

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Izolace a identifikace orchideoidních mykorhizních hub a symbiotické/asymbiotické klíčení semen terestrických orchidejí *in vitro*.

Michal Beneš

Školitel: RNDr. Jana Jersáková, PhD.
Přírodovědecká fakulta JU

České Budějovice 2010

Benes, M. 2010: Izolace a identifikace orchideoidních mykorrhizních hub a *in vitro* symbiotické/asymbiotické klíčení semen terestrických orchidejí. [Isolation and identification of orchid mycorrhizal fungi and *in vitro* symbiotic/asymbiotic germination of terrestrial orchid seeds. Bc. Thesis, in Czech] – 34 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis is a review on isolation, cultivation and identification of orchid mycorrhizal fungi and symbiotic and asymbiotic germination of terrestrial orchid seeds. Mycorrhizal fungi can be used in *in vitro* symbiotic germination. *In vitro* symbiotic and asymbiotic germination of terrestrial orchid seeds is often difficult because of seed dormancy, which must be broken by certain treatment. Suitable treatment and composition of cultivation medium are important for enhancing seed germination.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - 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.

27.12.2010

.....

Michal Beneš

Poděkování:

Především bych chtěl poděkovat své školitelce Janě Jersákové za její trpělivost, ochotu a nedocenitelné připomínky k textu. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a sice hlavně své mamince, která mě svými ověřenými mateřskými postupy přiměla práci dokončit, vydržela poslouchat mé stížnosti a v neposlední řadě se podílela na gramatické korekci.

Děkuji také svým spolužákům za rady týkající se vyhledávání vědeckých článků a všem svým přátelům za umožnění nezbytného psychického odpočinku.

Obsah

1. Úvod.....	-1-
1.1 Mykorhizní symbióza.....	-1-
1.2 Orchideoidní mykorhizní symbióza.....	-2-
1.2.1 Charakteristika orchideoidní symbiózy.....	-2-
1.2.2 Regulace OM hub hostitelskou rostlinou.....	-2-
1.2.3 Houby tvořící OM.....	-3-
1.2.4 Specifita OM.....	-4-
1.2.5 Funkce OM.....	-5-
1.2.5.1 Mykotrofie.....	-5-
1.2.5.2 Přenos látek mezi mykobiontem a orchidej.....	-6-
2. Izolace, kultivace a identifikace OM hub.....	-7-
2.1 Izolace a kultivace OM hub.....	-7-
2.1.1 Kultivační média.....	-9-
2.1.2 Kultivační podmínky.....	-10-
2.2 Identifikace OM hub.....	-10-
3. Klíčení semen terestrických orchidejí <i>in vitro</i>	-11-
3.1 Skarifikace semen.....	-12-
3.2 Teplota.....	-13-
3.3 Světlo.....	-14-
3.4 Vliv CO ₂ a etylenu v prostředí.....	-15-
3.5 Klíčení nezralých semen.....	-16-
3.6 Kultivační média pro orchideje.....	-17-
3.6.1 Sacharidy.....	-17-
3.6.2 Koncentrace iontů a struktura média.....	-18-
3.6.3 Dusíkaté sloučeniny.....	-18-
3.6.4 Další ionty.....	-19-
3.6.5 pH.....	-20-
3.6.6 Fytohormony.....	-20-
3.6.6.1 Cytokininy.....	-20-
3.6.6.2 Auxiny.....	-21-
3.6.6.3 Gibereliny.....	-21-
3.6.6.4 Kyselina abscisová.....	-21-
3.6.7 Vitamíny.....	-22-
3.6.8 Další používané doplňky médií.....	-22-
3.6.9 Příprava kultivačního média.....	-23-
3.7 Asymbiotické klíčení <i>in vitro</i>	-23-
3.8 Symbiotické klíčení <i>in vitro</i>	-24-
4. Závěr.....	-24-
5. Literatura.....	-25-

1. Úvod

1.1 Mykorhizní symbióza

Mykorhizní symbióza je jev, při kterém jsou kořeny vyšších rostlin kolonizovány jednou nebo větším počtem mykorhizních hub, které se přirozeně vyskytují v půdě. Tento specifický vztah je většinou symbiotický, ale může se stát parazitickým v případě, kdy jeden z partnerů získá převahu (Korhoň 2003).

Mykorhizní symbióza se vyskytuje u převážné většiny rostlin. Celkově se odhaduje, že asi 90 % všech druhů rostlin je buď částečně nebo zcela mykorhizními (Wang a Qiu 2006, Brundrett 2009). Mezi krytosemennými rostlinami je tvorba mykorhiz značně potlačena u čeledí brukvovitých (Brassicaceae), sítinovitých (Juncaceae), šáchorovitých (Cyperaceae), okřehekovitých (Lemnaceae), hvozdíkovitých (Caryophyllaceae) a merlíkovitých (Chenopodiaceae) (Harley a Harley 1987).

Při kolonizaci hostitelského kořene houbou, vzniká duální orgán zvaný mykorhiza a mykorhizní houby tak pomocí svých vláken propojují vnitřní prostor kořene s půdním prostředím. Prostřednictvím tohoto soužití zajišťují mykorhizní houby přísun vody, minerálních látek, dusíku a fosforu pro hostitelskou rostlinu, která naopak poskytuje symbiotické houbě asimiláty a růstové látky. Tento mutualistický vztah je tak těsný, že většina mykorhizních hub by bez hostitelských rostlin pravděpodobně vyhynula a podobně je tomu i s hostitelskými rostlinami (Gryndler a kol. 2004).

Mykorhizní houby patří mezi houby z oddělení *Ascomycota*, *Basidiomycota* a *Glomeromycota*. Mnoho různých druhů těchto hub se v půdě vyskytuje současně a tvoří zde společenstvo (Gryndler a kol. 2004). Při kolonizaci hostitelské rostliny nezasahuje mykorhizní houba do celého kořene, ale omezuje se jen na některá pletiva a sice na kořenovou pokožku (rhizodermis) a kořenovou kůru, za kterou se zpravidla označuje několik vrstev buněk pod kořenovou pokožkou. V případě „vyváženého“ symbiotického vztahu mykorhizní houba do dalších hlubších vrstev ani jiných rostlinných pletiv neproniká.

Mykorhizní symbiózu lze rozdělit na několik typů, a sice na endomykorhizu a ektomykorhizu. Při endomykorhize dochází k průniku houbových vláken dovnitř buněk hostitelského kořene. Řadí se sem arbuskulární, erikoidní a orchideoidní mykorhizní symbiózy. Při ektomykorhize neproniká houba dovnitř buněk hostitele, ale nachází se pouze v mezibuněčných prostorech kořenové kůry, kde tvoří tzv. Hartigovu síť a na povrchu hostitelova kořene vytváří tzv. hyfový plášť. Mezi další druhy mykorhizní symbiózy patří

ektendomycorhizní, arbutoidní a monotropoidní mykorhizní symbiózy, které náleží k méně častým a přechodným formám mezi ektomykorhizní symbiózou a endomykorhizními typy symbiózy.

1.2 Orchideoidní mykorhizní symbióza

1.2.1 Charakteristika orchideoidní symbiózy

Zástupci rostlinné čeledi vstavačovitých (Orchidaceae) vytvářejí orchideoidní mykorhizní symbiózu (OM), která je považována za vývojově nejmladší typ endomykorhizní symbiózy. Je charakteristická vytvářením hyfových smotků (pelotony) uvnitř buněk kořenové kůry hostitele, skrz rhizodermis houbové hyfy pouze pronikají (Gryndler a kol. 2004).

Orchideje mají poměrně širokou ekologickou amplitudu, a proto nalézáme terestrické druhy na živných humózních půdách, zatímco epifytické a litofytické druhy na stanovištích extrémně chudých na živiny. Geografické centrum rozšíření orchidejí leží v tropech, ale jejich výskyt je prakticky celosvětový a lze je nalézt i v subboreálním klimatickém pásmu (Gryndler a kol. 2004). Ačkoli je orchideoidní mykorhiza spolu s orchiděmi celosvětově rozšířená, není dosud známa jiná rostlinná skupina, která by tento typ mykorhizy vytvářela.

Přestože většina druhů orchidejí je v dospělosti zcela nebo jen částečně autotrofní (tj. kombinují fotosyntézu s mykotrofní výživou, tzv. mixotrofií), všichni zástupci orchidejí prochází, přinejmenším v raných vývojových stádiích, fází, během které nejsou fotosynteticky aktivní a závisí tedy z hlediska získávání uhlíkatých látek zcela na mykorhizní houbě (mykoheterotrofií) (Smith a Read 2008). Podle posledních poznatků se OM účastní jak saprofytické druhy basidiomycet, tak zástupci ektomykorhizních basidiomycet a askomycet (Rasmussen 2002).

1.2.2 Regulace OM hub hostitelskou rostlinou

Kolonizace mykorhizní houbou se omezuje pouze na kořeny orchidejí. Terestrické druhy mají kořeny pravidelně kolonizovány, ale nedělené kořenové hlízy nebo např. báze dělených kořenových hlíz kolonizované nejsou. Tzn., že orchideje mají vyvinuté různé způsoby jak účinně omezovat až eliminovat růst houby ve svých pletivech (Gryndler a kol. 2004).

Bylo zjištěno, že orchideje využívají jak fyzikální, tak chemický způsob k dosažení regulace růstu OM houby. Tloušťnutím buněčných stěn a ukládáním fenolových sloučenin

v buněčných stěnách rhizodermálních a vnějších korových buněk kořene vytváří fyzikální bariéry (Beyrle a kol. 1995). Dále se předpokládá, že se během kolonizace zvyšuje oxidativní enzymatická aktivita, podobně jak je tomu při zvýšení oxidativní aktivity rostlin proti patogenům, což by mohlo také hrát svoji roli v obraně orchidejí proti houbové kolonizaci (Blakeman a kol. 1976). Při kontrole houbového růstu však mají největší význam fungicidní sloučeniny (fytoalexiny) produkované hostitelskými buňkami (Hadley 1982). Jsou to především orchinol, hircinol a gastrodianin, které inhibují růst mykorrhizních i saprotrofních hub a mnoha bakterií.

1.2.3 Houby tvořící OM

Většina hub, které tvoří OM patří do polyfyletické skupiny saprotrofních hub *Rhizoctonia*, která náleží k oddělení *Basidiomycota*. Agregát *Rhizoctonia* se na základě morfologických znaků vegetativního mycelia dělí do několika anamorfních rodů *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* a *Moniliopsis* (Moore 1987, Gryndler a kol. 2004). Díky metodě spočívající v překrytí agarové kultury sterilizovanou zeminou se podařilo u některých jinak anamorfních rodů indukovat vývoj perfektního stadia (teleomorfa), což k nim umožnilo přiřadit i teleomorfní stadia: *Tulasnella* (anamorfa *Epulorhiza*), *Sebacina* (anamorfa *Epulorhiza*), *Ceratobasidium* (anamorfa *Ceratorhiza*), *Thanatephorus* (anamorfa *Moniliopsis*) a *Waitea* (anamorfa *Moniliopsis*) (Rasmussen 1995, Currah a kol. 1997, Gryndler a kol. 2004). Typickou vlastností těchto saprotrofních OM hub je jejich vysoká hydrolytická enzymová aktivita, zvláště celulólytická, pektinolytická a fenoloxidázová (Marchisio a kol. 1985), což vypovídá o jejich schopnosti použít jako zdroj uhlíku a energie širokou paletu organických látek.

Mezi dalšími houbami tvořící OM najdeme houby ektomykorhizní (ECM), patřící do oddělení *Basidiomycota* (např. rody *Cortinarius* a *Hymenogaster*) a několik rodů ektomykorhizních hub z oddělení *Ascomycota* (např. rody *Tuber* a *Wilcoxina*) (Bidartondo a kol. 2004, Selosse a kol. 2004). Většina mykoheterotrofních a mixotrofních druhů orchidejí se nachází právě v blízkosti ektomykorhiz a mnohdy je dokonce OM i ECM tvořena stejnou houbou. To umožňuje existenci tzv. epiparazitizmu, při kterém houba zprostředkovává přenos uhlíkatých látek z ECM hostitele směrem do orchideje (McKendrick a kol. 2000).

Mimo saprotrofní a ektomykorhizní houby se jako houboví partneři uplatňují dokonce i druhy hub, které jsou pro ostatní rostliny patogeny (např. *Rhizoctonia solani*).

Kromě hub tvořících OM se v kořenech vyskytuje i široké spektrum endofytických hub, které však nevytváří pelotony a jejich úloha v mykorhize nebyla ještě dobře prozkoumána (Currah a kol. 1990).

1.2.4 Specifita OM

Pojem specifita udává, jaké rozpětí druhů může do mykorhizní symbiózy vstoupit, tedy zda hostitelská rostlina může ve svých kořenech hostit jeden či více druhů symbiotických hub a naopak zda je jedna houba schopná kolonizovat kořeny jednoho či více druhů hostitelských rostlin (Gryndler a kol. 2004).

Znalosti o specifitě jsou získávány především pomocí izolace hub z kořenů a testů klíčivosti, při kterých se zjišťuje kompatibilita dané kombinace hostitele a symbionta (většinou v podmínkách *in vitro*). Přesto by se specifita měla ideálně testovat buď *in situ*, nebo *ex situ*, ale za podmínek srovnatelných s přírodními (Rasmussen 2002). Je totiž nutné rozlišovat mezi asociacemi v kontrolovaných laboratorních podmínkách, vypovídajících o fyziologické specifitě a asociacemi, které jsou možné za přírodních podmínek a vypovídají o specifitě ekologické (Zettler a kol. 2003). Některé orchideje vykazují za přírodních podmínek vyšší specifitu pro houbové partnery než při laboratorních experimentech (Perkins a McGee 1995, Rasmussen 2002).

Příkladem rozdílu mezi fyziologickou a ekologickou specifitou je schopnost druhu *Goodyera repens* vytvářet za laboratorních podmínek funkční mykorhizu s 8 z 32 použitých izolátů rhizoctonií, zatímco v přírodě se tento druh pojí pouze s *Rhizoctonia goodyerae-repentis* (Hadley 1970a). Ogura-Tsujita a Yukawa (2008) ve své práci prokázali ekologickou specifitu u druhu *Epipactis helleborine*, který v pobřežních oblastech vytváří OM s rodem *Wilcoxina*, zatímco ve vnitrozemí s rody *Tuber*, *Hydnotrya* nebo *Helvella*.

Obecně můžeme říct, že OM je stejně jako její specifita mnohotvárná a proměnlivá. Některé zelené fotosyntetické orchideje jsou proto méně specifické a pojí se s širším rozmezím druhů hub než nezelené orchideje, avšak toto pravidlo nelze plně zobecnit (McCormick a kol. 2004). Kupříkladu rod *Cypripedium* je převážně úzce specifický a tvoří OM především s čeledí *Tulasnellaceae*, ačkoli druh *Cypripedium californicum* tvoří OM navíc i s čeleděmi *Ceratobasidiaceae* a *Sebacinaceae* (Shefferson a kol. 2005). Specifita orchideje se může během jejího ontogenetického vývoje měnit a rostlina v průběhu různých fází svého vývoje může vystřídat mykobionta. To potvrzuje fakt, že v některých případech

izoláty hub z dospělých rostlin nestimulují klíčení, či vývoj protokormu a naopak (Smreciu a Currah 1989, Xu a kol. 1989).

1.2.5 Funkce OM

1.2.5.1 Mykotrofie

Pojem mykotrofie u OM znamená v pravém slova smyslu přenos uhlíkatých látek z houby do hostitele výhradně přes mykorhizní houbu (jinak mykoheterotrofie). U jiných typů mykorhiz bývá často nesprávně používán pro označení zvýšeného příjmu minerálních živin hostitelskými rostlinami.

Všichni zástupci orchidejí jsou alespoň v raných vývojových stádiích mykoheterotrofní (Gryndler a kol. 2004), ačkoli některé druhy se v dospělosti stávají autotrofními či mixotrofními. Mykoheterotrofní způsob výživy v raném vývojovém stádiu potvrzuje skutečnost, že orchideje produkují extrémně malá semena bez endospermu obsahující pouze nepatrné množství zásobních látek.

Díky dostatečnému rozvoji listů a tím i schopnosti syntetizovat organické sloučeniny, však některé druhy orchidejí přechází v dospělosti plně k autotrofnímu způsobu výživy. Například u druhu *Goodyera repens* bylo pomocí nerozpustných cukrů značených izotopem ¹⁴C přidaných do blízkosti mimokořenového mycelia zjištěno, že v průběhu ontogenetického vývoje ztrácí závislost na uhlíkatých látkách od OM houby (Alexander a Hadley 1985). Hadley a Pegg (1989) použili při studiu mykotrofie u druhu *Dactylorhiza purpurella* metodu spočívající v implikaci fungicidů a zjistili že organogeneze testovaných rostlin i navzdory fungicidnímu ošetření probíhala ve stejném měřítku jako u symbiotických rostlin. Druh *Dactylorhiza purpurella* tedy, stejně jako druh *Goodyera repens*, přešel k autotrofnímu způsobu výživy. Naproti tomu Bidartondo a kol. (2004) ve své práci uvádí, že ektomykorhizní rody *Epipactis* a *Cephalanthera*, získávají 14 - 36 % uhlíkatých látek od svého mykobionta, což není zanedbatelné množství a jejich výživu tak lze označit za mixotrofní.

Druhy s výrazně potlačenou listovou plochou, tedy nezelené orchideje, které ztratily schopnost fotosyntézy, označujeme za mykoheterotrofní a výhradním zdrojem uhlíku je pro ně mykobiont (Trudell a kol. 2003). U nás se vyskytují pouze tři zástupci: *Epipogium aphyllum* (sklenobýl bezlistý), *Limodorum abortivum* (hnědenec zvrhlý) a *Neottia nidus-avis* (hlístník hnězdák). Lze sem zařadit i druh *Corallorhiza trifida* (korálice trojklanná), který

ačkoli má chlorofyl, tak mykoheterotrofní způsob výživy značně převažuje (Cameron a kol. 2009).

1.2.5.2 Přenos látek mezi mykobiontem a orchidejí

Jedním z omezujících faktorů většiny orchidejí je skutečnost, že jejich kořenový systém je málo vyvinutý, což nepříznivě ovlivňuje dostatečný příjem vody a minerálních živin z půdy (Smith a Read 2008). Je totiž tvořen jen několika málo nebo vůbec nevětvenými kořeny. Svoji nevýhodu orchideje kompenzují prostřednictvím mimokořenového mycelia symbiotické houby, které tak přebírá sorpční úlohu kořene, zejména v sorpci dusíku a fosforu (Alexander a kol. 1984, Cameron a kol 2006, Cameron a kol 2007).

Při experimentech s radioaktivně značeným izotopem ^{32}P bylo prokázáno, že fosfor je u fotosynteticky aktivních orchidejí mimokořenovým myceliem přijímán a následně transportován do kořenových buněk a včleněn do vlastní biomasy hostitelské rostliny (Alexander a kol. 1984, Cameron a kol. 2007). V případě transportu dusíku prostřednictvím mimokořenového mycelia se za použití dvojité značeného glycinu došlo ke stejnému závěru (Cameron a kol. 2006).

Cameron a kol. (2006) pomocí radioaktivního izotopu ^{14}C potvrdili dlouho diskutovanou otázku přenosu uhlíku z hostitelské rostliny do OM houby. Jako první tak dokázali mutualistický vztah mezi zelenou orchidejí a houbou. Jako zdroj uhlíku využívají OM houby širokou škálu organických látek, především jsou to ale mono- a disacharidy, pektiny, celulóza a v čistých kulturách škrob (Hadley 1969). Některé produkují polyfenoloxidázy a jsou proto schopné jako zdroj uhlíku využívat i lignin (Marchisio a kol. 1985). Uhlík je poté orchideji předáván nejpravděpodobněji ve formě sacharidu trehalózy (Gryndler a kol. 2004).

Vlastní transport minerálních živin mezi hyfami houbového symbionta a kořenovými buňkami hostitelské rostliny dosud není zcela jasný. Předpokládá se však, že stejně jako v případě přenosu uhlíkatých látek jde buď o biotrofní přenos přes rozhraní hostitelské buňky a aktivního pelotonu, nebo o sorpci živin z pelotonů po jejich aktivním usmrcení hostitelskou rostlinou (Gryndler a kol. 2004).

Velice složitá a propracovaná média, která se používají k asymbiotickým výsevům *in vitro*, umožňují často jen v malé míře, nebo vůbec, klíčení semen nebo růst protokormů a semenáčů. Předpokládá se proto, že houby poskytují orchidejím i další látky, které v médiu

nejsou zahrnuty. Jsou to například vitaminy a růstové hormony (Smith a Read 2008). Avšak tyto možnosti nebyly dosud dostatečně prověřeny a vyžadují budoucí intenzivní výzkum.

2 Izolace, kultivace a identifikace OM hub

Většina poznatků o roli OM v mykorhizní symbióze je založena na kultivacích hub *in vitro*, které používají izoláty hub z pletiv orchidejí (např. Masuhara a Katsuya 1994, Currah a kol. 1997) a jejich následné identifikaci.

2.1 Izolace a kultivace OM hub

Endofyté orchidejí mohou být izolováni z protokormů, kořenů a v některých případech i z kolonizovaných částí oddenků nebo hlíz.

V případě kořene poznáme jeho kolonizované části podle nažloutlé až hnědé barvy nebo neprůhlednosti (Porrás-Alfaro a Bayman 2007). Živé pelotony pak najdeme především v mladých kořenech. Avšak kortikální buňky jsou často nerovnoměrně kolonizované, dlouhé a úzké. Výhodné je proto izolovat OM houby z protokormu a to z jeho bazální části, která je silně kolonizovaná a buňky docela velké. Mimoto izolací hub z protokormu získáme houby, u nichž máme větší jistotu jejich mykorhizní funkce, než u hub vyskytujících se v kořenech dospělých rostlin (Rasmussen 1995, Gryndler a kol. 2004). Avšak protokormy jsou za normálních okolností těžko dostupné.

Dalším možným způsobem a v dnešní době nejvíce prosazovaným je preparace jednotlivých pelotonů z kortikálních buněk, nebo-li přímá izolace OM hub (např. Athipunyakom a kol. 2004, Rasmussen 1995, Ochora a kol. 2001).

Prvním krokem izolace je povrchová sterilizace, která mimo různých kontaminantů odstraní i druhy endofytických rhizoctonií, které se běžně vyskytují v rhizosféře, ale neformují pelotony a jejich funkce pro orchideje není jasná (Masuhara a Katsuya 1994). Avšak jelikož je kořen absorpčním orgánem, riskuje se při jeho sterilizaci, že se kromě nežádoucích kontaminantů odstraní i žádoucí endofyty. Doba sterilizace a složení použitého sterilizačního roztoku proto často závisí na druhu orchideje. Nebo-li pro každý druh se musí optimalizovat (Salmia 1988).

Obecně se tedy při izolaci hub postupuje tak, že kořeny nebo případně protokormy se nejdříve promyjí v destilované vodě a pomocí jemného kartáčku se odstraní zbylé částice půdy. Poté se pomocí pinzety přenesou do sterilizačního roztoku, který obsahuje kapku smáčedla (Tween) a desinfekci jako je chlornan sodný (NaClO) o koncentraci 5,25 - 20 %

(Vujanovic a kol. 2000, Zelmer a kol. 1996) nebo peroxid (H_2O_2) o koncentraci 20 – 30 % (Girlanda a kol. 2006). V některých studiích se do sterilizačního roztoku přidává navíc 70 - 100 % ethanol (Sharma a kol. 2003). Za 1 - 5 min, v závislosti na koncentraci a druhu desinfekce, se sterilizované kořeny (protokormy) pinzetou přenesou do destilované vody, aby se smyly zbytky sterilizačního roztoku. Nyní se kořeny (protokormy) z vody přenesou na sterilní Petriho misku, kde se pomocí skalpelu nakrájí na tenké segmenty o velikosti cca 1 cm. Segmenty se přemístí pod stereomikroskop, kde se kontroluje přítomnost životaschopných pelotonů a za účelem zabránění kontaminace se skalpelem odstraňuje rhizodermální vrstva. V této fázi se mohou pomocí laboratorní jehly vypreparovat jednotlivé pelotony, které se poté pomocí mikropipety promyjí na sterilní Petriho misce sérií kapek sterilní vody a přenesou na Petriho misky s izolačním médiem (např. CM₁, FIM, MMN média^{*}) (Masuhara a Katsuya 1994, Rasmussen 1995, Athipunyakom a kol. 2004, Ochora a kol. 2001). Nebo se mohou na izolační médium přemístit celé segmenty kořene (protokormu) několikrát promyté v destilované vodě a jemně zanořit do jeho povrchu (Zelmer a kol. 1996, Vujanovic a kol. 2000, Sharma a kol. 2003).

Další možností izolace je metoda visutých kapek. Sterilizované kořeny (protokormy) se sterilně nařežou na velmi malé segmenty (cca 2 mm), posléze se několikrát promyjí v destilované vodě a jednotlivé segmenty se přenesou do pravidelně uspořádaných kapek vody nebo vhodného tekutého kultivačního média na převrácených víčkách Petriho misek. Poté jsou víčka přikryta miskami a opatrně převrácena. Následná inkubace probíhá ve vlhké komoře (Gryndler a kol. 2004). Výhodou tohoto způsobu izolace je, že kořenové segmenty se dají detailně prohlédnout pod mikroskopem a lze tak vyloučit případné kontaminace. Nekontaminované segmenty se poté přemístí na izolační médium a jemně zanoří do jeho povrchu.

Po určité době kultivace na izolačním médiu začnou z jednotlivých segmentů (pelotonů) postupně vyrůstat kolonie vláknitých hub, které se přeočkovávají na nové Petriho misky s médiem (nejčastěji PDA nebo OMA agar). Přeočkování probíhá tak, že se pomocí sterilního skalpelu v okrajové části každého mycelia (tedy v místě s růstovými špičkami jednotlivých hyf) vyřízne malá část média a přemístí doprostřed Petriho misky s médiem. Přeočkovávání se opakuje do té doby dokud se izoláty rostoucí na médiu morfologicky neodlišují, tedy dokud se nezíská čistá kultura (Masuhara a Katsuya 1994, Vujanovic a kol. 2000, Sharma a kol. 2003).

* Více k médiím v kap. 2.2 Kultivační média.

Aby se zabránilo při veškeré práci s izoláty kontaminaci používají se výhradně sterilizované nástroje, izolace se dělají za aseptických podmínek (nejlépe ve flow-boxu), používaná média se sterilizují autoklávováním (20 min při 121 °C a tlaku 118 kPa) a samotná kultivace probíhá v Petriho miskách utěsněných parafilmem.

2.1.1 Kultivační média

Kultivační média se navzájem liší v obsahu minerálních solí, zdroji sacharidů a přírodních extraktech. Jako zdroj rozpustných sacharidů může v médiích sloužit např. glukóza, manóza, arabinóza, galaktóza, xylóza a sacharóza (Holländer 1932). Přírodními extrakty jsou např. bramborový, kvasnicový, či kukuřičný extrakt. V případě definovaných médií se potřebné minerální soli a živiny přidávají do média v podobě chloridů (NaCl, CaCl₂) a draselných, sodných, hořečnatých a amonných solí (KH₂PO₄, NaNO₃, MgSO₄, (NH₄)₂HPO₄ a další). Nicméně některé druhy OM hub na definovaných médiích neprospívají. Vyžadují totiž ke svému růstu kyselinu listovou nebo kyselinu para-aminobenzoovou, které zastávají úlohu růstových faktorů (Hijner a Arditti 1973). Proto se do kultivačních médií často přidávají výše zmíněné přírodní extrakty, které zastávají úlohu zásobování OM houby amino kyselinami a potřebnými vitamíny (Stephen a Fung 1971, Dijk 1988).

Optimální hodnota pH média se v ideálním případě stanovuje podle ekologických nároků orchideje, ze které byly izoláty získány. Například izoláty získané z kalcifilních orchidejí a tedy rostoucích na zásaditých půdách neprospívají na médiích s nízkým pH (Burgeff 1936). Většina OM hub nicméně dobře roste při pH 6 - 8 (Rasmussen 1995).

Nejčastěji používaným kultivačním médiem a to jak pro izolaci, tak i kultivaci OM hub je nedefinované médium PDA (potato-dextrose agar; Porras-Alfaro a Bayman 2007), ve kterém prospívá většina druhů symbiotických hub, avšak pro některé ECM houby není vhodné. Často používaným izolačním médiem je definované médium CM₁ (Clements' isolation medium; modifikovali Rasmussen a kol. 1990a přidáním antibiotika novobiocin), které se při pH 7 používá pro evropské druhy OM hub (po upravení pH na 5,8 je vhodné i pro americké druhy). Dalším možným izolačním médiem je nedefinované médium FIM (fungal isolating medium, Clements a kol. 1986), které obsahuje kvasnicový extract a prospívají v něm evropské OM houby. Pro izolaci a kultivaci ECM druhů hub se používá MMN médium (modified Melin-Norkrans medium; Marx 1969), protože většina z nich roste lépe na chudších, definovaných médiích.

I přes všechny antiseptická opatření se u kultivačních médií musíme stále potýkat s možností kontaminace, což je také jeden z důvodů, proč se pro kultivaci symbiotických hub používají na živiny chudá média (především na dusík). Omezí se tak růst více agresivních druhů a symbiotické houby jsou schopné jim konkurovat (Hadley 1990). Další výhodou chudých médií je zpomalení mikrobiálního růstu. Častěji se však mikrobiálnímu růstu zabraňuje prostřednictvím antibiotik (Warcup a Talbot 1967, Rasmussen a kol. 1990a). Používanými antibiotiky jsou například streptomycin, novobiocin, ampicillin, tetracyklin a jejich kombinace (Warcup 1973, Vujanovic a kol. 2000, Athipunyakom a kol. 2004, Stewart a Kane 2007).

Pro dlouhodobé kultivace čistých kultur, nejde-li o ECM houby, se používají nedefinovaná média jako je PDA či OMA (oatmeal agar; Azmi a Seppelt 1997), která mají vyšší obsah živin než nedefinovaná média a kolonie OM hub se proto nemusí v důsledku vyčerpání živin tak často přeočkovávat.

2.1.2 Kultivační podmínky

Jelikož přirozeným prostředím symbiotických hub je půda, probíhá jejich kultivace vždy v nepřetržité tmě. Optimální teplota pro růst kultur rhizoctonií je okolo 25 °C (pokojová teplota) (Kaminski a Verma 1985).

2.2 Identifikace OM hub

Izoláty OM hub se určují podle znaků anamorfních stádií jako je ultrastruktura septálního póru, velikost a tvar moniloidních buněk a tvorba sklerocia nebo podle kolorimetrických testů na produkci enzymů (Currah a Sherburne 1992, Currah a kol. 1990, 1997). Ačkoli mycelia obecně nenesou mnoho rozlišovacích znaků, které by dovolovaly určení pod úroveň rodu (Rasmussen 2002), lze tímto způsobem získané izoláty rozdělit do morfotypů, které se poté přesněji určí pomocí analýzy DNA.

Klíčovým krokem při analýze DNA je jeho extrakce z kolonizovaného pletiva orchidejí, či čistých kultur izolovaných hub. Používaných metod je celá řada, v dnešní době se však nejčastěji používají komerční kity, jako je např. Qiagen DNeasy® extraction kit (Qiagen, Germany) (Hyuhn a kol. 2009). Jelikož množství získaného DNA bývá velmi malé, zvyšuje se citlivost detekčních metod pomocí polymerázové řetězcové reakci (PCR), v které se využívá tzv. multikopiových genů, primerů (Kjøller a Rosendahl 2000). Tato reakce cyklicky amplifikuje definované sekvence houbového genomu pro pozdější charakterizaci DNA

sekvenováním nebo fragmentací vzorku. Nejčastějším cílem amplifikace bývá úsek jaderné ribozomální DNA (nrDNA) zahrnující konzervativní úseky 18S, 5.8S a 28S a variabilní nekódující úseky ITS1 a ITS2. Nejčastěji používanými primery jsou ITS1-F (amplifikuje všechny Eumycota kromě některých klíčových zástupců rodu *Tulasnella*; Gardes a Bruns 1993), ITS1-OF a ITS4-OF (amplifikují všechny druhy Basidiomycet; Taylor a McCormick 2008), ITS4-Tul (amplifikuje druhy rodu *Tulasnella*; Taylor a McCormick 2008), ITS4-B (amplifikuje Basidiomycota kromě některých zástupců rodu *Tulasnella* a *Sebacina*; Gardes a Bruns 1993) a další. Často se používají kombinace primerů, čímž se zajistí, že PCR obsáhne větší počet druhů. Výsledný produkt PCR se osekvenuje a získané sekvence se poté porovnávají s databází GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>; Altshul a kol. 1997).

Tímto způsobem můžeme odhalit úplnou diverzitu OM hub, včetně těch, které se v důsledku svých nutričních požadavků nedají snadno vypěstovat v čisté kultuře. Avšak u DNA analýzy kolonizovaných pletiv se stejně jako u čistých kultur musíme potýkat s možností kontaminace, či přítomnosti endosymbiontů, které OM netvoří, čímž získáme zkreslené výsledky (Rasmussen 2002). Nejslibnější metodou se jeví analýzy DNA jednotlivých pelotonů získaných z živých nebo pomocí silikagelu vysušených buněk vnější kořenové kůry (Kristiansen a kol. 2001, Athipunyakom a kol. 2004).

Přesto by pro zpětné ověření, že se izoláty hub skutečně symbioticky pojí s daným druhem hostitelské orchideje, měly u všech výše zmíněných metod následovat testy klíčivosti. Ty se provádí pomocí *in vitro* symbiotické kultivace semen orchidejí spolu s předpokládaným druhem OM houby z čisté kultury.

3 Klíčení semen terestrických orchidejí *in vitro*

Aby semena orchidejí v přírodě vyklíčila požadují kromě vhodného provzdušnění, teploty a přístupu vody i další vhodné vnější podmínky. Jedním z nich je přítomnost vhodného endofyta, nebo nepřímým způsobem vhodný substrát, ve kterém daný endofyt žije (Rasmussen 1995).

Velký počet druhů terestrických orchidejí mírného pásu však klíčí v podmínkách *in vitro* velmi obtížně kvůli dormanci semen, která může být způsobena vysokým obsahem endogenní kyseliny abscisové (van der Kinderen 1987), nebo fyzikálními a chemickými vlastnostmi osetení a osvětlením. Různé příčiny dormance mohou být překonány určitým teplotním režimem, dlouhodobým smáčením, chemickým rozrušením osetení (skarifikace),

chemickými signály od OM houby nebo určitým světelným režimem (světlo/tma) (Rasmussen 1995).

Tyto požadavky semen a složení médií, které jsou nutné pro úspěšné vyklíčení semen *in vitro*, jsou závislé na skutečnosti, zda se semena nechávají klíčit symbioticky, či asymbioticky *in vitro*.

3.1 Skarifikace semen

Skarifikace semen se používá k odstranění inhibujících látek ze zralých semen terestrických orchidejí, které by jim jinak bránili v úspěšném generativním rozmnožení *in vitro* (Vejsadová 2006). Toho může být dosaženo prostřednictvím povrchové sterilizace semen, čímž se vymyje endogenní inhibitor klíčivosti, kyselina abscisová (ABA) (van der Kinderen 1987). Další pozitivní vliv povrchové sterilizace je rozpuštění suberinové bariéry embrya, které pak může snadněji přijímat vodu (Harvais a Hadley 1967).

S prodlužující se dobou sterilizace se procento klíčivosti postupně zvyšuje, dosahuje optima a poté se snižuje (van Waes 1984, van Waes a Debergh 1986a). Doba sterilizace, při které procento klíčivosti dosahuje optima se druh od druhu liší, ale je podobná u druhů stejného rodu (van Waes a Debergh 1986a). V praxi se většinou sterilizační roztok nechá na semena působit do té doby, dokud nedojde k jejich vybělení z hnědé do barvy „slonovinové kosti“ (Vejsadová 2006).

K rozrušení vodu odpuzujícího osemení se nejčastěji používají chlornany. Chlornan vápenatý ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), hlavní složka chlorového vápna, je zpravidla upřednostňován, protože po jeho aplikaci se dosahuje lepších výsledků než při použití chlornanu sodného (NaOCl), který často poškodí embryo (Rasmussen 1995, Vejsadová 2006). Hypochloridy jsou silně zásadité roztoky a oxidační činidla. Jiná oxidační činidla, jako například alkoholy, procento klíčivosti výrazně neovlivní. Nicméně jiné silné zásady jako hydroxid sodný (NaOH), klíčivost podporují (Eiberg 1970 in Rasmussen 1995). To značí, že je to právě zásaditost sterilizačního roztoku, která má pozitivní účinek na klíčivost.

NaOCl se používá v koncentracích mezi 0,2 % a 6 % (Purves a Hadley 1976, Dutra a kol. 2009). $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ se používá v přibližně stejném rozmezí koncentrací (van Waes 1984, van Waes and Debergh 1986a, Malmgren 1988). Avšak roztoky hypochloridů jsou nestabilní a sterilizační účinek se tak může snížit, jestliže je roztok připravený dlouhou dobu. Účinek roztoku může být také snížen, jestliže je na velký počet semen použit malý objem roztoku (Harvais 1980).

Přidáním detergentu do sterilizačního roztoku se zvýší kontakt mezi roztokem a nesmáčivým povrchem osemení. S dobrými výsledky je proto často ve sterilizačním roztoku pro semena orchidejí používán Tween (např. Tween 80) (Rasmussen 1995). Vlastní sterilizaci často předchází předošetření semen máčením v roztoku ethanolu o koncentracích 70 - 100 %, nebo se ethanol přidává přímo do sterilizačního roztoku, protože v některých případech se tak zvyšuje sterilizační účinek (Vejsadová 2006, Dutra a kol. 2009).

Po vlastní sterilizaci většinou následují testy životaschopnosti semen, pomocí kterých lze otestovat vliv skarifikace na semena. Nejčastěji používané barvivo je trifenylnitrazolium chlorid (TTC) (van Waes a Debergh 1986b). Ten je za normálních okolností bezbarvý, ale při kontaktu s embryem semene, je žijícími buňkami redukován na stabilní nerozpustné červeno-barevné sloučeniny. Další používané barvivo je fluorescein diacetát (FDA), který je v živých buňkách hydrolyzován a vzniká fluorescenční barvivo fluorescein (Rasmussen 1995).

Jestliže se před vlastní sterilizací semena předošetří roztokem kyseliny sírové (H_2SO_4) může se efekt skarifikace zvýšit. Kupříkladu Malmgren (1993) smočil semena v 0,5 - 2 % roztoku H_2SO_4 a zvýšil tak jejich klíčivost. Tímto způsobem lze zvýšit procento klíčivosti např. u druhů *Cypripedium calceolus*, *Orchis militaris*, *O. purpurea*, a *Anacamptis pyramidalis* (Rasmussen 1995).

Dlouhodobé smáčení semen v destilované vodě může mít v důsledku stejný efekt jako částečné rozložení osemení prostřednictvím skarifikace (Rasmussen 1995). Stejně jako v případě skarifikace totiž dojde ke zvýšení propustnosti osemení a vymytí inhibičních látek (ABA). Avšak tato metoda není v dnešní době široce používaná, protože smáčení, na rozdíl od skarifikace, se provádí několik měsíců a navíc neposkytuje uspokojivé výsledky.

3.2 Teplota

Jak rychlost, tak procento klíčivosti závisí na teplotě během kultivace. Pro většinu terestrických orchidejí je optimální teplota mezi 22 - 25 °C (Eiberg 1970 in Rasmussen 1995, van Waes a Debergh 1986a). U některých druhů jako např. *Cypripedium* spp. se však jejich teplotní optimum pohybuje pod 20 °C (Stoutamire 1974). Jestliže se semena nechají klíčit za teplot mimo jejich optimum, část jinak životaschopných semen nevyklíčí (Rasmussen 1990a). Některé nejnovější studie doporučují v průběhu klíčení slabé kolísání teplot, které odráží změny teplot během ročních období (Kauth a kol. 2010)

Některé druhy orchidejí však i za optimální teploty klíčí jen obtížně, nebo zůstávají dormantní. Pro překonání jejich dormance se při symbiotickém i asymbiotickém klíčení

používá stratifikace chladem, která spočívá v ponechání semen při teplotách blízko nule po dobu přesahující 8 týdnů (Øien a kol. 2008, Rasmussen 1995). Nicméně, aby byla stratifikace efektivní, je nutná předešlá kultivace spolu s vhodným mykobiontem (v případě symbiotického klíčení) za optimální teploty (Sharma a kol. 2003). To semenu umožní absorpci vody, kontakt s OM houbou a případné dozrání před zchlazením (Rasmussen 1992). Nastane tak podobná situace jako v přírodě, kdy orchideje mírného pásu na konci léta nebo na podzim uvolňují semena. Tedy v době, kdy jsou mykorhizní houby stále aktivní a mají k dispozici dostatek uhlíkatých látek (Leake 1994). Některé práce (např. van Waes a Debergh 1986a) uvádí stratifikaci jako neúčinnou, avšak neúspěch je většinou spojen s nesplněním výše uvedených podmínek, anebo přítomností nějakého jiného mechanismu dormance u daného druhu orchideje. Stratifikace je, jako součást ošetření semen před kultivací, doporučována např. u druhů *Epipactis palustris* (Rasmussen 1992), *Cypripedium reginae* (Ballard 1987), *Platanthera praeclara* (Sharma a kol. 2003) a *Dactylorhiza lapponica* (Øien a kol. 2008).

Příčina pozitivního fyziologického efektu stratifikace spočívá buď ve snížení hladiny endogenní kyseliny abscisové, nebo ve zvýšení obsahu endogenního cytokininu. Obojí totiž stimuluje klíčení (van Staden a kol. 1972). Vnější přidáním cytokininu při asymbiotické kultivaci *in vitro* proto může být stratifikace chladem, jako postup stimulující klíčení, zcela nebo částečně nahrazena (Web a Wareing 1972).

3.3 Světlo

Účinek světla na klíčivost terestrických orchidejí není plně prozkoumán a v mnoha studiích se při jeho zkoumání dosahuje rozdílných výsledků v závislosti na taxonomických rozdílech a na jejich přirozeném prostředí (Rasmussen 1995).

U severoamerických terestrických druhů bylo zjištěno, že druhy vyskytující se na vlhkých světlých lokalitách (např. rašeliniště) jsou méně citlivé na světlo než druhy rostoucí na sušších stinných lokalitách (Stoutamire 1974). Například druh *Habenaria macroceratitis*, který roste na stinných stanovištích, dosahoval nejvyšší klíčivosti v nepřetržité tmě (Stewart a Kane 2006), zatímco druh *Bletia purpurea*, rostoucí na světlých stanovištích, při světelném režimu 16/8 (světlo/tma) (Dutra a kol. 2008). Důvodem těchto rozdílů by mohlo být to, že druhy rostoucí na stinných stanovištích jsou vystaveny vyššímu množství světla o delších vlnových délkách (700 – 800 nm) (Rasmussen a Rasmussen 1991). Při vystavení semen

světlu o těchto vlnových délkách přejde fytochrom do základní formy (F_R) a zabrání tak klíčení (Kendrick 1976).

Závislost vlivu světelného režimu na taxonomické příslušnosti ukazuje například skutečnost, že u druhů *Calypso bulbosa* a *Epipactis gigantea* mělo světlo při klíčení negativní vliv, ale u druhu *Goodyera oblongifolia* se dosahovalo vysokého procenta klíčivosti jak za světla, tak za tmy (Arditti a kol. 1981). Zettler a McInnis (1994) uvádí, že u druhů *Platanthera integrilabia* a *Platanthera clavellata* může být klíčivost navýšena, jestliže se semena v počátku klíčení vystaví světlu a poté jsou po celou dobu klíčení ponechána v nepřetržité tmě.

Významnou roli hraje také intenzita světla, která negativně ovlivňuje procento klíčivosti. Bylo zjištěno, že při příliš vysoké intenzitě světla je klíčivost minimální, či žádná (Harvais a Hadley 1967, van Waes 1984). Nicméně u většiny terestrických orchidejí mírného pásu bylo zjištěno, že i při nízké intenzitě osvětlení se procento klíčivosti snižuje, nebo je dokonce nulové a doporučuje se tedy symbiotické i asymbiotické klíčení za nepřetržitě tmy (Harvais a Hadley 1967, Stoutamire 1974, van Waes a Debergh 1986a, Rasmussen 1990b, Znaniecka a Łojkowska 2004).

Vliv světla na klíčení semen orchidejí vyžaduje budoucí intenzivní výzkum, protože např. právě světelná kontaminace, ke které dojde při manipulaci se semeny vyžadující striktně nepřetržitou tmu, by mohl být jedním z faktorů, který způsobuje problémy s vyklíčením semen některých druhů (Rasmussen 1995).

3.4 Vliv CO_2 a etylenu v prostředí

Klíčení semen je aerobním dějem a stejně jako mykobiont vyžaduje přísun kyslíku (O_2). Zároveň jak klíčící semeno, tak mykobiont při dýchání produkují oxid uhličitý (CO_2). Následkem toho se při symbiotickém i asymbiotickém klíčení postupně snižuje obsah O_2 a zvyšuje obsah CO_2 v kultivačních nádobách (Rasmussen 1995).

V přírodě je množství CO_2 ve vzduchu nad povrchem půdy jen cca 0,03 %, zatímco u povrchu půdy cca 3 - 4 % (Stiles 1960) a v blízkosti půdních organismů, jako jsou OM houby může být ještě vyšší. Ačkoli o vlivu obsahu CO_2 v ovzduší na klíčení semen orchidejí je toho známo velice málo, lze předpokládat, že zvýšení úrovně CO_2 by mohlo být jedním ze signálů prostředí, který stimuluje klíčení (Rasmussen 1995). Některé práce uvádí, že dosáhly nejvyššího procenta klíčivosti v kultivačních nádobách, které byly hermeticky uzavřené, tedy v prostředí, kde se obsah CO_2 přirozeně zvyšuje (Nakamura 1962, McIntyre a kol. 1974).

Nakamura a kol. (1975) ve své práci uvádí, že nejlepšího procenta klíčivosti u druhu *Galeola septentrionalis* dosáhli při 8 % koncentraci CO₂ ve vzduchu.

Velké množství půdních hub včetně některých orchideoidních, jako jsou např. *Tulasnella calospora*, *Ceratobasidium cornigerum* (Hanke a Dollwet 1976), produkují etylen, což se projeví v jeho obsahu v půdě. Navíc nejvyšší koncentrace dosahuje etylen v půdě s vysokým obsahem organického materiálu (Smith a Dowdell 1974). Množství etylenu v půdním prostředí by proto mohl být dalším stimulačním signálem pro semena (Rasmussen 1995). Důkazem by mohl být fakt, že přidání etylenu do kultivačních misek u symbiotické i asymbiotické kultivace druhu *Dactylorhiza majalis*, mělo pozitivní vliv na klíčení (Johansen a Rasmussen 1992).

3.5 Klíčení nezralých semen

Ačkoli používání zralých semen při klíčení je obecně preferováno, použití nezralých semen je v některých případech výhodnější (Pedroso a Pais 1992, Znaniecka a Łojkowská 2004, Yamazaki a Miyoshi 2006).

Jednou z výhod je, že když používáme semena z neporušených nezralých semeníků, jsou tato semena sterilní (McKendrick 2000) a proto se sterilizuje pouze povrch semeníku a ne samotná semena. Pro sterilizaci semeníků se používají stejné sterilizační roztoky jako pro sterilizaci semen (kap. 3.1) (Kitsaki a kol. 2004, Znaniecka a Łojkowská 2004, Yamazaki a Miyoshi 2006). Pro zvýšení účinku sterilizace se mohou semeníky navíc ponořit do absolutního etanolu, zapálit a nechat dohořet (Znaniecka a Łojkowská 2004). Semeníky se poté v aseptických podmínkách rozřezávají skalpelem a semena se vysévají na kultivační médium. Nevýhodou je, že nezralá semena se na rozdíl od zralých nemohou skladovat a musí být proto vyseta rovnou (Kitsaki a kol. 2004).

Hlavním důvodem proč se v některých případech používají nezralá semena však je, že klíčení není vystaveno tlaku dormančních mechanismů, protože k fyziologickým změnám a akumulaci inhibičních látek (ABA, fenolová kyselina), které dormanci způsobují, dochází až při dozrávání (Rasmussen 1995, Kitsaki a kol. 2004, Yamazaki a Miyoshi 2006). Např. u druhů *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza majalis* a *Orchis morio* dosáhla Znaniecka a Łojkowská (2004) vyššího procenta klíčivosti u nezralých než u zralých semen. Stejného výsledku se dosáhlo i u jiných evropských druhů orchidejí: např. *Dactylorhiza maculata*, *D. incarnata*, *Gymnadenia conopsea*, *Platanthera* spp. (Borris 1969). Naproti tomu Kitsaki a kol. (2004) uvádí, že u 13 testovaných druhů rodu *Ophrys* byla klíčivost lepší u zralých

semen. Metoda je tedy účinná jen u některých druhů. Hlavní nevýhodou při použití nezralých semen je nutnost správného načasování sběru semeníků (Kitsaki a kol. 2004), protože optimální doba sběru se u jednotlivých druhů značně liší.

3.6 Kultivační média pro orchideje

Složení mnoha kultivačních substrátů bylo odvozeno pomocí empirických modifikací Knopova a Pfefferova roztoku minerálních solí (Rasmussen 1995). Obecně je v médiích používaných pro temperátní terestrické orchideje snížena koncentrace minerálních solí a zvýšen obsah organických sloučenin (Arditti 1982, van Waes and Debergh 1986a, Znaniecka a Łojkowska 2004). Při asymbiotické kultivaci se doporučuje použít komplexní organické sloučeniny obsahující vitamíny, růstové regulátory, a aminokyseliny (AK), čímž se v určité míře napodobí podmínky které při symbiotických kultivacích obstarává mykobiont (Rasmussen 1995).

Nicméně požadavky po minerálních živinách, sacharidech atd. během klíčení se mezi jednotlivými čeleděmi a druhy různí a často proto vyžaduje složení kultivačního substrátu větší či menší úpravy (Malmgren 1988). Některé druhy např. nevyklíčí bez vnějšího přísunu uhlovodíků, zatímco jiné vyklíčí i v čisté vodě (Rasmussen 1995).

Jedním z hlavních problémů při optimalizaci složení média je, že procento klíčivosti roste spolu se zvyšující se komplexností média a požadavky semen pro vyklíčení se liší i mezi jednotlivými semeny jednoho souboru. Určení příměsí média, které skutečně podporují klíčivost, je proto obtížné (Rasmussen 1995).

3.6.1 Sacharidy

Některé druhy terestrických orchidejí jsou schopné začít klíčit *in vitro* i na čistém agaru (Vermeulen 1947, Rasmussen 1995), ale většina druhů vyžaduje zdroj uhlíku ve formě sacharidů.

V asymbiotických kulturách musí být sacharidy přítomny ve formě, ve které je semena mohou přímo absorbovat, tedy ve formě rozpustných sacharidů (Harvais 1973, Rasmussen 1995). Nejpoužívanějšími jsou sacharóza, glukóza a fruktóza (Harvais 1973), které se do média přidávají v koncentracích 10 – 20 g/l (van Waes 1984, Malmgren 1989, Rasmussen 1995). V případě symbiotických kultur mohou semena vyklíčit i na médiích, kde jsou použité nerozpustné polysacharidy, jako je celulóza nebo škrob, protože jsou metabolizovány prostřednictvím houbového symbionta (Smith a Read 2008).

Avšak u velkého počtu sacharidů bylo zjištěno, že jsou pro orchideje jako zdroj uhlíku nepoužitelné a některé z nich, obzvláště galaktóza, mohou být dokonce toxické (Arditti 1967, Ernst a kol. 1971). Pro rozlišení mezi výživovými a osmotickými účinky použitých sacharidů bývá používán mannitol, protože většina druhů není schopná ho využít (Smith 1973, van Waes 1984, Rasmussen 1995).

3.6.2 Koncentrace iontů a struktura média

Populace orchidejí často v přírodě rostou v půdách s nízkým obsahem dostupných minerálních iontů (Fast 1985) a v umělých médiích používaných pro klíčení semen se vysoký vodní potenciál projevil jako výhodný.

Bylo zjištěno, že tradiční kultivační média pro tkáňové kultury jsou pro temperátní druhy orchidejí příliš koncentrovaná a měly by se 2 – 10 x naředit (van Waes 1984, Rasmussen 1995). Doporučuje se používat růstová média s koncentrací anorganických solí mezi 0,25 – 0,05 g/l (Fast 1978, van Waes 1984). Používáme-li však médium čistě na klíčení, může být úplná nepřítomnost minerálních solí výhodnější, protože se tak sníží osmotické efekty, které často v různé míře brání klíčení (Rasmussen 1995).

Při zkoumání vhodné struktury média, bylo zjištěno, že kapalně médium může u některých druhů zvýšit procento klíčivost (Rasmussen 1995). Avšak jakékoli mechanické narušení semen během klíčení (např. třepačkou, či při běžné kontrole semen), má negativní vliv. Použití kapalných médií se proto příliš nedoporučuje, protože jsou na vnější narušení náchylnější (Lindquist 1960). Východiskem je tak kompromis v podobě média s nízkým obsahem agaru, čímž se zajistí jak vysoký vodní potenciál, tak stabilita (Galunder 1984).

3.6.3 Dusíkaté sloučeniny

Půdy na přirozených lokalitách terestrických orchidejí jsou obvykle mimořádně chudé na anorganický dusík (Fast 1985), ale obsah humusu v nich může být až 30 % (Möller 1985), což značí vysoký obsah organického dusíku, který je přístupný půdním houbám. Dusík se do médií přidává ve formě v jaké se nachází i v přírodě, tedy v oxidované formě jako dusičnan (NO_3^-), nebo v redukované formě jako anorganické amonné soli (NH_4^+), nebo ve formě organických sloučenin (Rasmussen 1995).

Avšak jak už bylo řečeno výše o minerálních solích, vysoké koncentrace anorganického dusíku mohou mít negativní vliv na klíčení, či ho dokonce zamezovat úplně a často se tak nejvyššího procenta klíčivosti, zejména u temperátních druhů, dosahuje na

médiích úplně postrádajících anorganický dusík (van Waes 1984, van Waes a Debergh 1986a, Malmgren 1989, Rasmussen 1995). Většina druhů orchidejí se vyznačuje vyšší citlivostí na jeho oxidovanou formu (NO_3^-) než na redukovanou formu (NH_4^+), která je proto pro použití v médiích vhodnější (Malmgren 1996).

U asymbiotického klíčení *in vitro* se nejlepších výsledků dosahuje při použití organického dusíku (Fast 1980), protože dusík je v této formě méně snadno absorbován a tudíž se jeho vysoká koncentrace v médiu negativně neprojeví (van Waes 1984, Malmgren 1989, Rasmussen 1995). Stejný pozitivní vliv byl zjištěn i u symbiotického klíčení (Rasmussen 1995). Organický dusík se do média přidává v podobě kvasnicového extraktu, rostlinných extraktů, peptonu, nebo v podobě čistých aminokyselin, jako je např. serin, glutamin (van Waes a Debergh 1986b).

3.6.4 Další ionty

Vápenaté ionty (Ca^{2+}) jsou známé svým vlivem na vlastnosti buněčných membrám a reakcemi s různými růstovými regulátory, obzvláště cytokininem (George a kol. 1988), avšak o jejich vlivu na klíčení je toho známo jen velice málo. Většinou jsou Ca^{2+} ionty v médiu přítomny jako vedlejší prvek některých komplexních složek, nebo jsou v malém množství neúmyslně zahrnuty ve vodě (Rasmussen 1995). V případě kalcifilních druhů orchidejí se často přidávají do média ve formě rozpustných solí ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Arditti a Ernst 1993). Nicméně bylo zjištěno, že mnoho druhů a to i kalcifilních, prospívá na médiích s nízkým obsahem Ca^{2+} (1,4 - 3,2 mmol/l) a při vysoké koncentraci (40 mmol/l) dochází ke snížení procenta klíčivosti (Rasmussen 1995, Niemann 2007).

Draselné ionty (K^+) se často při klíčení projeví stimulačně. Kupříkladu když se semena před vlastním vysetím máchají v roztoku chloridu draselného (KCl), dosáhne se vyššího procenta klíčivosti (Nakamura 1962). Do média se draselné ionty přidávají ve formě rozpustných solí (KH_2PO_4 , KNO_3 , KCl) (Arditti a Ernst 1993). Jedno z možných vysvětlení pozitivního vlivu K^+ iontů spočívá v jejich roli kofaktoru při syntéze škrobu během klíčení semene (Rasmussen 1995).

Dále se do kultivačních médií přidávají další různé ionty jako např. Mg^{2+} , Fe^{2+} a Fe^{3+} . Avšak účinek jednotlivých iontů se těžko odhaduje, jelikož se u různých druhů liší, a protože se nedá změnit koncentrace jednoho iontu, bez změny koncentrace některého jiného iontu za zachování pH a osmolarity (Rasmussen 1995).

3.6.5 pH

Většina kultivačních médií je spíše kyselých, ale média s neutrálním nebo lehce zásaditým pH lépe odpovídají přirozeným podmínkám většiny evropských druhů orchidejí (Rasmussen 1995). Kupříkladu u severoamerických druhů orchidejí se nejlepších výsledků klíčení dosahuje při pH 5 - 6 (Diez 2007), zatímco u evropských převážně calcifilních druhů se doporučuje pH 7 - 8 (Rasmussen 1995).

Problémem při stanovování pH média je, že se pH nejprve v průběhu autoklávování a poté v průběhu kultivace, v důsledku selektivního vychytávání iontů (Vacin a Went 1949, Sideris 1950) a slabé pufrovací kapacity některých médií, mění (Arditti 1967, Rasmussen 1995). Např. jestliže kultivovaný druh přijímá NH_4^+ , vylučuje H^+ a pH se tak snižuje. Naproti tomu při příjmu NO_3^- , vylučuje OH^- , čímž se pH zvyšuje (George a kol. 1988). Tento problém vedl k vyvinutí pufrovaných médií, založených na směsi zásaditých a kyselých fosfátů (Burgeff 1936, Vacin a Went 1949, Malmgren 1989).

Aktivované uhlí může také v určité míře stabilizovat pH a tím zvýšit procento klíčivosti na jednoduchých a zředěných médiích (Fast 1980). Avšak u více komplexních médií naopak aktivované uhlí procento klíčivosti snižuje (van Waes 1987), což souvisí s jeho adsorpční schopností, protože pohlcuje složky média, které mají stimulační účinek na klíčení (Rasmussen 1995).

3.6.6 Fytohormony

O vlivu fytohormonů na klíčení je známo velmi málo informací a v mnoha pracích se dosahuje rozporuplných výsledků. Arditti (1979) uvádí, že neprůkazné a rozporuplné výsledky mohou být zapříčiněny interakcemi mezi různými hormony, odlišnými nároky jednotlivých druhů, použitím různých forem jednotlivých hormonů, odlišnými kultivačními podmínkami a odlišnými rozsahy použitých koncentrací.

3.6.6.1 Cytokininy

Cytokininy jako benzyladenin (BA) a kinetin (KIN) jsou nejdůležitější růstové regulátory ovlivňující klíčení terestrických orchidejí (Harvais 1982). Avšak mnohé druhy orchidejí reagují na jejich přítomnost v médiu různě (van Waes a Debergh 1986a). Kupříkladu u druhů *Cypripedium calceolus*, *C. reginae* a *Epipactis helleborine* se cytokininy projeví při klíčení pozitivně, ale u druhů *Dactylorhiza maculata* a *Listera ovata* se tato tendence

neprojevila (van Waes a Debergh 1986a). Hadley (1970b) ve své práci uvádí, že KIN měl negativní vliv na klíčení druhu *Dactylorhiza maculata*, ale zlepšil následný růst semenáčů. Většina druhů, na které působí cytokininy stimulačně, jsou zároveň druhy, u kterých se kladnými účinky projevila stratifikace chladem. Možným vysvětlením je, že exogenní cytokininy vyvolávají podobné reakce jako ty, které přináší stratifikace chladem a dochází tak k potlačení účinku ABA (Web a Wareing 1972, Rasmussen 1995).

3.6.6.2 Auxiny

Nejpoužívanějšími auxiny v kultivačních médiích jsou kyseliny indolyloctová (IAA), indolylmáselná a naftyloctová (NAA) (Arditti a Ernst 1993). Při výzkumu vlivů auxinů na klíčení pomocí výše zmíněných auxinů, nebyl u devíti druhů terestrických orchidejí zjištěn významný rozdíl v klíčivosti oproti kontrole bez auxinů (van Waes 1984), vyjma některých případů, které jeví mírné snížení klíčivosti. Naproti tomu např. u druhu *Orchis mascula* se NAA v koncentraci 2 mg/l projevilo významným zvýšením klíčivosti (Borris a Voigt 1986) a stejně tak u druhu *Pterostylis vittata* v případě IAA v koncentraci 5 mg/l při symbiotickém klíčení (Wilkinson a kol. 1994). Vliv auxinů na klíčení byl také dokázán u druhu *Dactylorhiza maculata*, kdy se po přidání trijodbenzoové kyseliny, která je inhibitorem auxinů, výrazně snížila klíčivost (Eiberg 1970 in Rasmussen 1995).

3.6.6.3 Gibereliny

U giberelinové kyseliny (GA) nebyl dosud prokázán žádný pozitivní vliv na klíčení semen. Bylo pouze prokázáno snížení klíčivosti u druhů *Dactylorhiza maculata* a *Listera ovata* (van Waes a Debergh 1986a) a při symbiotickém klíčení druhu *Pterostylis vittata* (Wilkinson a kol. 1994) a žádný vliv u druhů *Cypripedium calceolus*, *Epipactis helleborine* (van Waes a Debergh 1986a), *Orchis mascula* (Borris a Voigt 1986) a *O. purpurella* (Hadley a Harvais 1968).

3.6.6.4 Kyselina abscisová

Obsah exogenní kyseliny abscisové (ABA) v médiu má značný inhibiční vliv na klíčení. Van Waes (1984) ve své práci uvádí, že ABA již při koncentraci 10^{-7} M snížila procento klíčivosti na polovinu a při koncentraci 10^{-6} M byla klíčivost dokonce nulová.

3.6.7 Vitamíny

Vitamíny skupiny B, zejména thiamin, niacin, pyridoxin a biotin jsou častou složkou kultivačních médií (Arditti a Ernst 1993) a hrají důležitou roli při vývoji semenáčů (Fast 1978), avšak jejich role při vlastním klíčení není zcela jasná (Rasmussen 1995). Kupříkladu peptony a kvasnicový extrakt, časté složky kultivačních médií, obsahující vitamíny skupiny B, obzvláště ve formě niacinu (Arditti 1982), vykazují pozitivní vliv na klíčení druhů *Galeola septentrionalis*, *Cypripedium calceolus* a *Anacamptis pyramidalis*. Nicméně kvasnicový extrakt je mnohdy upřednostňován, protože má vyšší obsah vitamínů a obsahuje také aminokyseliny a značné množství fosforu (Arditti 1982).

3.6.8 Další používané doplňky médií

Často a mnohdy s dobrými výsledky jsou do kultivačních médií přidávány ovocné šťávy a řada dalších organických roztoků. Nicméně, stejně jako u kvasnicového extraktu, peptonů a jiných komplexních složek médií, mají tyto doplňky značně proměnlivé složení a nedá se přesně určit jejich chemické složení. Je proto takřka nemožné přesně určit příčinu pozitivního účinku na klíčení, či připravit opakovaně médium se stejnými vlastnostmi, jsou-li v něm tyto složky zahrnuty (Rasmussen 1995). Obecně jsou však tyto roztoky kyselé a obsahují rozpustné sacharidy, aminokyseliny, vitamíny a různé fytohormony (Lucke 1977). Nejčastěji používanými jsou ananasová šťáva, kokosové mléko a bramborový extrakt (Arditti a Ernst 1993).

Kupříkladu ananasová šťáva je s velmi dobrými výsledky používána v kultivačních médiích pro evropské orchideje (Malmgren 1989). Má silné redukční účinky a v kulturách proto snižuje produkci fenolových exudátů (Rasmussen 1995). Další možností jak snížit obsah fenolů v médiu, je použití aktivního uhlí nebo antioxidantů (van Waes 1987, Rasmussen 1995).

V případech kdy kultivační médium není možné sterilizovat pomocí autoklávování, přidávají se do média látky s baktericidními či fungicidními účinky (kap. 2.1.1) (Arditti a Ernst 1993). Např. Plant Preservative Mixture (PPM; www.ppm4plant-tc.com), směs která dočasně potlačuje bakteriální a houbové kontaminace, je použitelná v asymbiotických kulturách. Avšak použití PPM ke sterilizaci média je ve srovnání s autoklávováním značně diskutabilní (Kauth a kol. 2008).

3.6.9 Příprava kultivačního média

Média mohou být připravena buď z jednotlivých složek média, nebo ze zakoupené práškové formy od dodavatele (McKendrick 2000). Obecně se při přípravě média postupuje následovně (Arditti 1982, Arditti a Ernst 1993):

1. Přidá se správný objem jednotlivých tepelně odolných složek média do 250 ml destilované vody (jako poslední se přidávají komplexní složky [např. kvasnicový extrakt], jsou-li součástí média).
2. Objem roztoku se destilovanou vodou doplní do 900 ml.
3. pH se v případě potřeby upraví např. pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného (NaOH) a 1 M roztoku kyseliny octové (CH₃COOH).
4. Přidá se potřebné množství daného sacharidu.
5. Objem roztoku se destilovanou vodou doplní do 1 litru.
6. V případě pevných médií se do vroucího roztoku přidá agar.
7. Roztok média se autoklávuje
8. Během autoklárování se připraví tepelně citlivé složky média, jako jsou hormony, vitamíny, aminokyseliny atd., rozpustí v 70 % etanolu a smíchají v Erlenmayerově baňce třepáním.
9. Po autoklárování se do stále horkého roztoku média nalijí tepelně citlivé složky.
10. Před vychladnutím se médium nalije do Petriho misek.

3.7 Asymbiotické klíčení *in vitro*

Při asymbiotickém klíčení *in vitro*, tedy bez přítomnosti mykobionta, zásobuje semeno všemi potřebnými živinami, sacharidy atd. kultivační médium, čímž nahrazuje roli OM houby. Z toho důvodu jsou média používaná při asymbiotickém klíčení komplexnější než ty, používaná při symbiotickém klíčení. Za účelem dosažení co nelepších výsledků při klíčení a následném růstu jsou asymbiotická média často různě upravována v závislosti na požadavcích jednotlivých druhů.

Často používanými médii jsou např. KC (Knudson C; Knudson 1946) a různé jeho modifikace, MM (Malmgren Modified Terrestrial Orchid Medium; Malmgren 1996), P723 (PhytoTechnology Orchid Seed Sowing Medium), MS (Murashige and Skoog; Murashige and Skoog 1962), VW (Vacin and Went Modified Orchid Medium; Vacin and Went 1949).

Asymbiotické klíčení semen orchidejí je velmi efektivní způsob při produkci rostlin a za účelem zachování ohrožených druhů orchidejí byla proto vyvinuta řada účinných

kultivačních protokolů (van Waes a Debergh 1987, Dutra a kol. 2008, Dutra a kol. 2009). Naneštěstí mnoho temperátních druhů terestrických orchidejí klíčí asymbioticky velmi obtížně a vyžadují speciální média a kultivační podmínky (Rasmussen 1995).

3.8 Symbiotické klíčení *in vitro*

Během symbiotického klíčení *in vitro* se na rozdíl od asymbiotického klíčení *in vitro* tvoří mykorhizní symbióza a klíčící semeno je tedy, jak už bylo řečeno dříve, zásobeno prostřednictvím svého mykobionta potřebnými živinami, sacharidy atd.

Média používaná pro symbiotické klíčení semen orchidejí *in vitro* jsou vytvořena tak, aby zásobovala symbiotickou houbu nezbytnými živinami pro růst a vývoj (kap. 2.1.1) a oproti asymbiotickým médiím mají proto relativně jednoduché složení. Nejzákladnějším médiem pro symbiotické klíčení je OMA (oatmeal agar; Azmi a Seppelt 1997).

Při symbiotickém klíčení se semena vysévají buď přímo na kultivační médium, anebo se nejdříve vysévají na pás filtračního papíru, který je poté umístěn na kultivační médium (Athipunyakom a kol. 2004). Symbiotická houba rostoucí v čisté kultuře se na kultivační médium s vysetými semeny přenese tak, že se v okrajové části rostoucího mycelia vyřízne cca 1 cm³ agarového bloku a přenese na Petriho misku s vysetými semeny.

Symbiotické klíčení *in vitro* se nejčastěji používá k ověření kompatibility mezi určitým druhem orchideje a izolovanými druhy hub (Clements a kol. 1986). Při ověřování kompatibility se mohou použít buď izoláty z právě testovaného druhu orchideje (Stewart a Kane 2007), či izoláty z jiných druhů orchidejí (Clements a kol. 1986). Jestliže tedy semena určitého druhu orchideje s předem izolovaným a kultivovaným druhem houby vyklíčí a dostanou se do stádia protokormu, lze říci, že daná houba může být mykobiontem zkoumaného druhu orchideje a vytvářet s ním funkční mykorhizu.

4 Závěr

V dnešní době je stále *in vitro* klíčení mnoha druhů temperátních orchidejí velmi obtížné, nebo dokonce nemožné. Do budoucna bude proto potřeba lépe prozkoumat příčiny dormance orchideoidních semen a vyvodit tak pro jednotlivé druhy účinné postupy pomocí kterých bude dormance překonána. Dále bude třeba lépe prošetřit spektrum látek, které mykobiont poskytuje klíčícímu semenu a ze získaných informací pro jednotlivé druhy odvodit takové složení kultivačního média, které by umožňovalo co největší procento klíčivosti.

5 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.
- Alexander C., Alexander I.J., Hadley G. (1984). Phosphate uptake by *Goodeyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 97: 401-411.
- Altshul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang Z., Zheng 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. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review* 33: 1-97.
- Arditti J. (1979). Aspects of the physiology of orchids. In: Woolhouse H.W. (ed), *Advances in botanical research*, Vol. 7. Academic Press, London, pp. 421-655.
- Arditti J. (1982). Introduction, North American Terrestrial Orchids, etc. In: Arditti J. (ed), *Orchid biology II. Reviews and perspectives. Orchid seed germination and seedling culture – a manual*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 245-273, 278-293.
- Arditti J. & Ernst R. (1993). *Micropropagation of orchids*. Wiley, New York.
- Arditti J., Michaud J.D., Oliva A.P. (1981). Seed germination of North America orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera*. *Botanical Gazette* 142: 442-453.
- Athipunyakom P., Manoch L., Piluek Ch., Artjariyasripong S., Tragulrung S. (2004). Mycorrhizal fungi from *Spathoglottis plicata* and the use of these fungi to germinate seed of *S. plicata in vitro*. *Kasetsart (Natural Sciences)* 37: 83-93
- Azmi O.R. & Seppelt R.D. (1997). Fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture media on the growth of selected microfungi. *Polar Biology* 18: 128-134.
- Ballard W.W. (1987). Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds. *American Orchid Society Bulletin* 56: 935-946.
- 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.
- Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T.D., Read D.J. (2004). Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liasons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society B* 271: 1799-1806.

- Blakemann J.P., Mokahel M.A., Hadley G. (1976). Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorms. *New Phytologist* 77: 697-704.
- Borris H. (1969). Samenvermehrung und Anzucht europäischer Erdorchideen. In: *Proceedings of the 2nd European Orchid Congress*. Paris, pp. 74-78.
- Borris H. & Voigt T. (1986). Symbiotische und asymbiotische Samenkeimung von *Orchis mascula* – Ein Beitrag zum Problem der Spezifität der Orchideenpilze. *Die Orchidee* 37: 222-226.
- Brundrett M. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant soil* 320: 37-77.
- Burgeff H. (1936). *Samenkeimung der Orchideen*. Gustav Fischer, Jena.
- 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.
- Cameron D.D., Johnson I., Leake J.R. (2007). Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany* 99: 831-834.
- Cameron DD, Preiss K, Gebauer G, Read DJ (2009) The chlorophyll-containing orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through photosynthesis. *New Phytologist* 183: 358-364.
- Clements M.A., Muir H, Cribb P.J. (1986). A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin* 41: 437-445.
- Currah R.S & Sherburne R. (1992). Septal ultrastructure of some fungal endophytes from boreal orchid mycorrhizas. *Mycological Research* 96: 583-587.
- Currah R.S., Smreciu E.A., Hambleton S. (1990). Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 68: 1171-1181.
- Currah R.S., Zelmer C.D., Hambleton S., Richardson K.A. (1997). Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J. and Pridgeon A.M. (eds), *Orchid Biology: reviews and perspectives VII*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-170.
- Diez J.M. (2007). Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology* 95: 159-170.
- Dijk E. (1988). Mykorrhizen der Orchideen. II. Die Pilze. *Die Orchidee* 39: 116-120.

- Dutra D., Kane M.E., Richardson L. (2009). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for a endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96: 235-243.
- Dutra D., Johnson T.R., Kauth P.J., Stewart S.L., Kane M.E., Richardson L. (2008). Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development and greenhouse acclimatization of threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94: 11-21.
- Ernst R., Arditti J., Healey P.L. (1971). Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *American Journal of Botany* 58: 827-835.
- Fast G. (1978). Über das Keimverhalten europäischer Erdorchideen bei asymbiotischer Aussat. *Die Orchidee* 29: 270-274.
- Fast G. (1980). Vermehrung und Anzucht. In: Fast G. (ed), *Orchideen kultur. Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen*. Ulmer, Stuttgart, pp. 207-223.
- Fast G. (1985). Zur Ökologie einiger mitteleuropäischer Waldorchideen unter besonderer Berücksichtigung der Boden verhältnisse in Bayern. *Die Orchidee* 36: 148-152.
- Galunder R. (1984). Persönliche Erfahrungen bei der asymbiotischen Aussat mit unterschiedlichen Agar-Agar-Mengen. *Die Orchidee* 35: 224-226.
- Gardes M. & Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- George E.F., Puttock D.J.M., George H.J. (1988). *Plant culture media. 2. Commentary and analysis*. Exegetics Ltd., Westbury, Edington, England.
- Girlanda M., Selosse M.A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., Loreto F., Cozzolino F., Perotto S. (2006). Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* 15: 491-504.
- Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J., Vosátka M. (2004). *Mycorrhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin*. Academia Praha, ČR
- Hadley G. (1969). Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 68: 933-939.
- Hadley G. (1970a). Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 69: 1015-1023.
- Hadley G. (1970b). The interaction of kinetin, auxin and other factors in the development of north temperate orchids. *New Phytologist* 69: 549-555.
- Hadley G. (1982). Orchid mycorrhiza In: Arditti J. (ed), *Orchid Biology: Review and perspectives II*, Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 83-118.

- Hadley G. (1990). The role of mycorrhizae in orchid propagation. In: Sawyers C.E. (ed), North American native terrestrial orchid propagation and production. Brandywine Conservancy, Pennsylvania, Chadds Ford, pp. 15-24.
- Hadley G. & Harvais G. (1968). The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytologist* 67: 441-445.
- Hadley G. & Pegg G.F. (1989). Host-fungus relationships in orchid mycorrhizal systems. In: Pritchard H.W. (ed), *Modern methods in orchid conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 51-71.
- Hanke M. & Dollwet H.H.A. (1976). The production of ethylene by certain soil fungi. *Science of Biology Journal, Stillwater* 2: 227-230.
- Harley J.L. & Harley E.L. (1987). A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* 105: 1-102.
- Harvais G. (1973). Growth requirements and development of *Cymbidium reginae* in axenic culture. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 51: 327-332.
- Harvais G. (1980). Scientific notes on a *Cypripedium reginae* of northwestern Ontario, Canada. *American Orchid Society Bulletin* 49: 237-244.
- Harvais G. (1982). An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique* 60: 2547-2556.
- Harvais G. & Hadley G. (1967). The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultured. *New Phytologist* 66: 217-230.
- Hijner J.A. & Arditti J. (1973). Orchid mycorrhiza: vitamin production and requirements by the symbionts. *American Journal of Botany* 60: 829-835.
- Holländer S. (1932). Ernährungsphysiologische untersuchungen an wurzelpilzen saprophytisch lebender orchideen. Dissertation Julius-Maximilian-Universität, Würzburg.
- Hyuhn T.T., Thomson R., Mclean C.B., Lawrie A.C. (2009). Functional and genetic diversity of mycorrhizal fungi from single plants of *Caladenia formosa* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 104: 757-765.
- Johansen B. & Rasmussen H.N. (1992). *Ex situ* conservation of orchids. *Opera Botanica* 113: 43-48.
- Kaminski D.A. & Verma P.R. (1985). Cultural characteristics, virulence, and *in vitro* temperature effect on mycelial growth of *Rhizoctonia* isolates from rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7: 256-261.
- Kauth P.J., Kane M.E., Vendrame W.A. (2010). Comparative *in vitro* germination ecology of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae) across its geographic range. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 46: 91-102.

- Kauth P.J., Johnson T.R., Stewart S.L., Kane M.E. (2008). A classroom exercise in hand pollination and *in vitro* asymbiotic orchid seed germination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 93: 223-230.
- Kendrick R.E. (1976). Photocontrol of seed germination. *Science Progress* 63: 347-363.
- Kitsaki C.K., Zygouraki S., Ziobora M., Kintzios S. (2004). *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 23: 284-290.
- Kjøller R. & Rosendahl S. (2000). Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single strand conformation polymorphism). *Plant and Soil* 226: 189-196.
- Knudson L. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73: 1-25.
- Korhoň R. (2003). Prezentace endomykorhizních hub jako jeden z biologických indikátorů kvality orných půd. Diplomová práce, Brno: MZLU, Fakulta agronomická, Ústav půdoznalství a mikrobiologie.
- Kristiansen K.A., Taylor D.L., Kjøller R., Rasmussen H.N., Rosendahl S. (2001). Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *Molecular Ecology* 10: 2089-2093.
- Leake J.R. (1994). Tansley Review No.69. The Biology of Myco-Heterotrophic („Saprophytic“) Plants. *New Phytologist* 127: 171-216.
- Lindquist B. (1960). The raising of *Disa uniflora* seedlings in Gothenburg. In: Synge P.M. (ed), Proceedings of the 3rd World Orchid Conference 1960. Royal Horticultural Society, London, pp. 207-211.
- Lucke E. (1977). Naturstoffzusätze bei der asymbiotischen Samenvermehrung der Orchideen *in vitro*. *Die Orchidee* 28: 185-191.
- Malmgren S. (1988). Fröförökning av *Dactylorhiza* i stor skala – en kort manual. *Svensk Botanisk Tidskrift* 82: 61-166.
- Malmgren S. (1989). Asymbiotisk förökning från frö av guckusko, flugblomster, brunkulla och några andra svenska orkidéarter. *Svensk Botanisk Tidskrift* 83: 347-354.
- Malmgren S. (1993). Asymbiotisk fröförökning i stor skala av *Anacamptis*, *Ophrys*, *Orchis* och andra orkidéer med runda rotknölar. *Svensk Botanisk Tidskrift* 87: 221-234.
- Malmgren S. (1996). Orchid propagation: Theory and practice. In: Allen C. (ed), North American native terrestrial orchids propagation and production. North American native terrestrial orchid conference, Germantown, Maryland, pp. 63-71.

- Marchisio V.P., Berta G., Fontana V., Marzetti M.F. (1985). Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology caryology ultrastructure and cytochemical characterization. *New Phytologist* 100: 623-641.
- Marx D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Masuhara G. & Katsuya K. (1994). *In situ* and *in vitro* specificity Between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstien) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist* 127: 711-718.
- McCormick M.K., Whigham D.F., O'Neill J.P. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163: 823-832.
- McIntyre D.K., Veitch G.J., Wrigley J.W. (1974). Australian terrestrial orchids from seed. II. Improvements in techniques and further successes. *American Orchid Society Bulletin* 43: 52-53.
- McKendrick S. (2000). *In vitro* germination of orchids: a manual. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- McKendrick S.L., Leake J.R., 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.
- Moore R.T. (1987). The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* sp. nov., *Epulorhiza* sp. nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 29: 91-99.
- Möller O. (1985). Die Mineralsalze Standortböden der europäischer Orchideen. *Die Orchidee* 36: 118-121.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Nakamura S.I. (1962). Zur Samenkeimung einer chlorophyllfreien Erdorchidee *Galeola septentrionalis* Reichb. f. *Zeitschrift für Botanik* 50: 487-497.
- Nakamura S.I., Uchida T., Hamada M. (1975). Atmospheric conditions controlling the seed germination of an achlorophyllous orchid, *Galeola septentrionalis*. *Botanical Magazine Tokyo* 88: 103-109.
- Niemann D. (2007). I. The effects of various media on the germination and development of several North American native orchids. *North American Native Orchid Journal* 13: 85-105.
- Ogura-Tsujita Y. & Yukawa T. (2008). *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan. *Mycorrhiza* 18: 331-338.

- Ochora J., Stock W.D., Linder H.P., Newton L.E (2001). Symbiotic seed germination in twelve Kenyan orchid species. *Systematics and Geography of Plants* 71: 585-596.
- Øien D-I, O'Neill J.P., Whigham D.F., McCormick M.K. (2008). Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid *Dactylorhiza lapponica* (Orchidaceae). *Annales Botanici Fennici* 45: 161-172.
- Pedroso M.C. & Pais M.S. (1992). Minituber production from immature seed suspension culture of *Orchis papilionacea*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 28: 183-186.
- Perking A.J. & McGee P.A. (1995). Distribution of the orchid mycorrhizal fungus *Rhizoctonia solani*, in relation to its host, *Pterostylis acuminata*, in the field. *Australian Journal of Botany* 43: 565-575.
- Porrás-Alfaro A. & Bayman P. (2007). Mycorrhizal fungi of Vanilla: diversity, specificity and effect on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99: 510-525.
- Purves S. & Hadley G. (1976). The physiology of symbiosis in *Goodyera repens*, *New Phytologist* 77: 689-696.
- Rasmussen H.N. (1992). Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum* 86: 161-170.
- Rasmussen H.N. (1995). *Terrestrial orchid: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rasmussen H.N. (2002). Recent developments in study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149-163.
- Rasmussen H.N. & Rasmussen F.N. (1991). Climatic and seasonal regulation of seed plant establishment in *Dactylorhiza majalis* inferred from symbiotic experiments *in vitro*. *Lindleyana* 6: 221-227.
- Rasmussen H.N., Andersen T.F., Johansen B. (1990a). Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell and Environment* 13: 171-177.
- Rasmussen H.N., Andersen T.F., Johansen B. (1990b). Light stimulation and darkness requirement for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis in vitro*. *Physiologia Plantarum* 79: 226-230.
- Salmia A. (1988). Endomycorrhizal fungus in chlorophyll-free and green forms of the terrestrial orchid *Epipactis helleborine*. *Karstenia* 28: 3-18.
- Selosse M.-A., Faccio A., Sappatucci G., Bonfante P. (2004). Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* 47: 416-426.

- Sharma J., Zettler L.W., van Sambeek J.W, Ellersieck M.R., Starbuck Ch.J. (2003). Symbiotic seed germination and mycorrhizae of federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). *American Midland Naturalist* 149: 104-120.
- Shefferson R.P., Weiß M., Kull T., Taylor D.L. (2005). High specificity generally characterises mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* 14: 613-626.
- Sideris C.P. (1950). A nutrient solution for germination of orchid seeds. *Bulletin of the Pacific Orchid Society of Hawaii* 8: 337-339.
- Smith K.A. & Dowdell R.J. (1974). Field studies of the soil atmosphere. I. Relationship between ethylene, oxygen, soil moisture content and temperature. *Journal of Soil Science* 25: 217-230.
- Smith S.E. (1973). Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin. *New Phytologist* 72: 497-499.
- Smith S.E. & Read D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, third edition. Academic Press, New York, USA.
- Smreciu E.A. & Currah R.S. (1989). Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana* 4: 6-15.
- Stephen R.C. & Fung K.K. (1971). Vitamin requirements of the fungal endophytes of *Arundina chinensis*. *Canadian Journal of Botany* 49: 407-410.
- Stewart S.L. & Kane M.E. (2006). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 147-158.
- Stewart S.L. & Kane M.E. (2007). Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43: 178-186.
- Stiles W. (1960). The composition of the atmosphere (oxygen content of air, water, soil, intercellular spaces, diffusion, carbon dioxide and oxygen tension). In: Ruhland W. (ed), *Encyclopedia of Plant Physiology XII/2*. Springer Verlag, Berlin, pp. 114-148.
- Stoutamire W.P. (1974). Terrestrial orchid seedlings. In: Withner C.L. (ed), *The orchids. Scientific studies*. Wiley, New York, pp. 101-128.
- Taylor D.L. & McCormick M.K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 177: 1020-1033.
- Trudell S.A., Rygielwicz P.T., Edmonds R.L. (2003). Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytologist* 160: 391-401.

- Vacin E.F. & Went F.W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette* 110: 605-613.
- van der Kinderen G. (1987). Abscisic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. *Lindleyana* 2: 84-87.
- van Staden J., Webb D.P., Wareing P.F. (1972). The effect of stratification on endogenous cytokinin levels in seeds of *Acer saccharum*. *Planta* 104: 110-114.
- van Waes J.M. (1984). In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideeën. Thesis, Rijkuniversiteit Gent.
- van Waes J.M. (1987). Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of western European orchids. *Acta Horticulturae* 212: 131-138.
- van Waes J.M. & Debergh P.C. (1986a). In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* 67: 253-261.
- van Waes J.M. & Debergh P.C. (1986b). Adaptation of the tetrazolium method for testing seed viability and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* 66: 435-442.
- Vejsadová H. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 109-113.
- Vermeulen P. (1947). Studies on Dactylorchids. Schotanus and Jens, Utrecht.
- Vujanovic V., St-Arnaud M., Barabé D., Thibeault G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany* 86: 79-86.
- Wang B. & Qiu Y.-L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plant. *Mycorrhiza* 16:299-363.
- Warcup J.H. (1973). Symbiotic germination of some Australian orchids. *New Phytologist* 72: 387-392.
- Warcup J.H. & Talbot P.H.B. (1967). Perfect states of rhizoctonias associated with orchids. *New Phytologist* 66: 631-641.
- Webb D.P. & Wareing P.F. (1972). Seed dormancy in *Acer*: Endogenous germination inhibitors and dormancy in *Acer pseudoplatanus* L. *Planta* 104: 115-125.
- Wilkinson K.G., Dixon K.W., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and Soil* 159: 291-295.
- Xu J., Ran X., Guo S. (1989). Studies on the life cycle of *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Yunnanica* 12: 421-426.

- Yamazaki J. & Miyoshi K. (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 98: 1197-1206.
- Zelmer C.D., Cuthbertson L., Currah R.S. (1996). Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience* 37: 439-448.
- Zettler L.W. & McInnis T.M. (1994). Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera inteligrabia*). *Plant Science* 102: 133-138.
- Zettler L.W., Sharma J., Rasmussen F.N. (2003). Mycorrhizal diversity. In: Dixon K.W., Kell S.P., Barret R.L., Cribb P.J. (eds), *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp. 205-226.
- Znanięcka J. & Łojkowska E. (2004). Establishment of *in vitro* culture collection of endangered European orchids. *Bulletin of Botanical Gardens* 13: 69-73.