOH z něj vyextrahovala DNA. Pro každý vzorek jsem připravila 15 μ l roztoku NaOH (0,5M) a v něm rozdrtila a zhomogenizovala zmrzlé médium. Následně jsem přidala dalších 20 μ l stejného roztoku a stočila jej po dobu 2 minut na 13 800 ppm. Z každého vzorku jsem nakonec odebrala 2 μ l supernatantu a doplnila o 20 μ l 100mM Tris-HCl o hodnotě pH: 8,3. Při teplotě -20 °C jsem uchovala vzorky k dalšímu použití.



Obr. 4: Na tuhém médiu je šest izolátů hub z kořene *Dactylorhiza majalis*. Kultury jsou čisté, není viditelná žádná kontaminace a velikost jednotlivých kultur by už byla vhodná pro udržování v chladu.

Následně jsem amplifikovala DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a to na úseku 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 a na části úseku 28S rDNA. Na přípravu PCR směsi jsem použila Plain PP Master Mix (TopBio) se složením reakce: 5 µl 2xPP Master Mixu, 0,6 µl 5' primeru (5 pmol), 0,6 µl 3' primeru (5 pmol), 1, 5 µl DNA a 2,3 µl destilované H₂O. Použila jsem následující primery: ITS-1 a ITS-4 (univerzální primery pro eukaryota).

Program PCR reakce:

95°C (počáteční denaturace)	4 min	
95°C (cyklová denaturace)	30sec	} 45 cyklů
Ta 55°C (nasedání primeru)	30sec	
72°C (cyklová elongace)	1min	
72°C (závěrečná elongace)	10min	
15°C (chlazení směsi po proběhnuté PCR)		

Úspěšnost PCR jsem si ověřila vizualizací vzorků pomocí gelové elektroforézy. Smíchala jsem na kousku Parafilmu: směs barvy Loading die a GelRed (Biotium) (1,5 µl) s jednotlivými PCR produkty (1,5 µl) a nanasla na 1,5% agarózový gel v TBE pufru. Standardně jsem použila 100 bp DNA ladder (NEB) (6 µl) a pokračovala dál s jednotlivými vzorky tak, že po vstříknutí každého vzorku do jamky gelu jsem špičku promyla v okolním pufru. Po zapojení jsem nechala gel při napětí 120 V po dobu 30 minut. Poté jsem gel vyfotila pod UV světlem. Výsledné vzory na gelu nám zobrazí, zda se ve vzorku namnožily cílové úseky DNA, dále je možné z výraznosti jednotlivých vzorků odhadnout kolik cílové DNA jednotlivé vzorky obsahují.

Samotnou metodou PCR však nejsme schopni rozlišit jednotlivé druhy hub vyskytující se v našich vzorcích. Protože byly kultury velmi podobné a bylo jich velké množství, použila jsem metodu polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP). Objem RFLP reakce byl 5 µl, s 2 µl PCR produktu a 3 µl mixu: složeného z 0,5 µl obou enzymů Hinf I a Hae III (New England BioLabs), 0,5 µl pufru BSA a 1,5 µl vody.

Program RFLP reakce:

37°C (inkubace) 8 hodin

80°C 20 minut

Po dokončení cyklu jsem vizualizovala RFLP produkty na speciálním 3% agarózovém gelu složeného z agarózy NuSieve 3:1 s agarem v TAE pufru. Gel s nanesenými vzorky jsem zapojila na napětí 150 V po dobu asi půl hodiny. Konečným výsledkem byla fotografie RFLP gelu pod UV světlem.

Vybrala jsem 17 vzorků, jejichž vzory na RFLP gelu se mi zdály nejruznější a jejich PCR produkty jsem enzymaticky přečistila pomocí Exo-Sap (USB Corporation), který produkt přečistí od krátkých fragmentů vzniklých při PCR.

Přečištěné produkty byly smíchány s primerem ITS 1 (o koncentraci 25 pmol). Takto připravené vzorky byly poslány do firmy GATC, kde poskytují jejich sekvenaci. Firmou GATC mi byly zaslány sekvence nukleových bází, které jsem následně upravila v programu Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc.) a Bioedit (Hall, 1999) a na základě 97% podobnosti v ITS úseku (Hughes et al., 2009) s databází GenBank u NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) pomocí metody BLAST (Altschul et al., 1997) jsem rozřadila izoláty do jednotlivých OTU.

3.1.5 Symbiotický a asymbiotický výsev

Vyizolované kultury hub jsem použila na zpětnou kontrolu, tedy zda dokáží vytvořit orchideoidní mykorhizu a tím spustit klíčení semen a jejich následný vývoj do stádia protokormu. Abych získala větší diverzitu houbových druhů, Jana Jersáková a Jan Ponert mi zapůjčili další dvě kultury mykorhizních symbionů izolovaných z *D. majalis*. Celkem bylo použito na výsev 5 kultur:

1. LK1-1B-76 (OTU-1) (izolováno 3. 5. 2014, Klet') – Klimešová, Těšitelová
2. LK4-2B-13 (OTU-1) (izolováno 3. 5. 2014, Klet') – Klimešová, Těšitelová
3. LK1-2A-19 (OTU-2) (izolováno 3. 5. 2014, Klet') – Klimešová, Těšitelová
4. 2-2A-3 (izolováno 1. 6. 2015, Lhenice) - Jersáková

5. OMA3-A36 (izolováno 6. 2. 2015) - Ponert

Izoláty 1 a 2 náležely ke stejnému OTU, ale byly získány z různých rostlin. Ostatní izoláty patřily k různým OTU. Všechny používané kultury hub byly z čeledi Tulasnellaceae.

Na výsev jsem si vysterilizovala Flow Box, zautoklávovala potřebné nástroje a vodu. Na symbiotický výsev bylo použito Oatmeal médium (recept v příloze) (Clemets et al., 1985) a asymbiotické médium MS 1/4-2 (recept v příloze) pro zjištění klíčivosti a životaschopnosti semen, které nám dodal Jan Ponert.

Na sterilizaci a výsev jsem zvolila metodu výsevu injekčními stříkačkami (Tab. III; „2.3.2 Symbiotický a asymbiotický výsev semen *in vitro*“). Předem jsem si připravila 5% roztok chlornanu vápenatého smícháním 50g Ca (OCl)₂ (PENTA s.r.o.) se 100 ml destilované vody, který jsem nechala rozpustit po dobu 15 až 20 minut a poté přefiltrovala pomocí filtračního papíru. A smíchala se smáčedlem Tween 80 (Lach-Ner s.r.o.). Proces sterilizace byl stejný jako v práci (Ponert et al., 2011). Použila jsem nylonovou síťovinu o hustotě 42 μm (Uhelon, Silk and Progress Ltd., Brněnec, Česká republika).

Semena jsem sterilizovala ve dvou injekčních stříkačkách po dobu 4 („A“) nebo 5 („B“) minut působením hašeného vápna. Rozhodla jsem se pro sterilizaci po dobu dvou různých časů, protože u semen se liší účinnost narušení testy (a tím vyvolané klíčení) a chtěla jsem mít jistotu, že délka sterilizace je alespoň pro jednu ze skupin dostatečná. Při výsevu semen jsem dosahovala značně variabilního počtu od pouhých 29 semen až po několik set.

Pro každou kombinaci izolátu a doby sterilizace jsem připravila tři opakování, celkem 31 misek (z důvodu čtyř opakování u asymbiotického výsevu s dobou sterilizace 4 minut). Všechny misky byly následně umístěny do temného termostatu o teplotě cca 22 °C a udržovány takto po dobu dvou měsíců, po kterých jsem pokus vyhodnotila (Obr. 5). Po prvním měsíci od výsevu jsem výsevy kontrolovala, ale až po dvou měsících došlo na finální vyhodnocení (Příloha, Obr. p2; Obr. p3).

3.1.6 Vyhodnocení výsevu

Petriho misky bylo možné otevřít přímo v nesterilním prostředí laboratoře, protože pokus byl tímto vyhodnocením ukončen. Stanovila jsme si kategorie, podle kterých jsem následně vyhodnotila svůj pokus za použití binolupy. Vždy jsem počítala množství jedinců v kategoriích ze 100 náhodně vybraných jedinců na misku:

1. Embryo neklíčí (může být i mírně nabobtnalé, ale stále neprůhledné)
2. Embryo je nabobtnalé a průhledné, nebo vyhřezlé z testy, nebo má dokonce rhizoidy. Mykorhizní kolonizace ještě nemusí být přítomna.
3. Embryo změnilo tvar z kulovitěho na oválný či dokonce na hruškovitý a je mykorhizní



Ob. 5: Symbiotický výsev, na kterém je vidět, že semena dosahují různých velikostí. V některých případech embryo nejsou nabobtnalá či je testa prázdná. Některá embryo začínají tvořit rhizoidy a mění se v protokormy.

Dále byla z každé misky vyjmuta tři největší embrya a vyfocena s doplněním měřítka za účelem následného změření na počítači v programu ImageJ (Bioinformatics, 2009), (Obr. 6).



Obr. 6: Ukázka tří největších semenáčků z jedné Petriho misky. Jedná se o protokormy (kategorie 3), protože embryo je velké, tvar se změnil na hruškovitý a je vidět i růstový vrchol (označen bílou šipkou).

3.1.7 Statistická analýza dat

Statistická analýza dat byla provedena v programu R v.3.2.1 (R Core Team 2016). Zkoumala jsem vliv izolátu a délky sterilizace na podíl vyklíčených semen a na velikost největších semenáčků. Data byla testována na normalitu. Vyhodnocení jsem provedla dvoucestnou analýzou variance. Rozdíly mezi jednotlivými izoláty byly následně vyhodnoceny post-hoc testem (Tukey Honest Significant Differences method).

Podíl vyklíčených semen jsem analyzovala ve dvou variantách. V první variantě jako podíl kategorií 2 a 3 ku celkovému počtu pozorovaných semen a v druhém případě jako podíl samotné kategorie 3 (opět ku celkovému počtu pozorovaných semen). Velikost největších semenáčků představuje průměr tří největších pozorovaných semenáčků.

4. Výsledky

U všech čtyř rostlin odebraných z přírody, u kterých jsem analyzovala 12 vzorků kořenů, jsem potvrdila mykorhizní kolonizaci. Izolovala jsem 295 pelotonů, ze kterých jsem nakonec získala 81 rostoucích kultur (27,5 %) z 10 kořenů (Tab. V). V některých případech došlo ke kontaminaci (rostlina číslo 1 a kořen 2; rostlina 4 a kořen 2). Z obou těchto kontaminovaných kultur vyrostlo po jednom pelotonu, ani jeden se však nepovedlo vyčistit od kontaminace a tak byly vyřazeny.

Houbovou DNA se mi podařilo amplifikovat ze všech získaných izolátů pomocí univerzálních primerů ITS1 a ITS4. Použitím RFLP metody a sekvenace jsem zjistila, že se jedná pouze o dvě OTU z čeledi Tulasnellaceae (Tab. V).

Tab. V: Přehled izolovaných kultur, jejich přiřazení k rostlině, kořeni, počet izolátů a určená operační taxonomická jednotka (OTU).

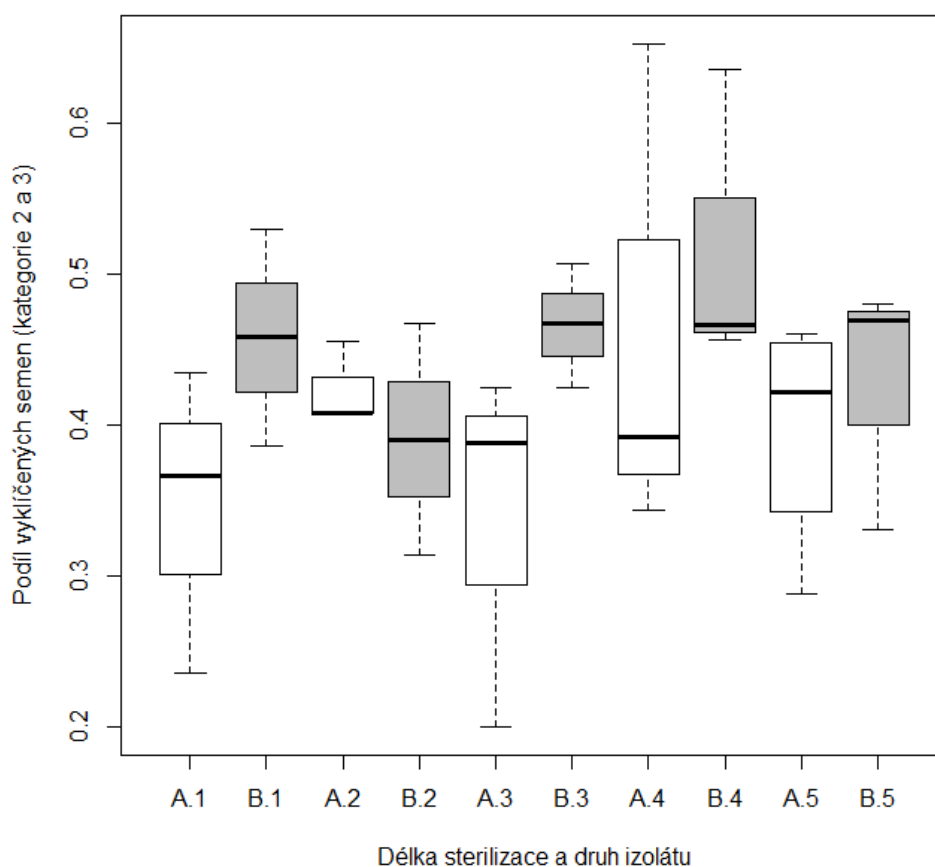
Rostlina	Kořen	Počet izolátů	Určení OTU
1	1	6	1
	2	7	2
	3	8	2
2	1	5	1
	3	8	1
3	1	9	1
	2	3	1
	3	5	1
4	1	15	1
	2	14	1

Při kontrole klíčení po prvním měsíci jsem pozorovala protokormy (kategorie 3) u všech typů izolátu i různé délky sterilizace (až na vyřazený výsev s izolátem "OMA3-A36"). Semenáčky z asymbiotických výsevů se zdály být výrazně méně vyvinuté oproti

výsevům symbiotickým. Z dat získaných při výsevu jsem vyřadila misky s izolátem: “OMA3-A36 “ kvůli celkové kontaminaci bakteriemi, které značně inhibovaly růst semen. Ostatní výsevy kontaminovány nebyly.

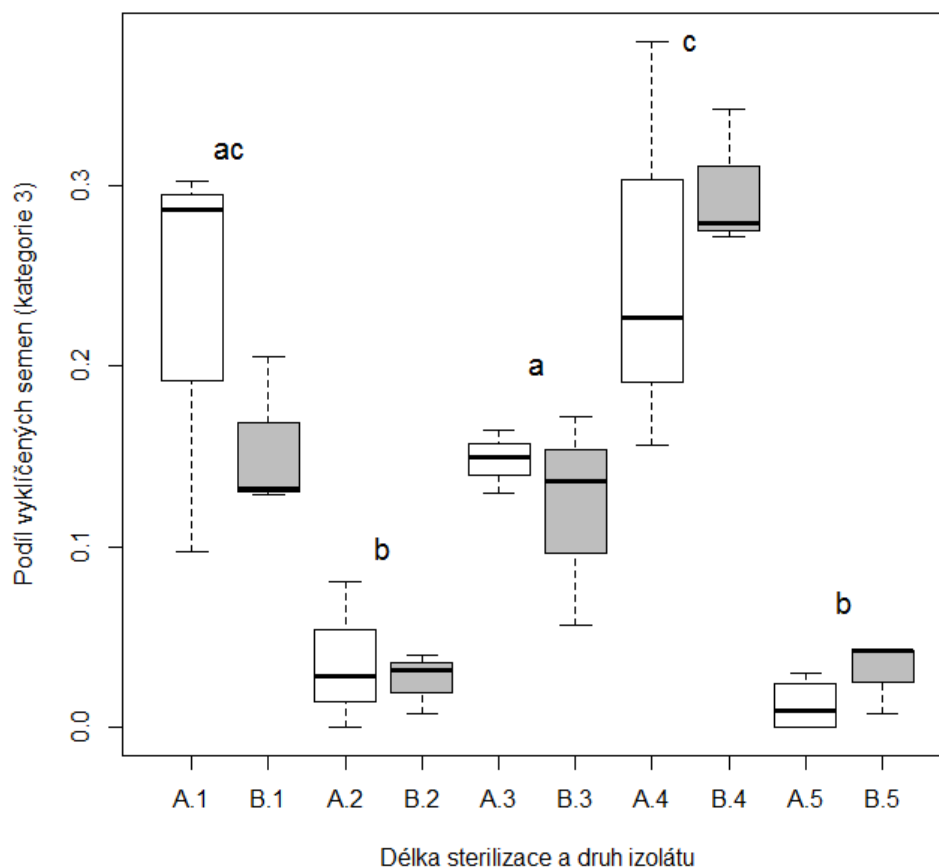
U symbiotických výsevů klíčilo 44 % ze všech vyhodnocených semen (kategorie 2 a 3) v porovnání s asymbiotickým s 42 %. Rozdíl výsevu je však patrný na procentuální hodnotě semenáčků dorostlých do stádia protokormu (kategorie 3). Symbiotický výsev měl 15 % úspěšnost a asymbiotický méně než 3%.

Na podíl vyklíčených semen v kategorii 2 a 3 neměl vliv ani druh izolátu ani délka sterilizace (Obr. 7; Tab. IV).



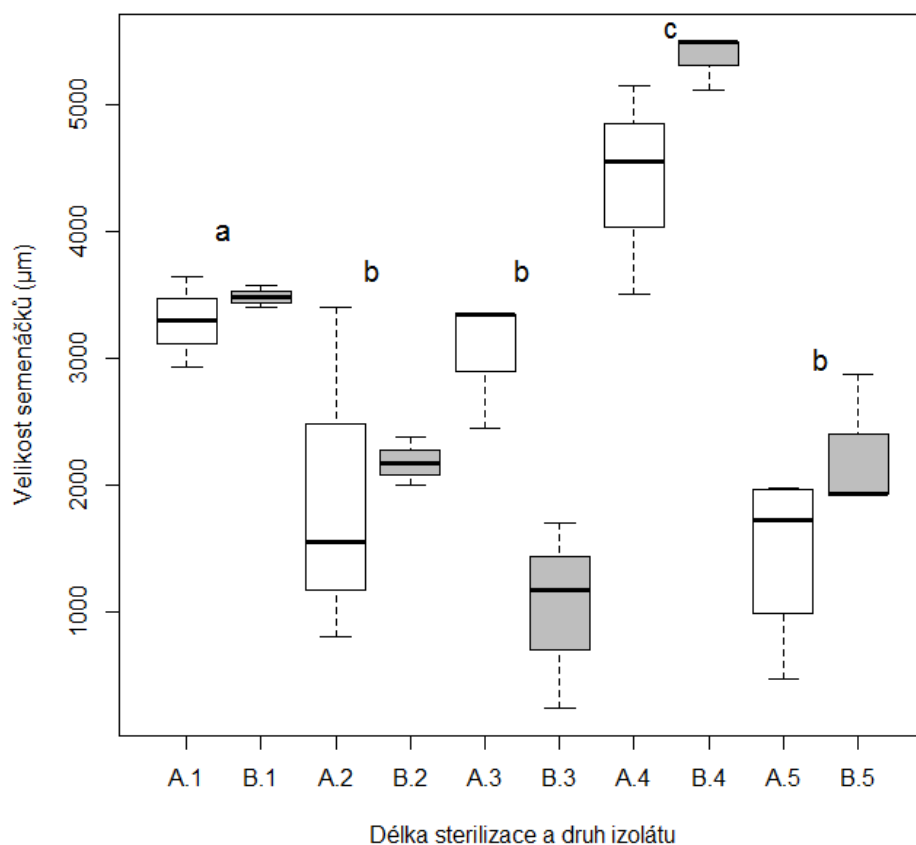
Obr. 7: Efekt délky sterilizace a druhu izolátu na podílu vyklíčených semen kategorie 2 a 3; Písmena A a B označují délku sterilizace vápnem (A - 4 minuty, B - 5 minut) a čísla označují jednotlivé izoláty (1. LK1-1B-76 - OTU1, 2. LK4-2B-13 - OTU1, 3. LK1-2A-19 - OTU2, 4. 2-2A-3, 5. asymbiotický výsev). Pro každý čas sterilizace byly připraveny tři izoláty. Zobrazené hodnoty jsou minimum, maximum, první a třetí kvartil a medián.

Oproti tomu na podíl vyklíčených semen samotné kategorie 3 (protokormy) měl vliv druh izolátu. Délka sterilizace opět významný vliv neměla (Tab. VI, Obr. 8). Vysvětlená variabilita (adj-R^2) byla 0,7281.



Obr. 8: Efekt délky sterilizace a druhu izolátu na podíl vyklíčených semen kategorie 3 (protokorm); Písmena A a B označují délku sterilizace vápnem (A - 4 minuty, B - 5 minut) a čísla označují jednotlivé izoláty (1. LK1-1B-76 - OTU1, 2. LK4-2B-13 - OTU1, 3. LK1-2A-19 - OTU2, 4. 2-2A-3, 5. asymbiotický výsev). Pro každý čas sterilizace byly připraveny tři izoláty. Statisticky průkazné rozdíly mezi izoláty jsou označeny písmeny (a, b, c). Zobrazené hodnoty jsou minimum, maximum, první a třetí kvartil a medián.

Na velikost největších semenáčků měl také vliv druh izolátu a délka sterilizace byla opět nesignifikantní. Sterilizace působila různě v kombinaci s různými druhy izolátu – efekt interakce byl signifikantní (Tab. VI, Obr. 9). Vysvětlená variabilita (adj-R^2) byla 0,7817.



Obr. 9: Efekt délky sterilizace a druhu izolátu na průměr tří největších semenáčků, s použitými kulturami hub (1. LK1-1B-76, 2. LK4-2B-13, 3. LK1-2A-19, 4. 2-2A-3, 5. asymbiotický výsev). Písmena A a B označují délku sterilizace vápnem (A - 4 minuty, B - 5 minut). Rozdíly mezi izoláty jsou označeny písmeny (a, b, c). Zobrazené hodnoty jsou minimum, maximum, první a třetí kvartil a medián.

Tab. VI: P-hodnoty Df a F-hodnoty získané dvoucestnou analýzou variance pro podíl vyklíčených semen (kategorie 2 a 3), podíl vyklíčených semen v kategorii 3 a průměr velikosti 3 největších semenáčků. Nulová hypotéza byla, že mezi úrovněmi dané vysvětlující proměnné není z hlediska vysvětlované proměnné rozdíl, Společnou hodnotou DF error = 21.

Vysvětlovaná Vysvětlující	Podíl vyklíčených semen (kategorie 2 a 3)	Podíl vyklíčených semen (kategorie 3)	Průměr velikostí 3 největších semenáčků
Druh izolátu	p = 0,422 DF= 4, F=1,015	p <0,001 DF= 4, F=21,407	p < 0,001 DF=4, F=24,123
Doba sterilizace	p = 0,102 DF=1, F=2,920	p = 0,826 DF=1, F=0,174	p = 0,81480 DF=1, F=0,056
Druh izolátu * Doba sterilizace	p = 0,579 DF= 4, F=0,733	p = 0,500 DF=4, F=0,884	p <0,01 DF=4, F=4,963

5. Diskuse

V tomto výzkumu jsem měla za cíl seznámit se s jednotlivými technikami při výzkumu orchideoidní mykorrhizy. U vybraného druhu *Dactylorhiza majalis* jsem vyzolovala mykorrhizní houby z kořenů a následně porovnála jejich úspěšnost v klíčení semen a symbiotického a asymbiotického výsevu *in vitro*.

Při izolaci pelotonů z kořenů jsem promývala vydlabaný obsah kořenového pletiva ve sterilní destilované vodě a to 3 krát až 7 krát. Takové to množství promytí je standardní (Rasmussen a Whigham, 1998a) a jeho přesný počet je ovlivněn množstvím pelotonů a obsahem škrobu uvolněného do roztoku (O'Neill, ústní sdělení). Osobně se domnívám, že čtyřnásobné promytí pelotonů je dostačující. Negativním prvkem je totiž postupné rozmotávání a ztráta životaschopných pelotonů, což jsou různě rozvolněná klubička hyf, při opakovaném promývání.

Použitím molekulárních metod jsem určila, že mnou izolované houby patřily pouze do dvou taxonomických jednotek (OTU) z čeledi Tulasnellaceae (Tab. V).

Přítomnost Tulasnellaceae, jakožto hlavních mykorrhizních hub *D. majalis*, se shoduje se závěry sekvenační studie na tomto druhu (Jacquemyn et al., 2012). Ačkoliv se rostliny nacházely nejméně 5 metrů od sebe, sdílely stejné druhy hub. To může být způsobeno metodickým postupem, při kterém nemusí být méně častí symbionti podchyceni ve srovnání se sekvenováním přímo z kořenů. Nicméně i zmíněná sekvenační práce na tomtéž druhu odhalila v populaci pouze 3-6 OTU z čeledi Tulasnellaceae v populaci na srovnatelném množství odebraných dospělců. Nevyizolovala jsem ani žádné endofytické houby, což se při izolacích z pelotonů stává (Kohout et al., 2013).

Pro symbiotický výsev jsem zvolila jednoduché Oatmeal médium a k němu kontrolní asymbiotické (MS 1/4-2). Výběr asymbiotického média nebyl ideální, neboť jde o médium s kompletním obsahem všech potřebných látek pro klíčení a růst protokormu (recept v příloze). Jeho použitím jsem získala pouze informaci o rozdílu růstu symbiotických a asymbiotických kultur na živinami bohatém médiu, ale bez symbionta. Nicméně jsem opomenula kontrolní výsev vlivu hub na semena, tento výsev měl být proveden na Oatmeal médium bez přidaného izolátu houby. Z toho důvodu je těžké srovnávat výsledné procentuální klíčení s pracemi ostatních.

Rasmussen et al. (1990b) použili při výsevech 50 – 300 semen, což je v porovnání s mými 29 – několika sty semeny o hodně menší rozptyl. Techniku výsevu by bylo možné dále zlepšit a místo výsevu suspenze vody a semen vstříkovat na médium roztok sterilního agaru se semeny (Zi et al., 2014), u kterého by se snížil problematický efekt sedimentace semen. Zi et al. v metodice výzkumu uvádí, že ve 150 μ l agarového roztoku dosáhli přibližného množství 140 semen.

Ze symbiotických výsevů jsem musela vyřadit z důvodu kontaminace celou sérii misek s izolátem: “OMA3-A36 “. Tuto kulturu jsem dostala od Jana Ponerta a už na samotném počátku nesla známky kontaminace bakterií. Rozhodla jsem se podstoupit riziko a použít ji se snahou vybrání nekontaminované části, což se nepovedlo. Některé kolonie bakterií jsou pouhým okem špatně rozpoznatelné a tak není možné jimi infikovaný vzorek pro další výzkum použít (Zhu et al., 2008).

Procentuální výsledky klíčení (kategorie 2 a 3) symbiotického klíčení 44 % a asymbiotického 42 % potvrzují, že semenáčky druhu *D. majalis* je možné jednoduše vypěstovat na asymbiotickém médiu s kompletním živinovým spektrem (Ponert, ústní sdělení). Pokud by bylo použito pro asymbiotickou kontrolu Oatmeal médium, je možné předpokládat daleko nižší klíčivost, kolem 21 % jako v práci Rasmussen et al., (1990b), u symbiotického klíčení dosáhli maximální hodnoty 53% a to při ideální teplotě 23,6 °C (blízké naší 23 °C).

Rychlost růstu semenáčků se liší mezi typem výsevu (Rasmussen et al., 1990b; Whigham et al., 2002), což jsem potvrdila i ve své práci. V asymbiotickém výsevu do „kategorie 3“ dorostlo méně než 3% semen, v porovnání se symbiotickými 15%. Při vyhodnocování svého pokusu jsem zaznamenala poměrně uniformní velikosti semenáčků v jednotlivých miskách. Tato skutečnost se však lišila s jejich zvětšující se velikostí. Protokormů hruškovitého tvaru (3. kategorie) bylo vždy na misce jen pár.

Při srovnání vlivu jednotlivých izolátů na dosažení růstové kategorie 2 a 3 (Obr. 7) nebyl zaznamenán vliv izolátu, ani délky sterilizace semen. Tento výsledek si vysvětluji tím, že izoláty i asymbiotický výsev byly schopny stejným způsobem podpořit klíčivost semen.

Srovnání jednotlivých izolátů z hlediska početností protokormů (kategorie 3) nám ukazuje signifikantní rozdíl v použitém izolátu (Obr. 8). Zajímavé je srovnání dvou různých izolátů OTU 1, tedy výsev číslo 1 a 2. Tyto izoláty se mezi sebou signifikantně lišily ve schopnosti podpořit klíčení, ačkoliv byly z jedné taxonomické jednotky (nicméně izolované z různých rostlin na stejné lokalitě). Symbiotický výsev s izolátem číslo 2 (LK4-2B-13) se také jako jediný nelišil od výsevu asymbiotického, tj. Podporoval menší množství protokormů a ty dorostly také menších velikostí, než s ostatními izoláty (Obr 8 a 9). To neznamená, že by popisovaný izolát nebyl kompatibilní, jen jeho schopnost podpořit klíčení semen v tomto výsevu byla srovnatelná s asymbiotickým výsevem.

Srovnávala jsem také vliv izolátu a délky sterilizace na velikost tří největších semenáčků na Petriho misku. Vliv izolátu byl signifikantně průkazný a interakce druhu

izolátu a délky sterilizace také průkazná. Tyto výsledky jsou oporou mého tvrzení, že izoláty se mezi sebou liší ve schopnosti podpořit růst semenáčku (velikost).

Doba sterilizace nevyšla průkazná v žádném případě, ale její interakce s druhem izolátu je průkazná pro velikost 3 největších semenáčků na miskou (Obr. 9). Při porovnání sterilizace semenáčků vyrostlých ze sterilizovaných semen po dobu 4 minut „A“ a 5 minut „B“ napříč všemi grafy, je patrný trend lepšího klíčení a růstu semen sterilizovaných 5 minut. Což znamená, že sterilizace dlouhá 5 minut byla pro tato semena vhodnější a více narušila testu (Rasmussen, 1998). Jednotlivé druhy orchidejí, ale i semena se mezi sebou liší v ideální délce sterilizace (J. Ponert, ústní sdělení), proto je dobré vhodnou délku sterilizace vyzkoušet.

Na symbiotické klíčení semen má kromě použitého izolátu houby vliv i teplota – doporučená 23 – 25,5 °C (Rasmussen et al., 1990a) a světlo s následnou tmou (Rasmussen et al., 1990b). Obecně je pro Australské a Evropské terestrické druhy orchidejí doporučena kontinuální tma, přinejmenším do počátku klíčení (Hadley, 1982) či do vzniku protokormů (Clemets, 1982). Pro můj výzkum jsem zvolila kontinuální tmu, z důvodu krátkého trvání experimentu a praktických důvodů.

6. Závěr

Cílem mé práce bylo především seznámit se s existujícími technikami používanými při dlouhém procesu obnovy orchidejí. V této části jsem se věnovala především orchideoidní mykorhize, její funkci v životě rostliny a následným technikám izolace těchto symbiontů v podmínkách *in vitro*. Popsala jsem i řadu metod používajících se při výzkumu a obnově *in situ*, tyto své znalosti bych ráda později použila v budoucím výzkumu.

V praktické části své bakalářské práce jsem si vyzkoušela techniky *in vitro* používané při výzkumu a obnově orchidejí v přírodě. Můj výzkum byl úspěšný, vyzolovala jsem mykorhizní houby asociující s dospělými jedinci druhu *D. majalis*, identifikovala je pomocí molekulárních technik a potvrdila jejich schopnost vzklíčit

semena při symbiotickém výsevu. Osvojení těchto technik bylo velmi důležité pro pokračující studium orchideoidní symbiózy.

V budoucnu bych ráda pokračovala ve výzkumu na orchidejích a pokryla tak techniky zabývající se ochranou a obnovou orchidejí *in situ*, jako výsev semen s přidaným inokulem mykorhizní houby. Mám v plánu rozšířit mou sbírku mykorhizních hub o více druhů, izolovaných z protokormů orchidejí z rámečků a ty následně testovat a používat v praxi.

7. Literatura

- Alexander C., Hadley G. (1985): Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br.. *New Phytologist* 101: 657–665.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Arditti, J., Ghani A. K. A. (2000): Tansley review No. 110: numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367–421.
- Barsberg S., Rasmussen H. N., Kodahl N. (2013): Composition of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) seeds analyzed by attenuated total reflectance IR spectroscopy: in search of understanding longevity in the ground. *American Journal of Botany* 100: 2066–2073.
- Batty A. L., Dixon K. W., Brundrett M., Sivasithamparam K. (2001): Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytologist* 152: 511- 520.
- Beyrle H. F., Smith S. E., Peterson R. L., Franco C. M. M. (1995): Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany* 73: 1128–1140.
- Bioinformatics (2009) 25 (11): 1463-1465 first published online April 3, 2009 doi:10.1093/bioinformatics/btp184.
- Brundrett M. C. (2002): Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* (2002) 154: 275–304.
- Brundrett M. C., Scade A., Batty A. L., Dixon K. W., Sivasithamparam K. (2003): Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycological Research* 107: 1210–1220.

- Caldwell B. A., Castellano M. A., Griffiths R. P. (1991): Fatty acid esterase production by ectomycorrhizal fungi. *Mycologia* 83: 233-236.
- Cameron D. D., Leake J. R., Read D. J. (2006): Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405-416.
- Chán V. (eds.) (1999): Komentovaný Červený seznam květeny jižní části Čech (Commented Red List of Flora of southern part of Bohemia). *Příroda*, 16. AOPK ČR a Jihočeská pobočka České botnické společnosti, České Budějovice.
- Clements M. A. (1982): Australian native orchids (Epiphytic and terrestrial). – In *Orchid Biology II* (Arditti J., ed.), pp. 295-303. Cornell University Press, Ithaca, NY. ISBN 0-8014-1276-5.
- Clements M. A., Muir H., Cribb P. J. (1985): A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin* 41: 437-45.
- Cribb P. J., Kell S. P., Dixon K. W., Barrett R. L. (2003): Orchid conservation: a global perspective. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Malaysia. pp 1-24.
- Currah R. S., Sigler L., Hambleton S. (1987): New records and taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany* 65: 2473-2482.
- Darwin C. (1862): *On the Various Contrivances by which British and Foreign Orchids are Fertilized by Insects, and on the Good Effects of Intercrossing*. John Murray, London, UK.
- Dearnaley J. D., Martos W. F., Selosse M.-A. (2012): Orchid mycorrhizas: Molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock B. (eds.), *Fungal associations, The Mycota IX*, 2nd ed., in press. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- De hert K., Jacquemyn H., Provoost S., Honnay O. (2013): Absence of recruitment limitation in restored dune slacks suggests that manual seed introduction can be a successful practice for restoring orchid populations. *Restoration Ecology* 21: 159–162.

- Diez M. J. (2007): Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology* 95: 159-170.
- Dijk E., Eck N. (1995): Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist* 131: 361–367.
- Dijk E., Olf H. (1994): The effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on the field performance of *Dactylorhiza majalis*. *Acta Botanica Neerlandica* 43: 383-392.
- Dressler R. L. (2005): How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Gebauer G., Meyer M. (2003): ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160: 209-223.
- Gill D. E. (1996): The natural population ecology of temperate terrestrials: pink lady's-slippers, *Cypripedium acaule*. In: Allen C. (eds.) *North American native terrestrial orchids, Propagation and production*, 91-106. North American native terrestrial orchid conference, Germtown, MD.
- Grulich V. (2012): *Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition*. Preslia : časopis české botanické společnosti, Praha: Česká botanická společnost 84: 631-645. ISSN 0032-7786.
- Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J., Vosátka M. (2004): Mykorhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin. ACADEMIA, Praha, ČR.
- Hadley G. (1982): European terrestrial orchids – In *Orchid Biology II* (Arditti J., ed.), pp. 295-303. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. ISBN 0-8014-1276-5.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hanula, J. L., Ulyshen M. D., Horn S. (2016): Conserving Pollinators in North American Forests: A Review. *Natural Areas Journal* 36: 427-439.

- Hejcman M., Schellberg J., Pavlů V. (2010): *Dactylorhiza maculata*, *Platanthera bifolia* and *Listera ovata* survive N application under P limitation. *Acta Oecologica* 36: 684-688.
- Hobbs R. J. (2007): Managing plant populations in fragmented landscapes: restoration or gardening? *Australian Journal of Botany* 55:371-374.
- Hollick P. S. (2004): Mycorrhizal specificity in endemic Western Australian terrestrial orchids (tribe Diruideae): Implications for conservation. Thesis at Murdoch University, Perth, Australia.
- Hughes K. W., Petersen R. H., Lickey E. B. (2009): Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species declination across basidiomycete fungi. *New Phytologist* 182: 795-798.
- Jacquemyn H., Brys R., Vandepitte K., Honnay O., Roldán-Ruiz I., Wiegand T. (2007): A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist* 176: 448–459.
- Jacquemyn H., Deja A., De hert K., Cachapa Bailarote B., Lievens B. (2012): Variation in Mycorrhizal Associations with *Tulasnelloid* Fungi among Populations of Five *Dactylorhiza* Species. *PLoS ONE* 7(8): e42212. doi:10.1371/journal.pone.0042212.
- Jacquemyn H., Wiegand T., Vandepitte K., Brys R., Roldán-Ruiz I., Honnay O. (2009): Multigenerational analysis of spatial structure in the terrestrial, food-deceptive orchid *Orchis mascula*. *Journal of Ecology* 97: 206-216.
- Janečková P., Wotavová K., Schödelbauerová I., Jersáková J., Kindlmann P. (2006): Relative effects of management and environmental conditions on performance and survival of populations of terrestrial orchid, *Dactylorhiza majalis*. *Biological Conservation* 129: 40-49.
- Jatiová M., Šmiták J. (1996): Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a Slezsku (Distribution and protection of orchids in Moravia and Silesia). Agentura ochrany přírody a krajiny, Brno.

- Jersáková J., Kindlmann P. (2004): Zásady péče o orchidejová stanoviště. KOPP nakladatelství, České Budějovice.
- Jersáková J., Kindlmann P., Střiteský M. (2002): Population dynamics of *Orchid morio* in the Czech Republic under human influence. In: Kindlmann P., Willems J. H., Whigham D. F. (eds.) Trends and fluctuations and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations. Backhuys Publishers, Leiden, pp 209-224.
- Jersáková J., Malinová T. (2007): Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176: 237-241.
- Jongepierová I., Pešout P., Jongepier J. W., Prach K. (2012): Ekologická obnova v České republice. - Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha.
- Kohout P., Těšitelová T., Roye M., Vohník M., Jersáková J. (2013): A diverse fungal community associated with *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) roots. *Elsevier* 6: 50–64.
- Kull T., Selgis U., Pecina M. V., Metsare M., Ilves A., Tali K., Sepp K., Kull K., Shefferson R. P. (2016): Factors influencing IUCN threat levels to orchids across Europe on the basis of national red list. *Ecology and Evolution* 6: 6245-6265.
- Leake J. R. (1994): Transley review No. 69: The biology of myco-heterotrophic („saprotrophic“) plants. *New Phytologist* 127: 171-216.
- Light M. H. S., Koopowitz H., Marchant T. A. (2003): The impact of climatic, edaphic and physiographic factors on the population behaviour of selected temperate and tropical orchids. In: Dixon K. W., Kell S. P., Barrett R. I., Cribb P. J. (eds.), *Orchid conservation*, Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp. 159–182.
- Liu H., Ren H., Liu Q., Wen X. Y., Maunder M., Gao J. Y. (2015): Translocation of threatened plants as a conservation measure in China. *Conservation Biology*, 29: 1537–1551.

- Marx D. S. (1969): The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Masuhara G., Katsuya K., Zamaguchi K. (1993): Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* *in vitro*. *Mycological Research* 97: 746-752.
- Maunder M. (1992): Plant reintroduction – an overview. *Biodiversity and Conservation* 1:51-61.
- McCormick M. K., Jacquemyn H. (2014): What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist* 202: 392-400.
- McCormick M. K., Taylor D. L., Juhaszova K., Burnett R. K., Whigham D. F., O'Neill J. P. (2012): Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. *Molecular Ecology* 21: 1511–1523.
- McCormick M. K., Taylor D. L., Whigham D. F., Burnett R. K. (2016): Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 104: 744-754.
- McCormick M. K., Whigham D. F. (2012): Using the complexities of orchid life histories to target conservation efforts. *The Native Orchid Conference Journal* 9.
- McCormick M. K., Whigham D. F., O'Neill J. P. (2004): Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163: 425-438.
- McCormick M. K., Whigham D. F., O'Neill J. P., Becker J. J., Werner S., Rasmussen H. N., Bruns T. D., Taylor D. L. (2009): Abundance and distribution of *Corallorhiza odontorhiza* reflect variations in climate and ectomycorrhizae. *Ecological Monographs* 79: 619-635.
- McCormick M. K., Whigham D. F., Sloan D., O'Malley K., Hodkinson B. (2006): Orchid fungus fidelity: A marriage meant to last? *Ecology* 87: 903-911.
- McKendrick S. L. (1994): The effects of herbivory and vegetation on laboratory-raised

- Dactylorhiza praetermissa* (Orchideaceae) planted into grassland in Southern England. *Biological Conservation* 73:215-220.
- McKendrick S. L. (1996): The effects of fertilizer and root competition on seedlings of *Orchis morio* and *Dactylorhiza fuchsii* in chalk and clay soil. *New Phytol* 134: 335–342.
- McKendrick S. L., Leake J. R. and Read D. J. (2000): Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* 145: 539-548.
- Mudrak O., Fajmon K., Jongepierova I., Dolezal J. (2016): Restoring species- rich meadow by means of turf transplantation: long- term colonization of ex- arable land. *Applied Vegetation Science*, in press.
- Mursidawati S. (2004): Mycorrhizal association, propagation and conservation of the myco-heterotrophic orchid *Rhizantella gardneri*. Thesis at University of Western Australia, Perth, Australia.
- Nantel P., Neumann P. (1992): Ecology of mycorrhizal-basidiomycete communities on a local vegetation gradient. *Ecology* 73:99-117.
- Newman R. D., Showler K. J., Harvey M. C., Showler D. A. (2007): Hand pollination to increase seed-set of red hellebore *Cephalanthera rubra* in the Chiltern Hills, Buckinghamshire, England. *Conservation Evidence* 4: 88-93.
- Pedersen H. ., Rasmussen H. N., Kahandawala I. M., Fay M. F. (2012): Genetic diversity, compatibility patterns and seed quality in isolated populations of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). *Conservation Genetics* 13: 89-98.
- Pfeifer M., Heinrich W., Jeschke G. (2006): Climate, size and flowering history determine flowering pattern on an orchid. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 511-526.
- Philips R. D., Barret M. D., Dixon K. W., Hopper S. D. (2011): Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *Journal of Ecology* 99: 858-869.

- Piercey-Normore M. D., DePriest P. T. (2001): Algal switching among lichen symbioses. *American Journal of Botany* 88: 1490-1498.
- Ponert J., Figura T., Vosolsobě S., Lipavská H., Vohník M., Jersáková J. (2013): Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany* 91:662-670.
- Ponert J., Vosolsobě S., Kmecová K., Lipavská H. (2011): European orchid cultivation - from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* 1(2): 95–107. Available from <http://ejes.cz/index.php/ejes/article/view/57> [accessed 1. 12. 2016].
- Prach K., Hobbs R. J. (2008): Spontaneous succession versus technical reclamation in the restoration of disturbed sites. 16: 363-366.
- Prach K., Jongepierová I., Řehouňková K. (2012): Large-scale restoration of dry grasslands on ex-arable land using a regional seed mixture: establishment of target species, *Restoration Ecology*.
- Procházka F. (1980): Naše orchideje. Krajské muzeum východních Čech, Pardubice, ČR.
- Prosser J. I. (2013): Think before you sequence. In: Jansson J. K. Prosser J. I.: *Microbiology: the life beneath our feet*. *Nature* 494: 40-41.
- Ramsey P. R., Dixon K., W., Sivasithamparam K. (1986): Patterns of infection and endophytes associated with western Australian orchids. *Lindleyana* 1: 203-214.
- Rasmussen H. N. (1990a): Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchideaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell and Environment* 13: 171-177.
- Rasmussen H. N. (1995): *Terrestrial Orchid: From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rasmussen H. N. (2002): Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149-163.

- Rasmussen H. N., Anderson T. F., Johansen B. (1990b) Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (Orchideaceae) *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 79: 226-230.
- Rasmussen H. N., Dixon K. W., Jersáková J., Těšitelová T. (2015): Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany* 116: 391-402.
- Rasmussen H. N., Rasmussen F. N. (2009): Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118: 334-345.
- Rasmussen H. N., Rasmussen F. N. (2014): Seedling mycorrhiza: discussion of origin and evolution in Orchideaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 313-327.
- Rasmussen H. N., Whigham D. F. (1993): Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany* 80: 1374- 1378.
- Rasmussen H. N., Whigham D. F. (1998a): Importance of woody debris in seed germination of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85:829–834.
- Rasmussen H. N., Whigham D. F. (1998b): The underground phase a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 49-64.
- Rasmussen H. N., Whigham D. F. (2002): Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154: 797-807.
- R Core Team (2016): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Roberts D. L. (2003): Pollination biology: the role of sexual reproduction in orchid conservation. In: Dixon K. W., Kell S. P., Barrett R., L., Cribb P. J. (eds.) *Orchid conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications. 113-136.

- Roberts D. L., Dixon K. W. (2008): Orchids. *Current Biology* 18: R325-R329.
- Roberts P. (1999): Rhizoctonia-forming fungi. A taxonomic guide. The Herbarium. Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1 900347695.
- Salman R., Prendergast G., Roberts P. (2002): Germination of *Dactylorhiza fuchsii* seeds using fungi from non-orchid sources. In: Kindlmann, P; Willems, JH; Whigham, DF (eds.) Trend and fluctuations and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations. Conference on Trends and Fluctuations and Underlying Mechanisms in Terrestrial Orchid Populations, České Budějovice pp. 133-153.
- Scade A., Brundrett M. C., Batty A. L., Dixon K. W., Sivasithamparam K. (2006): Survival of transplanted terrestrial orchid seedlings in urban bushland habitats with high or low weed cover. *Australian Journal of Botany* 54:383–389.
- Seaton P. T., Hu H., Perner H., Prichard H W. (2010): *Ex situ* conservation of orchids in warming World. *Botanical Revue* 76: 193-203.
- Seaton P. T., Pritchard H. W. (2003): Orchid germplasm collection, storage and Exchange. Pp 227-258. In: Dixon K. W., Kell S. P., Barrett R. L., Cribb P. J. (eds). Orchid conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.
- Shefferson R. P., Kull T., Tali K. (2008): Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailing hills. *American Journal of Botany* 95:156–164.
- Shefferson R. P., Proper J., Beissinger S. R., Simms E. L. (2003): Life history trade-offs in a rare orchid: the costs of flowering, dormancy and sprouting. *Ecology* 84: 1199-1206.201.
- Sommerville K. D., Siemon J. P., Wood C. B., Offord C. A. (2009): Simultaneous encapsulation of seed and mycorrhizal fungi for long-term storage and propagation of terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany* 56: 609-615.
- Swarts N. D., Dixon K. W. (2009): Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* 104: 543-556.

- Swarts N. D., Sinclair E. A., Francis A., Dixon K. W. (2010): Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Mol Ecol* 19:3226–3242.
- Taylor D. L., Bruns T. D. (1997): Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 94: 4510-4515.
- Taylor D. L., Bruns T. D. (1999): Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719-1732.
- Těšitelová T., Jersáková J., Roy M., Kubátová B., Těšitel J., Urfus T., Trávníček P., Suda J. (2013): Ploidy-specific symbiotic interactions: divergence of mycorrhizal fungi between cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* group (Orchideaceae). *New Phytologist* 199: 1022-1033.
- Těšitelová T., Těšitel J., Jersáková J., Říhová G., Selosse M-A. (2012): Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *American Journal of Botany* 99: 1020–1032.
- Tremblay R. L. (2006): The effect of flower position on male and female reproductive success in a deceptively pollinated tropical orchid. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 405-410.
- Tsiftsis S., Tsiripidis I., Trigas P. (2011): Identifying important areas for orchid conservation in *European Journal of Environmental Sciences* 1: 28-37.
- Vandepitte K., Gristina A. S., De hert K., Meekers T., Roldán-Rouiz I., Honnay O. (2012): Recolonization after restoration leads to decreased genetic variation in populations of a terrestrial orchid. *Molecular Ecology* 21: 4206-4215.
- Van der Kinderen G. (1995): A method for the study of field germinated seeds of terrestrial orchids. *Lindleyana* 10: 68-73.
- Van Waes J. M., Debergh P. C. (1986): *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*. 67: 253–261.

- Warcup J. H., Talbot P. H. B. (1967): Perfect states of *Rhizoctonias* associated with orchids. *New Phytologist* 66: 631-641.
- Whigham D. F. (1990): The effect of experimental defoliation on the growth and reproduction of a woodland orchid, *Tipularia discolor*. *Canadian Journal of Botany* 68: 1812-1816.
- Whigham D. F., McCormick M. K., O'Neill J. P. (2014): Ongoing studies of *Isotria medeoloides*, Small Whorled Pogonia. *The NOC Journal* 11: 6-11.
- Whigham D. F., O'Neill J., McCormick M., Smith C., Rasmussen H., Caldwell B., Daniell T. (2002): Interactions between decomposing wood, mycorrhizas, and terrestrial orchid seeds and protocorms. In: Trends and fluctuations and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations, pp. 171-131. Kindlmann P., Willems J. H., Whigham D. F. (eds) Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Whigham D. F., O'Neill J. P., Rasmussen H. N., Caldwell B. A., McCormick M. K. (2006): Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent *in situ* seed banks. *Biological Conservation* 129: 24-30.
- Wotavová K., Balounová Z., Kindlmann P. (2003): Factors affecting persistence of terrestrial orchids in wet meadows and implications for their conservation in a changing agricultural landscape. *Biological Conservation* 118: 271-279.
- Zelmer C. D., Cuthbertson L., Currah R. S. (1996): Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycosience* 37: 439-448.
- Zettler L. W., Burkhead J. C., Marshall J. A. (1999): Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* *in vitro*. *Lindleyana* 14: 102-105.
- Zettler L. W., Hofer C. J. (1997): Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany* 39: 189–195.
- Zettler L. W., Piskin K. A. (2011): Mycorrhizal fungi from protocorms, seedlings and mature plants of the eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea*

(Nutt) Lindley: A comprehensive list to augment conservation. *Am. Midi. Nat.* 166: 29-39.

Zettler L. W., Piskin K. A., Stewart S. L., Hartsock J. J., Bowles M. L., Bell T. J. (2005): Protocorm mycobionts of the Federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings. *Studies in Mycology* 53: 163-171.

Zhu G. S., Yu Z. N., Gui Y., Liu, Z. Y. (2008): A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity* 33: 123-137.

Zi X. M., Sheng C. L., Goodale U. M., Shao S. C., Gao J. Y. (2014): *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 24: 487.

8. Přílohy

Přehled receptů používaných při izolacích hub a vzkličování orchidejových semen

8.1 Přehled médií

Melin Norkrans médium (MMN) s polovičním obsahem cukrů (Marx, 1969)

glukóza	1g
kvasnicový extrakt	0,3g
KH ₂ PO ₄	1g
Ammonium phosphate dibasic	0,25g
Magnesium sulphate	10 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5,7 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,3 mg
CaCl ₂	50 mg
NaCl	25 mg
FeCl ₃	12mg
agar	15 g
Novobiocin*	50 mg
destilovaná voda	1 l

* Použití při izolaci pelotonů, není nutné při udržování čistých houbových kultur.

Oatmeal médium (OMA) (Clemets et al., 1985)

mleté ovesné vločky	3 g
agar	10 g
destilované vody	1 l

pH: 5,6 (Zi et al., 2014)

Potato dextrose agar (PDA) (Rasmussen, 1995; Rasmussen a Whigham, 1998a)

bramborová mouka (škrob)	200 g
glukóza	10 g
agar	10 g
destilovaná voda	1 l

Asymbiotické médium MS 1/4-2 (Ponert et al., 2011)

Roztok MS-A	12,5 ml
Roztok MS-B	1,25 ml
Roztok Fe	1,25 ml
Roztok MS-D	1,25 ml
Pangamin (lékárna, 1 tableta = 0,45 g)	0,45 g
casein enzymatický hydrolyzát	1 g
roztok ananasu	20 ml
sacharóza	15 g
aktivní uhlí	0,5 g
kinetin	2 mg
agar	7 g
destilovaná voda	1l

pH 5,8

Roztok MS-A o objemu 1l

NH ₄ NO ₃	33 g
KNO ₃	38 g
CaCl ₂	6,62 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,4 g
KH ₂ PO ₄	3,4 g

v chladničce

Roztok MS-B o objemu 500 ml

KI	0,083 g
H ₃ BO ₃	0,620 g
MnSO ₄ · H ₂ O	1,69 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,860 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5 mg
CoCl ₂	1,3 mg

(pokud se použije CoCl₂ * 6H₂O musí se zvýšit navážka na 2,38 mg)

v chladničce

Roztok Fe o objemu 500 ml

FeSO ₄ · 7H ₂ O	2,78 g
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	3,73 g

Obě složky jsou rozpuštěny odděleně ve 200 ml destilované vody, zahřáty v mikrovlnné troubě na cca 80°C, poté je roztok FeSO₄·7H₂O pozvolna přilít za stálého

míchání k roztoku Na₂EDTA·2H₂O. Směs je míchána až do vychladnutí. Roztok je doplněn destilovanou vodou na objem 500 ml.

Roztok MS-D o objemu 500 ml

inositol	10 g
kyselina nikotinová	50 mg
pyridoxin – HCl	50 mg
thiamin – HCl	50 mg
glycin	0,2 g

zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)

Roztok ananasu

K přípravě roztoku je používán ananas zakoupený v běžné obchodní síti. Kuchyňským nožem je rozkrájen na plátky, z nich okrájeny širší okraje, které jsou dále zpracovány pro tento roztok. Okraje jsou nakrájeny na kostičky cca 2 x 2 cm a vymačkány s pomocí plátěného sáčku či odšťavňovače. Šťáva je následně rozpipetována po 5 a 10 ml do plastových nádobek a skladována do použití při -80 °C.

kinetin 1 mg / ml

Do médi přidán před klávoáním, z důvodu špatného rozpouštění je nutné přidat trochu hydroxidu

nalévání média

Médium je potřebné nalévat již ochlazené, aby uhlí nesedalo na dno a médium zůstalo homogenní v celém svém objemu.

Fungus isolating media (FIM) (Clements et al., 1985)

Ca(NO ₃) ₂ · H ₂ O	500 mg
KH ₂ PO ₄	200 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100 mg
KCl	100 mg
glukóza	5 g
kvasnicový extrakt	100 mg
agar	10 g
destilovaná voda	1 l

E-médium (modifikováno podle Caldwell et al., 1991)

glukóza	10 g
Ammonium tartrate	250 mg
KH ₂ PO ₄	400 mg
MgSO ₄	500 mg
nebo Mg SO ₄ .7 H ₂ O	1 020 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	100 mg
kvasnicový extrakt	50 mg
Ferric citrate	5 mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	5 mg
nebo MnSO ₄ · H ₂ O	378 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4 mg
agar	15 g
Novobiocin*	50 mg
Destilovaná voda	1 l

* Použití při izolaci pelotonů, není nutné při udržování čistých houbových kultur.

BS médium (Caldwell et al., 1991)

glukóza	10 g
ammonium tartrate	0, 25 g
KH ₂ PO ₄	0, 4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0, 5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0, 1 g
kvasnicový extrakt	50 mg
ferric citrate	5 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4 mg
agar	12 – 15 g
Novobiocin*	50 mg
Destilovaná voda	1 l

* Použití při izolaci pelotonů, není nutné při udržování čistých houbových kultur.

Řídké médium se dřevem (McCormick et al., 2004)

drcené dřevo <i>Liriodendron tulipifera</i>	2 g
agar	12 g
destilovaná voda	1 l

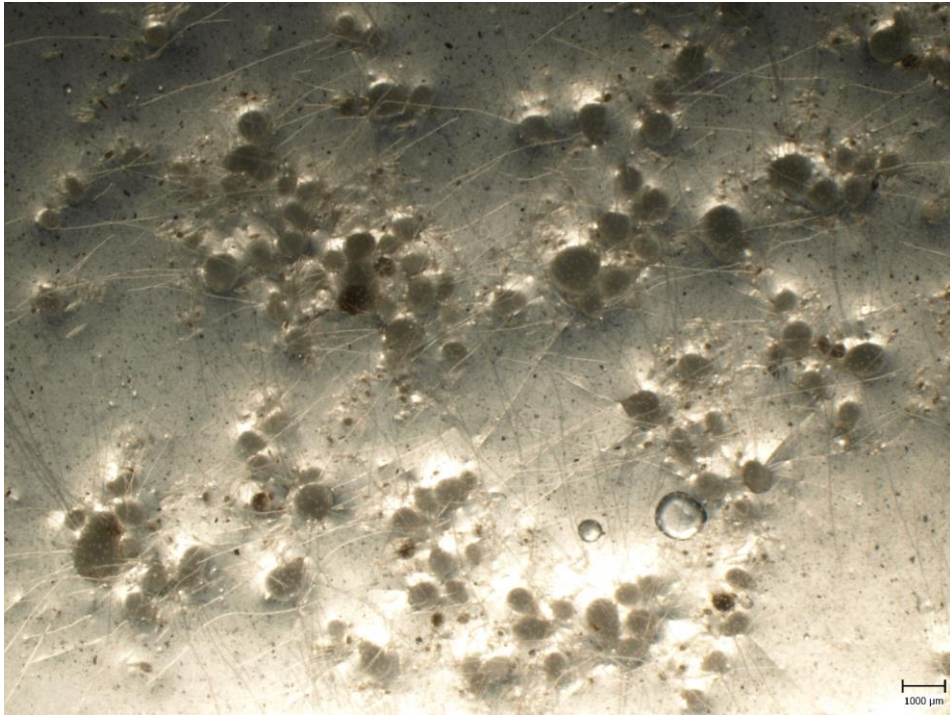
Vodní agar (Water agar) (Rasmussen a Whigham, 1993)

agar	12 g
destilovaná voda	1 l

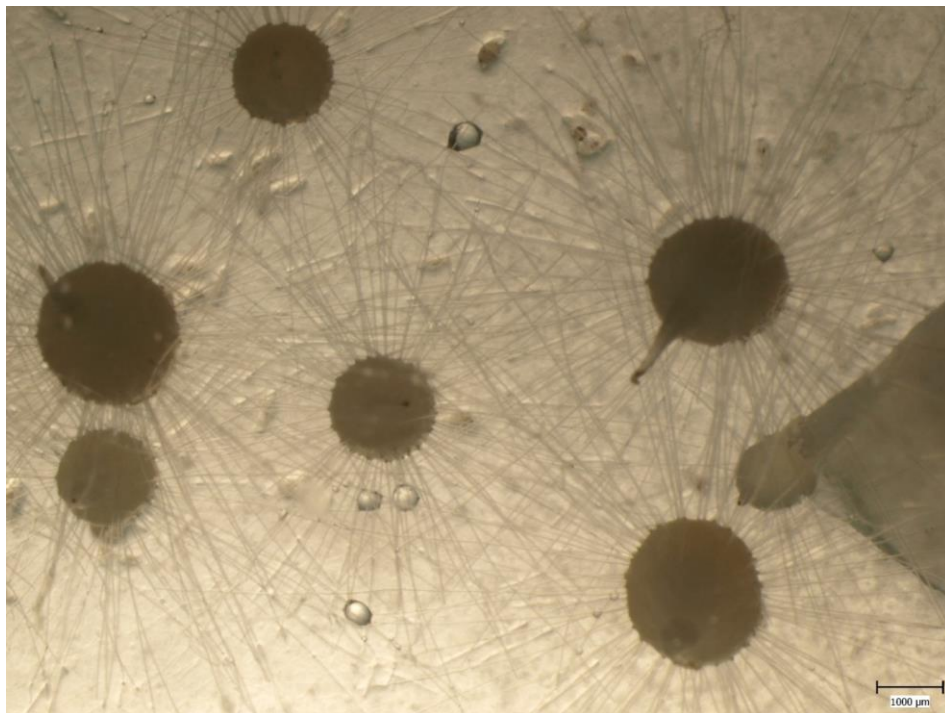
8.2 Obrázky



Obr. p1: Kvetoucí jedinec *Dactylorhiza majalis*.



Obr. p2: Asymbiotický výsev druhu *Dactylorhiza majalis*.



Obr. p3: Symbiotický výsev druhu *Dactylorhiza majalis* s viditelnými protokormy (kategorie 3) a izolátem houby (bílá šipka).