

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Experimentální biologie rostlin

Obor: Ekofyziologie rostlin (N-EBREK)



Bc. Anna Jiroušková

Mechanismy fyzikální dormance a klíčení semen orchidejí

**Mechanisms of physical dormancy and germination
of orchid seeds**

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jan Ponert, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Praha 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Obrovský dík patří mému školiteli RNDr. Janu Ponertovi, Ph.D. za mnoho užitečných rad, času, podpory a trpělivosti, které mi věnoval. Stejně tak mnohokrát děkuji úžasné paní konzultantce RNDr. Editě Tylové, Ph.D., bez které by nikdy nevznikly krásné anatomické řezy a následně snímky doplňující tuto práci. Děkuji za trpělivost, obětavost a čas, který mi věnovala. Část snímků pochází z konfokálního mikroskopu. V této souvislosti nesmím opomenout ani Mgr. Annu Kampovou, které děkuji za trpělivost a čas, který se mnou a Editou u konfokálního mikroskopu proseděla. Mnohokrát děkuji i kolegům z týmu Mgr. Janu Šochovi za mnoho rad, pomoc při prvních výsevech a Ing. RNDr. Tomáši Figurovi, Ph.D. za mnoho rad, podpory a za společné víkendy v laboratoři. Další, na koho nesmím zapomenout je Ing. Yvetta Šefrnová, která mi velmi pomohla jak během práce, tak mi byla velkou oporou. Děkuji Mgr. Stanislavovi Vosolsobě, Ph.D. za zapůjčení fluorescenční barvičky 5,6 – CFDA a Mgr. Aničky Kampové. V neposlední řadě děkuji RNDr. Alešovi Soukupovi, Ph.D. za konzultace týkající se anatomických barvení a následného snímání. Vám všem patří můj velký dík a vděk. Ať jsme spolupracovali více či méně, tak bez Vás, by tato práce v této podobě nevznikla. Děkuji.

Dále bych ráda poděkovala příteli za obrovskou trpělivost, oporu a pochopení, rodině za podporu a přátelům za to, že jsou. A to nejen v době, kdy tato práce vznikala. Děkuji, že jste a že Vás mám.

Děkuji i Grantové agentuře Univerzity Karlovy, která tento projekt finančně podpořila (projekt č. 360421).

Abstrakt

Semena orchidejí jsou typická redukovanou stavbou, proto je nazýváme prachová semena. Zralá semena jsou tvořena pouze nediferencovaným živým embryem a dvěma vrstvami odumřelého osemení. Zatímco vnější osemení je výrazné, vnitřní osemení je tenké a těsně obepíná embryo. Osemení má hydrofobní charakter a brání průniku vody k embryu. Pro indukci klíčení semen v umělých podmínkách se nejčastěji využívá chemická skarifikace chlornanem vápenatým, nebo chlornanem sodným. Není však zcela jasné, k jakým změnám v osemení při tom dochází. Já jsem se zaměřila především na semena kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) a prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), u nichž jsem analyzovala změny navozené ošetřením roztokem chlorového vápna, a to sledováním klíčení semen v *in vitro* podmínkách, testováním propustnosti obou osemení a histochemickou analýzou vybraných složek osemení. Největší změny, ke kterým docházelo v důsledku ošetření roztokem chlorového vápna, jsem pozorovala ve vnějším osemení a sice při detekci ligninu. S jeho úbytkem po ošetření pravděpodobně souvisí i zvýšená propustnost semen pro vodu a vyšší klíčivost semen v umělých podmínkách u prstnatce májového, který má poměrně málo vyvinuté vnitřní osemení. Tento trend byl méně výrazný u kruštíku širolistého, jehož vnitřní osemení je mohutné, a poměrně rezistentní vůči ošetření chlornanem. To by mohlo naznačovat rozdílné strategie dormance či regulace klíčení u těchto dvou druhů orchidejí a významnou roli vnitřního osemení ve fyzikální složce dormance kruštíku.

Klíčová slova

fyzikální dormance, histochemická analýza, chlornan, klíčení orchidejí, mykorhizní houby, osemení, propustnost, semeno

Abstract

Orchid seeds are called dust seeds because of very reduced structure. A mature dust seed is composed of living embryo and two seed coats which are formed by dead cells. While the outer seed coat is distinctive, the inner seed coat (known as carapace) is very thin and tightly surrounds the embryo. Seed coat is hydrophobic and prevents water from entering embryo. To induce germination artificially, calcium hypochlorite or sodium hypochlorite solutions are often used. However, the effect of chemical scarification on seed coats is poorly understood. I focused on seeds of *Epipactis helleborine* and *Dactylorhiza majalis* and I analysed changes in seeds induced by calcium hypochlorite treatment using germination of seeds *in vitro*, permeability tests of seed coats and histochemical analyses of selected components of seed coats. The most prominent change observed was decrease of amount of lignin in the outer seed coat. This is likely related to increase in permeability of seeds and stimulation of *in vitro* germination rate in *Dactylorhiza majalis* which has only thin and less complex inner seed coat. However, this relationship was less evident in *Epipactis helleborine*, which has thicker and more complex inner seed coat which is more resistant to hypochlorite scarification. This could indicate existence of different germination or dormancy strategies between these two orchid species and an important role of inner seed coat in physical component of dormancy of *Epipactis helleborine* seeds.

Keywords

histochemical analysis, hypochlorite, mycorrhizal fungi, orchid germination, permeability, physical dormancy, seed, seed coat

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	1
2. Úvod	2
3. Cíle práce	3
4. Lirerární úvod	4
4.1. Orchideje	4
4.2. Anatomická stavba semen orchidejí.....	4
4.3. Klíčení semen orchidejí v umělých podmínkách.....	8
4.3.1. Kultivace nezralých semen	9
4.3.2. Dlouhodobé máčení	9
4.3.3. Skarifikace.....	9
4.3.4. Teplota.....	12
4.3.4.1. Chladová stratifikace.....	12
4.4. Šíření semen orchidejí	13
5. Metodika	15
5.1. Příprava materiálu	15
5.1.1. Příprava médií	15
5.1.1.1. Pevná média.....	15
5.1.1.2. Tekutá média	16
5.1.2. Příprava semen.....	17
5.1.2.1. Sběr a skladování	17
5.1.2.2. Příprava před experimentální částí.....	17
5.1.3. Příprava hub	18
5.1.3.1. Udržovací kultura	18
5.1.3.2. Kultura v tekutém živném médiu	18
5.2. Experimentální část	19
5.2.1. Ošetření semen	19

5.2.1.1. Anorganické chemické sloučeniny	19
5.2.1.1.a. Chlorové vápno	19
5.2.1.1.b. SAVO	20
5.2.1.1.c. H ₂ SO ₄ a roztok chlorového vápna	20
5.2.1.2. Houbové exudáty	20
5.2.1.3. Destilovaná voda	21
5.2.2. Testování vlivu ošetření	21
5.2.2.1. Výsev	22
5.2.2.1.a. Získávání dat o klíčivosti semen	22
5.2.2.1.b. Analýza dat o klíčivosti semen	23
5.2.2.2. Testování propustnosti osemení	24
5.2.2.2.a. Pilotní experiment	25
5.2.2.2.b. Hlavní experiment	28
5.2.2.3. Histochemická analýza vlastností osemení	29
5.2.2.3.a. Příprava řezů pomocí kryotomu	30
5.2.2.3.b. Detekce ligninu	30
5.2.2.3.c. Detekce suberinu	31
5.2.2.4. Analýza ultrastruktury osemení	31
5.2.2.4.a. Skenovací elektronový mikroskop	31
5.2.2.4.b. Transmisní elektronový mikroskop	31
6. Výsledky	33
6.1. Výsev	33
6.1.1. Ošetření semen anorganickými látkami	33
6.1.1.1. Roztok chlorového vápna	33
6.1.1.2. SAVO	36
6.1.1.3. Kyselina sírová	38
6.1.2. Houbové exudáty	39
6.2. Testování propustnosti osemení	42

6.2.1. Pilotní experiment	42
6.2.2. Hlavní experiment	48
6.2.2.1. Propustnost vnějšího osemení – test pomocí PTS	48
6.2.2.1.a. Dynamika vstupu PTS do semen	48
6.2.2.1.b. Inkubace semen v roztoku PTS	49
6.2.2.2. Propustnost vnitřního osemení – test pomocí berberin hemisulfátu	54
6.3. Histochemická analýza vlastností osemení	57
6.3.1. Vnější osemení	57
6.3.2. Vnitřní osemení	63
6.4. Ultrastruktura osemení	71
6.4.1. Skenovací elektronový mikroskop	71
6.4.2. Transmisní elektronový mikroskop	72
7. Diskuze	79
7.1. Výsev	79
7.2. Struktura osemení	83
7.3. Propustnost semen a fyzikální složka dormance	87
8. Závěr	93
9. Použitá literatura	94

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5,6-CFDA – 5,6-karboxyfluorescein diacetát

ABA – kyselina abscisová

ANOVA – analýza rozptylu

ATR-FTIR – zeslabená úplná reflektance infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací

BF – světlé pole (z angl. *bright field*)

ddH₂O – destilovaná voda

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EtOH – ethanol

FDA – fluorescein diacetát

PEG-400 – polyethylenglykol 400

PI – propidium jodid

PTS trisodná sůl kyseliny 8-hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonové (*8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid trisodium salt*)

PBS – fosfátem pufovaný solný roztok (z angl. *phosphate buffered saline*)

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

UV – excitační ultrafialové světlo (z angl. *ultraviolet*)

2. ÚVOD

Evoluční novinkou semenných rostlin (*Spermatophyta*) je tvorba semen. Byla popsána semena nejrozličnějších tvarů i velikostí. Nejmenší semena na světě jsou prachová semena mykotrofních rostlin. Jsou typická výrazně redukovanou stavbou s malým embryem v globulární fázi vývoje, které je v extrémních případech tvořeno jen několika buňkami. Mykotrofní rostliny vznikly nezávisle v několika skupinách rostlin a vždy vytvořily podobná prachová semena s podobnou stavbou. Prachová semena mykotrofních rostlin mají výrazné vnější osemení, což je vlastně vak z mrtvých buněk z velké části vyplněný vzduchem. Hlouběji bývá tenké a málo nápadné vnitřní osemení, taktéž tvořené odumřelými buňkami. Některé skupiny rostlin s prachovými semeny vytvářejí také malý endosperm. O regulaci klíčení a dormanci prachových semen je známo velice málo informací. Kromě samotné nezvykle redukované stavby semen by mohly do klíčení výrazně zasahovat symbiotické houby. Malá semena mykotrofních rostlin mají malé množství zásobních látek, které nestačí pro vývoj prvních fotosyntetizujících orgánů, takže nejsou schopna po vyklíčení sama pokračovat ve vývoji v mladou rostlinu. Musí dojít k navázání symbiotického vztahu s houbovým myceliem, od kterého je získáván uhlík, aby byl možný vývoj těchto fascinujících rostlin. V některých případech pravděpodobně prachová semena nejsou schopna ani sama bez symbiotické houby vyklíčit. Z mykotrofních rostlin jsou nejvíce prozkoumané orchideje, proto jsem si pro tuto práci vybrala právě orchidejová semena. Budu se zabývat indukcí klíčení těchto prachových semen v umělých podmínkách a změnami v osemení, ke kterým v důsledku indukce klíčení dochází.

3. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce je přispět k porozumění významu osemení pro regulaci klíčení a dormance semen orchidejí.

K tomu účelu jsem se zaměřila na porovnání obtížně klíčících druhů kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) a kruštíku tmavočerveného (*Epipactis atrorubens*) se snadno klíčícím druhem prstnatce májový (*Dactylorhiza majalis*).

Jako dílčí cíle jsem si stanovila:

- Zjistit, jaké ošetření semen kruštíku širolistého a kruštíku tmavočerveného roztokem chlorového vápna indukuje klíčení.
- Porovnat vliv roztoku chlorového vápna na klíčení kruštíků s jeho vlivem na klíčení semen prstnatce májového.
- Zjistit, zda ošetření semen kruštíku širolistého a kruštíku tmavočerveného roztokem SAVO indukuje klíčení.
- Zjistit, zda ošetření semen kruštíku širolistého a kruštíku tmavočerveného kyselinou sírovou v kombinaci s roztokem chlorového vápna podpoří klíčení.
- Zjistit, zda mohou klíčení kruštíku širolistého a prstnatce májového podporovat exudáty symbiotických hub.
- Zjistit, zda a jak mění ošetření semen kruštíku širolistého a prstnatce májového roztokem chlorového vápna propustnost vnějšího a vnitřního osemení pro vodu.
- Zjistit, k jakým změnám dochází v osemení kruštíku širolistého a prstnatce májového při ošetření roztokem chlorového vápna.

4. LIRETÁRNÍ ÚVOD

4.1. Orchideje

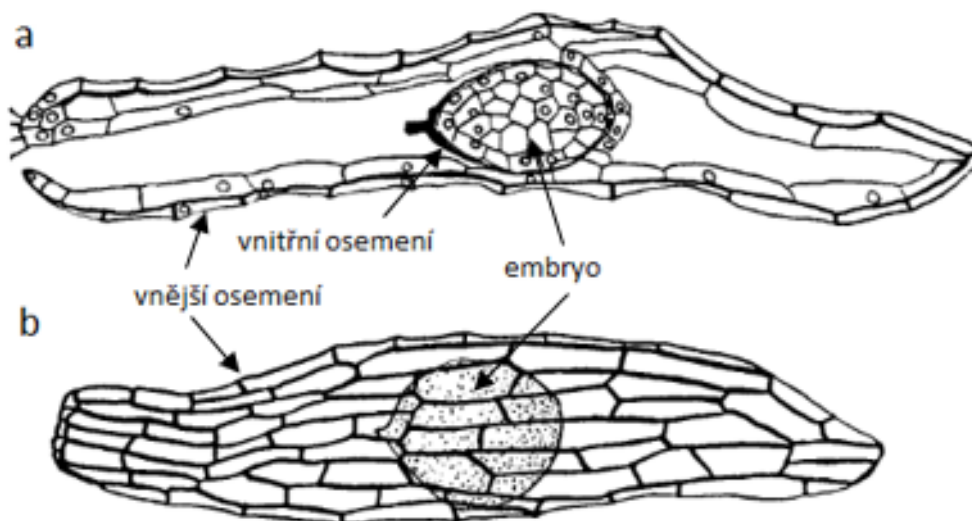
Vstavačovité (*Orchidaceae*) jsou největší čeledí cévnatých rostlin. Spadá do nich více než 700 rodů obsahujících přibližně 28 000 druhů (Chase *et al.*, 2015; Christenhusz & Byng, 2016) a každým rokem je popisováno více než sto nových druhů. Tomu tak je velmi pravděpodobně i kvůli tomu, že v rámci čeledě pozorujeme obrovskou morfologickou i ekologickou variabilitu. Co však mají všechny orchideje společné, jsou prachová semena a iniciální mykotrofie.

Termín prachové semeno není přesně definován (Eriksson & Kainulainen, 2011), jedná se však o extrémně malá semena, která se jeví jako prach. Termín vznikl překladem z německých termínů „*staubförmiger Samen*“ a „*Staub-Samen*“ do anglického „*dust seed*“ (Arditti & Ghani, 2000; Eriksson & Kainulainen, 2011). Prachová semena najdeme kromě vstavačovitých (*Orchidaceae*) i v dalších čeledích mykotrofních či parazitických rostlin. Jako příklady mykotrofních rostlin bych uvedla čeleď olachanovité (*Burmanniaceae*) a v ní rody olachan (*Burmannia*) (Maas *et al.*, 1986) a hvězdnatka (*Thismia*) (Maas *et al.*, 1986), v čeledi vřesovcovité (*Ericaceae*) rody hruštička (*Pyrola*) (Pyykkö, 1968), hnilák (*Monotropa*) (Olson, 1980) a jednokvítka (*Moneses*) (Pyykkö, 1968). Někdy jsou jako prachová semena označována také drobná semena některých jiných rostlin, například bublinek (*Utricularia*) (Baskin & Baskin, 2021).

Iniciální mykotrofie označuje způsob výživy, kdy rostliny po vyklíčení získávají organický uhlík od symbiotického houbového mycelia a ne z vlastních zdrojů (Leake, 1994; Merckx & Freudenstein, 2010; Selosse & Cameron, 2010). Některé rostliny se později v průběhu ontogeneze stávají autotrofními organismy a veškerý uhlík si vytváří samy. Část těchto rostlin je v dospělosti mixotrofní, což znamená, že část uhlíku získávají fotosyntézou a část od symbiotické houby a další část těchto rostlin je mykoheterotrofní po celý život (Rasmussen & Rasmussen, 2009). Druhy, které jsou mykoheterotrofní celý život, se zpravidla neoznačují jako iniciálně mykotrofní, i když mají mnohé společné (např. Merckx, 2013).

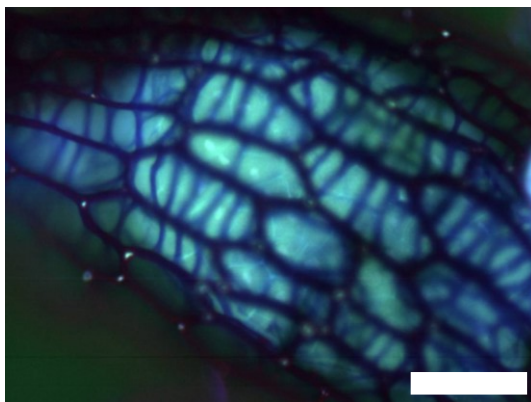
4.2. Anatomická stavba semen orchidejí

Semena orchidejí patří k nejmenším známým semenům v rostlinné říši. Vznikají v plodu, kterým je většinou suchá tobolka. V každé tobolce najdeme 1.300 – 4 000 000 semen (Tournay, 1960; Arditti, 1967a; Arditti & Ghani, 2000). U orchidejí nacházíme semena o rozměrech 0,05 – 6 mm na délku a 0,01 – 0,9 mm na šířku (Curtiss, 1893; Tournay, 1960; Healey *et al.*, 1980; Arditti & Ghani, 2000).



Obrázek 1 Semeno střevíčníku (*Cypripedium parviflorum*); a) podélný řez semenem; b) semeno vcelku. Upraveno podle Carlson, 1940.

Pro velkou část boreálních terestrických orchidejí je typická stavba semen, kterou vidíme na obrázku 1 na příkladu střevíčníku (*Cypripedium parviflorum*). Na první pohled nejvýraznější část semene tvoří u většiny druhů vnější osemení. Na straně, kde bylo semeno původně připojeno k placentě, bývá vnější osemení otevřené s nápadným pupkem (*hilum*), na opačné straně je uzavřené. Vnější osemení vzniká přeměnou vnějšího integumentu vajíčka, chalázy a poutka (*funikulus*) (Ziegler, 1981; Clements, 1995). Je obvykle jednovrstevné a je tvořeno buněčnými stěnami odumřelých buněk. Vnější osemení si lze představit jako víceméně hydrofobní vak, který je z velké části vyplněný vzduchem. Ke ztrátě buněčného obsahu dochází těsně před dozráním semen (Ziegler, 1981; Clements, 1995). Před tím dochází k tvorbě sekundární buněčné stěny (např. Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005), která u některých druhů (např. prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*) na obrázku 2) vytváří u zralých semen patrné ornamenty buněčných stěn osemení.



Obrázek 2 Semeno p. májového (*D. majalis*) s viditelnými sekundárními výztuhami v osemení; ošetřeno 4 min EtOH, 30 min chlor. vápnem, barveno 60 min berberin hemisulfát, 10 min genciánová violet, snímáno při excitaci ultrafialovým zářením (filtr blok Olympus U-MWU); měřítko = 50 μ m.

Chemické složení vnějšího osemení není zcela objasněno. Dosud v něm byla identifikována především celulóza (Carlson, 1940; Barsberg *et al.*, 2013) a ligniny (Chen *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2014; Yang & Lee, 2014). Zatímco u rodu můrovec (*Phalaenopsis*) byl identifikován pouze obvyklý typ ligninu označovaný „G/S-lignin“ (Chen *et al.*, 2012; Barsberg *et al.*, 2018), u rodů střevíčník (*Cypripedium*), *Neuwiedia* a vanilka (*Vanilla*) byl identifikován také méně obvyklý typ ligninu označovaný „C lignin“ (Chen *et al.*, 2012; Barsberg *et al.*, 2018). U různých druhů byl v osemení pozorován také kutin, a to především pomocí fluorescence barvy nilská červeň (např. Rasmussen, 1995; Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005, 2007). U *Cymbidium sinense* je kutin přítomný především v sekundárních buněčných stěnách (Yeung *et al.*, 1996). U *Calanthe tricarinata*, *Cymbidium sinense* a střevíčníku (*Cypripedium formosanum*) je kutin přítomný na vnější straně vnějšího osemení (Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005, 2007). Na druhou stranu je zajímavé, že kutin nebyl pozorován v osemení střevíčníku pantoflíčku (*Cypripedium calceolus*) pomocí zeslabené úplné reflektance infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (ATR-FTIR) (Barsberg *et al.*, 2013), což autoři vysvětlují hypotézou, že nilská červeň je primárně používána pro živočišné tkáně, ve kterých se však lignin nevyskytuje (Chen *et al.*, 2009). U rostlinných pletiv bylo zjištěno, že nilská červeň může nespecificky barvit fenolické skupiny v buněčné stěně (Brundrett *et al.*, 1991). S ohledem na to, že lignin je hydrofobní fenolický polymer, tak je možné, že ve skutečnosti nilská červeň obarvila lignin, nikoliv kutin, který je také hydrofobní a může obsahovat fenolické skupiny (např. Philippe *et al.*, 2020). Gaëtan Harvais (1980) uvádí také přítomnost suberinu v osemení orchidejí, avšak bez podpory experimentálních dat. Stejně jsou na tom některé další práce, které se o suberinu v semenech orchidejí zmiňují (např. Kauth *et al.*, 2008). Suberin v semenech orchidejí patrně nebyl nikdy skutečně detekován, a to včetně několika druhů rodu střevíčník (*Cypripedium*), kterým se sám Gaëtan Harvais intenzivně zabýval (Carlson, 1940; Lee *et al.*, 2005). Přítomnost suberinu v osemení orchidejí je tedy značně nejistá. Výsledky barvení různých druhů pomocí toluidinové modři naznačují také možnou přítomnost polyfenolů (Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005, 2007).

Přibližně uprostřed semene se nachází sférické embryo. Jeho umístění může napomáhat jednobuněčný (Carlson, 1940), nebo v některých případech třibuněčný suspensor (Lee *et al.*, 2006). Suspensor však nemusí být vždy ve zralém semeni vyvinut (popsáno například u rodů bradáček *Listera* a hlísník *Neottia*) (Veyret, 1969; Pridgeon *et al.*, 1999). V počátečních fázích vzniku suspensoru v něm může docházet k akumulaci škrobových zrn (Li *et al.*, 2016). Embrya orchidejí jsou tvořena malým počtem nediferencovaných buněk, stavbou odpovídají globulární fázi vývoje. Zpravidla u nich lze odlišit povrchovou vrstvu buněk (protoderm) od vnitřních buněk (např. Rasmussen, 1990; Yeung *et al.*, 1996). Na posteriorní straně jsou u některých druhů buňky větší než na opačné straně embrya (Carlson, 1940; Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2016). Existují

hypotézy, že tento velikostní gradient se vyskytuje například u druhů gastrodie vyvýšená (*Gastrodia elata*) nebo *Gastrodia nantoensis*, které v umělých podmínkách snadno a rychle klíčí (Li *et al.*, 2016). Naopak u semen, které v umělých podmínkách vykazují žádnou, nebo velmi malou klíčivost (např. kalypso severní *Calypso bulbosa*, střevíčník *Cypripedium formosanum*), tento gradient pozorován nebyl (Yeung & Law, 1992; Lee *et al.*, 2005). Pozorované množství druhů je však velice malé. Zásobní látky v embryu zralých semen jsou převážně proteiny a lipidy (Rasmussen, 1990; Lee *et al.*, 2005). Většinou se ve zralých semenech nevykytuje škrob (Carlson, 1940; Harvais, 1974; Manning & van Staden, 1987; Rasmussen, 1990), existují však výjimky (Mei-Sheng *et al.*, 1985; Shun-xing & Jin-tang, 1990; Yeung & Law, 1992). U některých jihoafrických orchidejí byly v semenech detekovány rozpustné sacharidy, např. sacharóza a manóza (Manning & van Staden, 1987). Pro orchideje je typické, že embryo není vyživováno endospermem, neboť dospělá semena neobsahují endosperm (např. Yeung, 2017;). To vedlo k otázce, zda u orchidejí dochází ke dvojitému oplození. U některých druhů se zdá, že ano (Swamy, 1945, 1949; Fredrikson, 1992), neplatí to však všeobecně pro všechny orchideje a zpravidla k němu pravděpodobně nedochází (např. Yeung, 2017).

K povrchu embrya zpravidla těsně přiléhá často opomíjené vnitřní osemení (v angl. literatuře často označované jako „carapace“ Veyret, 1969), které vzniká z vnitřního integumentu vajíčka. Vnitřní osemení vzniká ze dvou, případně třech vrstev buněk, které však před dozráním semene kolabují do podoby tenké blanky. Dvě vrstvy buněk se zdají být častější a byly pozorovány například u okrotice (*Cephalanthera falcata*) (Yamazaki & Miyoshi, 2006) nebo u střevíčníku (*Cypripedium formosanum*) (Lee *et al.*, 2005). Zatímco u některých druhů jako například *Cymbidium sinense* (Yeung *et al.*, 1996) nebo okrotice (*Cephalanthera falcata*) (Yamazaki & Miyoshi, 2006) je vnitřní osemení dobře patrné, u jiných druhů jako například *Phalaenopsis amabilis* (Lee *et al.*, 2008) patrně nemusí být ve zralých semenech vůbec detekovatelné. Vnitřní osemení ve zralých semenech nemívá snadno rozlišitelnou buněčnou strukturu, avšak může mít odlišitelné dvě vrstvy. U okrotice (*Cephalanthera falcata*) (Yamazaki & Miyoshi, 2006) a střevíčníku *Paphiopedilum delenatii* (Lee *et al.*, 2006) byla vnitřní vrstva pomocí histochemických barviv identifikována jako kutinizovaná a barvení vnější vrstvy vnitřního osemení odpovídalo lignifikaci. Přítomnost kutinu ve vnitřním osemení byla pozorována také u (*Cypripedium formosanum*) (Lee *et al.*, 2005). Deponovaný kutin by mohl ochránit embryo před předčasnou desikací (Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2007). Kutinizovaná vrstva u některých druhů končí v místě napojení suspensoru a samotný suspensor nepokrývá, což podporuje myšlenku, že strana s mikropyle a suspenzorem přivádějícím živiny je zásadní pro vstup látek do embrya (Lee *et al.*, 2006; Kawashima & Goldberg, 2010). Bylo navrženo, že mohutnost a ucelenost vnitřního osemení je zásadní pro pronikání vody

do embrya a tím pádem je tím i ovlivněna míra ochoty semen klíčit v umělých podmínkách. Semena s dobře vyvinutým vnitřním osemením jako jsou semena z rodů okrotice (*Cephalanthera*) a kruštík (*Epipactis*) totiž klíčí obtížně (Veyret, 1969). Naopak u snadno klíčících druhů vstavač kukačka (*Orchis morio*), *Neottinea maculata* a sehnutka krátkolistenná (*Serapias lingua*) je vnitřní osemení slabě vyvinuté. Mohutnost vnitřního osemení se také liší v závislosti na původu semen (Veyret, 1969). Barvení pomocí oluidinové modři u střevíčníku (*Cypripedium formosanum*) naznačuje také možnou přítomnost polyfenolů (Lee *et al.*, 2005).

Vrstva kutikuly byla u různých druhů pozorována také přímo na povrchu embrya s výjimkou vyvíjejícího se suspenzoru. Tato vrstva pravděpodobně vzniká v době, kdy buňky protodermy dokončí dělení (Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005, 2006).

4.3. Klíčení semen orchidejí v umělých podmínkách

Při klíčení semen orchidejí dochází ke zvětšování embrya, které protrhne osemení a vytvoří útvar nazývaný protokorm. Ten následně vytváří první meristém. Protože mají semena orchidejí neobvykle redukovanou stavbu, je otázkou definice samotného klíčení. Někdy je, podobně jako u semen jiných rostlin, považován za klíčení okamžik protržení osemení (např. Figura *et al.*, 2021). Jindy je jako proces klíčení označován celý vývoj od dormantního embrya po prorůstající meristém (např. Těšitelová *et al.*, 2012). Jak jsem již uvedla výše, orchideje jsou iniciálně mykoheterotrofní a vývoj protokormu není možný bez vyživování symbiotickou houbou. V umělých podmínkách *in vitro* může být mykorhizní houba nahrazena živným médiem.

Některé druhy orchidejí vytváří dormantní semena. Navzdory tomu, že se osemení jeví jako velmi jemná struktura, může být neprostupné pro vodu a pro plyny (např. Rasmussen, 1995; Lee *et al.*, 2007), což odpovídá fyzikální dormanci semen (Nikolaeva, 1977; Baskin & Baskin, 1998, 2004). Ta může být porušena například dlouhým namáčením semen, nebo jejich skarifikací. U semen orchidejí byla pozorována i fyziologická dormance, pravděpodobně spojená s akumulací kyseliny abscisové (ABA) (van der Kinderen, 1987; Lee *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2020). Tato složka dormance může být porušena například tmou, teplotním režimem, atmosférickými podmínkami, nebo určitými chemickými signály. Pokud do procesu klíčení zahrneme i vývoj protokormu, tak se u orchidejových semen může vyskytovat i morfologická dormance, což znamená požadavek na to, aby embryo dokončilo svůj vývoj poté, co je rozšířeno z mateřské rostliny do okolí. V této práci se budu dále držet definice klíčení, která nezahrnuje vývoj protokormu a jako klíčení semene označuje protržení osemení.

4.3.1. Kultivace nezralých semen

U některých druhů bylo pozorováno, že je výrazně snazší založit *in vitro* kulturu z nezralých semen než ze zralých semen (Lindén, 1980; Arditti *et al.*, 1982; Pauw & Remphrey, 1993; Rasmussen, 1995). Tento postup se stal běžným pro mnoho tropických druhů (Rasmussen, 1995; Buyun *et al.*, 2004; Kendon *et al.*, 2017), ale s úspěchem byl aplikován i na některé temperátní druhy, například na rod střevíčník (*Cypripedium*) (Pauw & Remphrey, 1993; Tomita & Tomita, 1997; Zhang *et al.*, 2013), které se do té doby nedařilo zavést do kultury (Rasmussen, 1995 a citace uvnitř). Nejedná se však o univerzální postup, který by byl vhodný pro všechny druhy orchidejí. K úspěšné kultivaci z nezralých semen nedošlo například v případě okrotice dlouholisté (*Cephalanthera longifolia*) a rodu kruštík (*Epipactis*), které jsou považovány za v umělých podmínkách velice obtížně klíčivé (Lindén, 1980, 1992). Na druhou stranu bylo u příbuzné okrotice *Cephalanthera falcata* pozorováno, že nezralá semena v určité fázi vývoje klíčila dobře (Yamazaki & Miyoshi, 2006). Rozdíly v odpovědích semen v rámci snahy o vypěstování kultur z nezralých semen by mohly být spojeny s typem dormance, která se v rostoucích semenech vytváří. Také je ale možné, že v uvedených experimentech semena nebyla sebrána ve správné fázi vývoje. Klíčivost nezralých semen se totiž během vývoje výrazně mění a optimální klíčivost mohou mít velice krátkou dobu (např. Lee *et al.*, 2007, 2015). Pravděpodobně jsou nejprve příliš málo vyvinutá později se již vytváří dormance (např. Rasmussen, 1995; Lee *et al.*, 2015).

4.3.2. Dlouhodobé máčení

Dlouhodobé namáčení semen může mít u některých druhů stejný efekt jako odstranění, nebo částečná dekompozice vnějšího osemení (Burgeff, 1936; Seeman, 1953; Burgeff, 1954). Na příkladu *Epipactis palustris* se však ukázalo, že se nejedná o řešení všech problémů spojených s porušováním dormance (Stoutamire, 1974; Lindén, 1992). Může to však napomoci vyklíčení semen, pokud jsou semena máčena před výsevem, nebo jsou vyseta na tekuté živné médium (Liddell, 1943; Ballard, 1967). Například střevíčník bezlodyžný (*Cypripedium acaule*) dosáhl přibližně 50% klíčivosti na tekutém médiu, ale na pevném vůbec nevyklíčil (Curtis, 1936). Na druhou stranu semena prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) klíčila na tekutém médiu méně, než na pevném a pokud bylo s tekutým médiem mícháno, pak neklíčila vůbec (Rasmussen, 1995). Předpokládá se, že při dlouhodobém namáčení semen by mohlo docházet k vyplavování inhibičních látek, pravděpodobně ABA (Eiberg, 1970; Stoutamire, 1974).

4.3.3. Skarifikace

Jedním z nejčastěji používaných postupů, jak povrchově desinfikovat semena, a zároveň podpořit jejich klíčivost, je ošetření chlornanem či jinými korozivními látkami, tedy chemická

skarifikace (např. Eilhard, 1980; Harvais, 1980; Lindén, 1980, 1992). Zralá povrchově desinfikovaná semena v některých případech klíčila lépe než semena sklizená těsně před dozráním, která byla vyjmuta ze zavřené tobolky (nebyla tedy nutná jejich povrchová sterilizace) (Eilhard, 1980). Další výzkum ukázal, že není důležitá jen samotná přítomnost chlornanu, ale i koncentrace roztoku a délka jeho působení na semena. Na příkladu prstnatce nachového (*Dactylorhiza purpurella*) bylo zjištěno, že dochází k navýšení klíčivosti, pokud jsou semena desinfikována tak dlouho, dokud neztratí tmavé zbarvení (Harvais & Hadley, 1967). Zároveň bylo zjištěno, že takto dlouhým ošetřením není negativně ovlivněn růst semenáčů (Harvais & Hadley, 1967). Podobné výsledky byly získány také u jiných druhů orchidejí, a tak někteří autoři doporučují zvolit dobu desinfekce tak, aby byla semena odbarvena do odstínu slonové kosti (Vejsadová, 2006). Semena však není možné chemicky skarifikovat neomezeně dlouho. Po určitou druhově specifickou dobu klíčivost pozitivně koreluje se zvyšující se dobou trvání desinfekce do určitého maxima trvání, ale když je ho dosaženo, pak klíčivost dramaticky klesá (Lindén, 1980; Van Waes, 1984; Van Waes & Debergh, 1986a; Rasmussen, 1992). Dále je nutné vzít v potaz vztah mezi množstvím semen, dobou trvání desinfekce a koncentrací desinfekčního roztoku (Harvais, 1980).

Doba optimální desinfekce pro klíčení je obvykle delší než doba, která je potřebná k vydesinfikování povrchu semen (Van Waes, 1984). Obecně můžeme říci, že je pro semena většinou příznivější desinfekce chlornanem vápenatým ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) než chlornanem sodným (NaOCl) (Rasmussen, 1995; Vejsadová, 2006). To se ukázalo například v pokusech s prstnatcem pleťovým pozdním (*Dactylorhiza incarnata* subsp. *serotina*), kdy $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ signifikantně stimuloval formování protokormů, zatímco ošetření NaOCl klíčivost signifikantně inhibovalo (až o 50 %), část embryí byla dokonce poškozená (Vejsadová, 2006). Na druhou stranu byly prováděny pokusy, kde se tento trend nepotvrdil (Van Waes & Debergh, 1986b). Například semena střevíčníku velkokvětého (*Cypripedium macranthos*) vykazovala po ošetření NaOCl i $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ klíčivost přibližně 70 % (Miyoshi & Mii, 1998). Příčina rozdílnosti výsledků nebyla zatím objasněna, nicméně je pravděpodobné, že efekt těchto látek na konkrétní semena bude závislý na použité koncentraci a době působení. Citované práce bohužel zpravidla neporovnávají různé koncentrace v různých časech působení. Roztoky obou chlornanů jsou silně zásadité a jsou silnými oxidačními činidly – NaOCl je silnějším oxidačním činidlem než $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Roztok NaOCl je kromě toho zásaditější než roztok $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (Ponert *et al.*, 2011). Nejen výsledky pokusů našeho týmu ukazují, že ještě lepším skarifikačním prostředkem než čistý $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ je chlorové vápno (Jan Ponert, ústní sdělení). Jedná se o směs látek s převahou $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a $\text{Ca}(\text{OH})_2$. V tomto směru je zajímavé, že ošetření semen orchidejí peroxidem (tedy pouze silným oxidačním činidlem) nevedlo ke stimulaci klíčení (Van

Waes, 1984; Rasmussen, 1995), zatímco ošetření silně zásaditým roztokem NaOH klíčení podporovalo (Eiberg, 1970).

Obecně se dá stimulační efekt povrchové sterilizace roztokem chlornanu vysvětlit více způsoby. Jednak může během ošetření semen docházet k vymývání či degradaci endogenní ABA. V případě prstnatce plamatého (*Dactylorhiza maculata*) vedla dvouhodinové desinfekce chlornanem k poklesu koncentrace endogenní ABA pod detekční úroveň (Van Waes, 1984). V případě *Calanthe tricarinata* vedlo ošetření NaOCl, NaOH i ultrazvukem ke snížení obsahu ABA a indukci klíčení (Lee *et al.*, 2007). Jednak je pravděpodobné, že desinfekční roztok degraduje osemení, díky čemuž je usnadněn vstup vody do embrya (např. Rasmussen, 1995 a citace uvnitř; Kauth *et al.*, 2008; Barsberg *et al.*, 2013). V případě střešníku pantoflíčku (*Cypripedium calceolus*) byla degradace ligninu způsobená ošetřením roztokem chlornanu pozorována ATR-FTIR spektroskopii (Barsberg *et al.*, 2013). Zároveň byla pozorována inkorporace CaCO₃ do osemení, což sice nelze jednoznačně vysvětlit, ale mohlo by to mít souvislost se stimulací klíčení (Barsberg *et al.*, 2013). V tomto směru je zajímavé připomenout výše zmíněné rozdíly v působení chlornanů, kdy roztoky Ca(OCl)₂ dávají zpravidla lepší výsledky než roztoky NaOCl. Pro usnadnění kontaktu akvatického roztoku a lipofilního povrchu se do roztoků chlornanů často přidává detergent, zpravidla Tween 80 (např. Rasmussen, 1995).

U některých druhů může být klíčení semen podpořeno kombinací roztoků chlornanů s dalšími chemickými látkami. Nejčastěji se používá předošetření či střídání s ethanolem (Michl, 1988; Vejsadová, 2006; Ponert *et al.*, 2021). Další možností je kombinace se slabým roztokem kyseliny sírové (Malmgren, 1993).

Zajímavou možností skarifikace semen orchidejí je ošetření enzymy degradujícími buněčné stěny. Na několika druzích mírného pásma byla úspěšně testována kombinace celulázy a maceroenzymu (Lindén, 1992) a na vstavači kukačky (*Anacamptis morio*) byla úspěšně testována lakáza (Pierce *et al.*, 2018). Stimulace klíčení bylo dosaženo také ryze mechanickými způsoby narušení osemení, a to narušením vakuem (Lindén, 1992), ultrazvukem (Miyoshi & Mii, 1988; Shin *et al.*, 2011) či úplným manuálním odstraněním vnějšího osemení (Butcher & Marlow, 1989). Je pravděpodobné, že u semen s chemicky a mechanicky neporušeným povrchem by voda mohla abiotickým způsobem vstupovat pouze velmi pomalu skrze otvor klový a suspensor, pokud by to vůbec bylo možné.

4.3.4. Teplota

I přes to, že indukce klíčení inkubací v určité teplotě souvisí zřejmě s fyziologickou dormancí, které jsem se v rámci mé diplomové práce nevěnovala, bylo vystavení semen teplotním změnám součástí jejich kultivace. Krátce se zde tedy o tomto vlivu zmíním.

U většiny druhů pozorujeme nejvyšší klíčivost při inkubaci v rozmezí teplot 20–25 °C. Pokud je teplota vyšší, nebo nižší, než je optimum, některé ze životaschopných semen zůstávají v klidu a neklíčí (např. Arditti, 1967b; Harvais & Hadley, 1967; Rasmussen, 1990). S přirozenou sezónní fluktuací teplot v přírodě tento trend zajišťuje, že klíčení populace semen bude v čase rozloženo. Teplotní optimum pro klíčení se u arktických druhů (*Amerorchis rotundifolia*) jeví stejné jako pro druhy z chladného temperátu (prstnatec májový *Dactylorhiza majalis*, pětiprstka žežulník *Gymnadenia conopsea*). Jediný rozdíl mezi semeny z těchto oblastí je, že druhy z temperátních oblastí mají vyšší toleranci k vysokým teplotám (Rasmussen, 1995). Některé druhy však před klíčením vyžadují období působení odlišné teploty, což lze označit jako stratifikaci.

4.3.4.1. Chladová stratifikace

Fyziologickým efektem chladové stratifikace je buď pokles endogenního množství ABA, anebo vzrůst obsahu endogenních cytokininů. Obě tyto možnosti mohou stimulovat klíčení. Že k takovým změnám dochází bylo pozorováno u množství jiných rodů rostlin (Rudnicki, 1969; van Staden *et al.*, 1972). Podle Rasmussen (1995) lze na základě experimentů popsaných v literatuře (Van Waes, 1984; van der Kinderen, 1987) předpokládat, že během chladové stratifikace semen prstnatce plamatého (*Dactylorhiza maculata*) a kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) by mohlo docházet k poklesu obsahu endogenní ABA.

U symbiotické kultivace kruštíku bahenního (*Epipactis palustris*) procento klíčivosti narůstalo s dobou trvání chladu. Od skoro nulové klíčivosti po pouhých 4 týdnech při 5 °C po signifikantně vyšší klíčivost po 8 týdnech. A ještě vyšší úroveň klíčivosti bylo dosaženo po 12 týdnech kultivace v chladu. Efekt chladu u těchto druhů může být podpořen předchozí inkubací při 20 °C, která pravděpodobně umožňuje semenům nabobtnávat, zakládá se kontakt s houbou a umožňuje i dozrání semen, než začne ošetření chladem (Rasmussen, 1992). Obdobný jev byl pozorován i u asymbiotického klíčení střevíčníku královna (*Cypripedium reginae*) (Ballard, 1967). Většina záznamů, kdy chladová stratifikace nevedla ke zvýšení klíčivosti, byla v případech, kdy období chladu následovalo bezprostředně po výsevu anebo šlo o případy, kdy chlad trval 8 týdnů a méně (např. Van Waes, 1984; Rasmussen, 1995 a citace uvnitř).

Ekologickým efektem požadavku na chlad u orchidejových semen je ochrana před vyklíčením bezprostředně po rozšíření. Cykly chlazení, mrznutí, roztávání semen a různá období namáčení během zimy mohou mít kumulativní efekt, který způsobuje změknutí vnějšího osemení, vyluhují se inhibitory klíčení a iniciují se fyziologické změny v embryu. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že mnoho holarktických druhů orchidejí klíčí na jaře (Rasmussen, 1995 a citace uvnitř).

4.4. Šíření semen orchidejí

První asi nejzřejmější možností šíření prachových semen je anemochorie neboli šíření větrem (Ridley, 1905). V takovém případě však není podstatný jen celkový rozměr semene, ale i poměr hmotnosti semene a vzduchu, které semeno obsahuje (Arditti & Ghani, 2000). Ve většině semen orchidejí se vyskytuje velký obsah vzduchu, díky čemuž jsou k šíření větrem velmi dobře přizpůsobená (Gandawijaja & Arditti, 1983). Tuto domněnku podporují zjištění, že zralé semeníky většiny orchidejí se otvírají za sucha (Ridley, 1930). Díky mnohým pozorováním se zdá, že je běžné, že se některá semena pomocí větru šíří od mateřské rostliny do vzdálenosti 5-10 km (de Lehaie, 1910). Rekordmany v šíření na dlouhou vzdálenost jsou pravděpodobně některé orchideje, které rostou na Azorech. Jsou totiž blíže příbuzné k druhům vyskytujícím se v kontinentálním Portugalsku, které je od Azor vzdáleno asi 1 500 km (Ridley, 1930). Další velmi úspěšně se šířící druhy jsou například vstavač vojenský (*Orchis militaris*), který se rozšířil do oblasti vzdálené 100 km od zaznamenané lokality výskytu v Anglii (Waite & Farrell, 1998), nebo vstavač opička (*Orchis simia*), jehož semenáče byly nalezeny ve vzdálenosti asi 250 km od nejbližší známé lokality výskytu (Bateman & Farrington, 1989; Hedrén *et al.*, 2018).

Stejně tak mohou být malá semena s velkým obsahem vzduchu šířena hydrochoricky, tedy pomocí vody. I další charakteristické znaky, které u části orchidejových semen nacházíme, by mohly být dobré adaptace k šíření vodou. Jedná se o pevné vnější osemení, které je obtížně smáčitelné (Arditti *et al.*, 1982; Rasmussen, 1995; Arditti & Ghani, 2000 a citace zde uvedené). Schopnost semen plavat dále může umocňovat struktura vnějšího osemení (Kurzweil, 1994). Vztlak semen je posílen vzduchovými bublinami, které se zachytávají ve strukturách povrchu vnějšího osemení (Rasmussen, 1995).

Další možností šíření semen orchidejí je jejich přenos na tělech suchozemských zvířat (srst, chlupy, bláto na částech těla) a na tělech ptáků (peří, bláto na nohách) (Garay, 1964). Semena některých orchidejí jsou šířena myrmekochorně prostřednictvím mravenců (např. Benzing & Clements, 1991; Morales-Linares *et al.*, 2018). Mimo jiné byla myrmekochorie popsána i u epifytické orchideje *Dendrobium insigne*, jejíž semena jsou mravenci častěji než jako zdroj obživy využívána jako stavební materiál (Benzing & Clements, 1991). U mravenců *Azteca gnava*

tvořících mravenčí zahrady bylo zjištěno, že preferují některá semena. Jedná se o semena rostlin, které typicky nacházíme v těchto zahradách – například *Coryanthes picturata*, *Epidendrum pachyrachis* nebo *Epidendrum flexuosum*. Navíc množství odnesených semen korelovalo s četností výskytu jednotlivých druhů v mravenčích zahradách. Naopak mravenci vůbec neodnášeli semena druhů, které v zahradách vůbec nenacházíme. Rostlinné druhy typické pro mravenčí zahrady tvoří větší semena, než zkoumané druhy, jejichž semena si mravenci neodnesli (Morales-Linares *et al.*, 2018).

Dalším způsobem šíření semen orchidejí je endozoochorie. Tedy šíření prostřednictvím zvířat, která semeno zkonzumují a později jej vyloučí společně s trusem. Semena musí být tomuto způsobu šíření dobře přizpůsobena, aby nedošlo k jejich poškození v trávicím traktu zvířete. Semenům hrozí mechanické poškození (Jarman, 1987; Razanamandranto *et al.*, 2004) i chemická skarifikace (Gardener *et al.*, 1993; Razanamandranto *et al.*, 2004; Robles *et al.*, 2005). Proto jsou endozoochorně šířená semena zpravidla chráněna tvrdým osemením (Cardoso *et al.*, 2008; D'Hondt & Hoffmann, 2011) a bývají kulatého či oválného tvaru (Razanamandranto *et al.*, 2004). Jedním z příkladů je rod vanilka (*Vanilla*). K šíření semen využívá některé druhy ptáků (Pansarin, 2021) nebo malé savce (Pansarin & Suetsugu, 2022). Stejně tak primárně na ptáky cílí i *Neuwiedia singaporeana*, která vytváří červené dužnaté plody (Zhang *et al.*, 2021) či *Cyrtosia septentrionalis* (Suetsugu *et al.*, 2015). Méně obvyklé prostředníky a sice koníkovité (*Rhaphidophoridae*) a cvrčkovité (*Gryllidae*) využívá k endozoochornímu šíření semen *Apostasia nipponica* (Suetsugu, 2020) či *Yoania japonica* (Suetsugu, 2018).

5. METODIKA

Práce vychází z úvahy, že fyzikální dormance, jakožto nepropustnost osemení, je v přírodě porušována přirozenými mechanismy, aby byl umožněn přístup vody k vnitřnímu částem semene. Tyto mechanismy lze v laboratorních podmínkách simulovat pomocí různých ošetření semen. Jednotlivé typy ošetření semen mají odlišný projev na struktuře a vlastnostech semen, což bylo testováno třemi metodami – výsevem semen, testováním jejich propustnosti pro vodu a histochemickou analýzou. Jako hlavní modelové organismy byly zvoleny dva druhy, jeden snadno klíčící (*Dactylorhiza majalis*) a jeden v umělých podmínkách obtížně klíčící (*Epipactis helleborine*). Obtížně klíčící druh byl vybrán zejména kvůli předpokládané fyzikální dormanci semen, snadno klíčící druh byl naopak vybrán jako kontrola. Třetím testovaným druhem byl obtížně klíčící *Epipactis atrorubens*, od kterého bylo pro účely této práce nakonec upuštěno.

5.1. Příprava materiálu

5.1.1. Příprava médií

5.1.1.1. Pevná média

Semena byla kultivována na živném médiu BM-2, které bylo kupováno jako předpřipravený instantní prášek obsahující CleriGel™ neboli Gelrite® (HiMedia Laboratories, Indie, Bombaj – 400 086, via Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Swastik Disha Business Park). 24,2 gramu suché směsi bylo smícháno s přibližně 500 ml destilované vody v plastové nádobě s objemem 1 l. Následně bylo do nádoby vloženo elektromagnetické míchadlo a nádoba byla umístěna na elektromagnetickou míchačku. Za stálého míchání bylo do média přidáno 0,5 g na 1 l média aktivního uhlí (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha 4 - Nusle, Na Hřebenech II 1718/10, 140 00). Po jeho úplném rozmíchání byla suspenze přelita do odměrného válce a destilovanou vodou byl doplněn objem na 1 litr. Následně bylo médium přelito zpět do původní nádoby s elektromagnetickým míchadlem. Je potřeba dát pozor, aby na dně a stěnách válce nezůstaly nerozpuštěné složky média (tedy aktivní uhlí a CleriGel™ neboli Gelrite®). Za pomoci pH metru (Orion 410 A+) a 2 mol KOH bylo upraveno pH na hodnotu 5,8. Po úpravě pH bylo médium v nádobě pomocí mikrovlnné trouby přivedeno k varu. Po vyjmutí z mikrovlnné trouby bylo médium zamícháno, neboť uhlí sedimentuje, a rozlito do autoklávovatelných skleněných lahví o objemu 0,5 l. Plastové víčko u lahví nesmí být zcela utaženo, aby v průběhu autoklávování nehrozila jejich exploze. Doporučuje se víčko lahve zašroubovávat do okamžiku, kdy to začne jít „ztuha“ a následně o jeden a půl otočky povolit. Autoklávovací proces probíhal 20 minut při dosažení teploty 121 °C a tlaku 0,144 MPa.

Po vyjmutí lahví z autoklávu byla ihned utažena víčka a po mírném zchladnutí bylo médium ve flow boxu rozlito do Petriho misek (Ø 9 cm; P-LAB as., Praha 3, Olšanská 2643/1a, 130 00). Uzavřené misky se živným médiem byly sterilně uchovány na pozdější využití v lednici, nebo krátkou dobu (max. týden) při pokojové teplotě v temnu a suchu.

Pro udržovací kulturu hub bylo připraveno OMA médium (tabulka 1). Po navážení jednotlivých složek a doplnění objemu na 1 l (pH nebylo upravováno), bylo médium rozvařeno v mikrovlnné troubě. Následně bylo médium autoklávováno a rozlito do Petriho misek (Ø 9 cm; P-LAB as., Praha 3, Olšanská 2643/1a, 130 00).

	v 1 l ddH ₂ O
Mleté ovesné vločky (HiMedia Laboratories, Indie, Bombaj – 400 086, via Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Swastik Disha Business Park)	3 g
Agar (Duchefa, Nizozemsko, BH Haarlem 2031, A. Hofmanweg 71)	10 g

Tabulka 1 OMA médium.

5.1.1.2. Tekutá média

Média byla připravována stejným postupem jako tuhá živná média (kapitola 3.1.1.1. Pevná média), avšak namísto suché předpřipravené směsi byly jednotlivé složky naváženy a nebyl přidán a rozvařen agar. Po autoklávování a úplném vychladnutí obsahu (ideálně druhý den) bylo médium rozlito do sterilních plastových kultivačních lahví (R.CNA7.1 - Lahvička kultivační pro suspenzní kultury s filtrem ve víčku | GREINER BIO-ONE - 250 cm³; Greiner Bio-One GmbH, Rakousko, 4550 Kremsmünster, Bad Haller Str. 32) určených k uchovávání kultur v tekutém živném médiu. Tyto lahve mají hydrofobní povrch a hydrofobní filtr porozity 0,2 µm ve víčku, který umožňuje výměnu plynů. Do každé nádoby bylo nalito 20 ml živného média, což při položení kultivační nádoby vytvořilo velice tenkou vrstvu. Byla testována dvě média – MMN (tabulka 3) a Czapkův-Doxův agar (tabulka 2) U obou médií jsem upravila pH pomocí 1M NaOH, nebo 1M HCl. Při přípravě médií byl použit rozmrazený zásobní roztok Fe EDTA, který byl připraven tak, že jednotlivé složky (FeSO₄*7H₂O a Na₂EDTA*2H₂O) byly během rozpouštění v destilované vodě zahřívány, po úplném rozpouštění smíchány a po vychladnutí v tomto stavu po 5 ml zamrazeny při – 20 °C.

	v 1 l ddH ₂ O
sacharóza	30 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
NaNO ₃	3 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,01 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	15 g
pH (+ HCl)	7,3

Tabulka 2 Czapek-Doxův agar (Czapek, 1903; Dox, 1909).

	v 1 l ddH ₂ O
NH ₄ H ₂ PO ₄	250 mg
KH ₂ PO ₄	500 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	150 mg
CaCl ₂ *2H ₂ O	50 mg
NaCl	25 mg
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8 mg
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37,3 mg
Glukóza	10 g
Malt extrakt	3 g
Thiamin HCl	0,1 g
pH (+ NaOH)	5,8

Tabulka 3 MMN médium (Smith, 1982).

5.1.2. Příprava semen

5.1.2.1. Sběr a skladování

Sběr semen v terénu zajišťoval školitel Dr. Jan Ponert na lokalitách uvedených v tabulce 4. Celá plodenství byla sbírána ve fázi plné zralosti s částečně pootevřenými semeníky, následně umístěna do papírových sáčků a skladována v suchu při pokojové teplotě. Semena byla používána 1–15 měsíců po sběru.

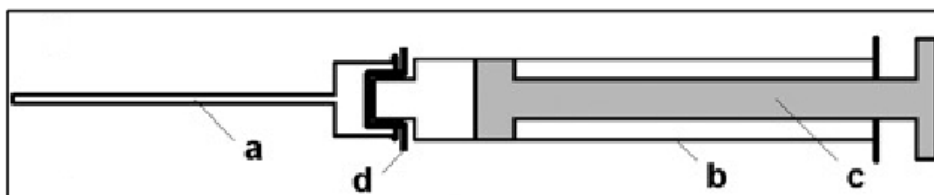
Druh	Datum sběru	Místo sběru
prstnatec májový (<i>Dactylorhiza majalis</i>)	24.7.2020	Botanická zahrada hl. m. Prahy, v zahradní kultuře
kruštík širolistý (<i>Epipactis helleborine</i>)	2.10.2020	Polnička, Nový Mlýn
kruštík tmavočervený (<i>Epipactis atrorubens</i>)	24.9.2020	Julčín, Na Černčí

Tabulka 4 Lokality sběru semen.

5.1.2.2. Příprava před experimentální částí

Semena byla vyjmuta ze semeníků a byly odstraněny případné nečistoty. Tato část práce probíhala na čistém papíře, aby se zabránilo případné kontaminaci semeny jiného druhu, se kterými se v laboratoři také pracuje. Malé množství semen bylo pomocí pinzety vloženo do 5 ml

injekční stříkačky (P-LAB as., Praha 3, Olšanská 2643/1a, 130 00), s jehlou 1,2x40 mm (S.A.B. Impex, s.r.o., Brno, Firemní 710/2, 619 00), mezi nimiž byla vložena jemná nylonová síťovina (obrázek 3).



Obrázek 3: Secí aparát pro výsev semen (Ponert *et al.*, 2011); a- jehla, b- stříkačka, c- píst, d- nylonová síťovina (převzato z Šoch, 2017).

5.1.3. Příprava hub

5.1.3.1. Udržovací kultura

Sbírka hub je dlouhodobě udržována na médiu OMA v kultivačním boxu ve tmě při teplotě 20°C. Kultury hub jsou pravidelně přeočkovávány na nové médium OMA tak, že je z původní kultury vykrojen malý segment (zhruba 3 × 3 mm), který je umístěn do středu nového OMA média v Petriho misce. Stejným způsobem jsou zakládány kultury, které jsou po nárůstu mycelia využity v experimentech. V této diplomové práci bylo pracováno se zavedenými kulturami hub, se kterými jsme již v týmu dříve pracovali. I díky tomu byly již tyto kultury uvedené v GenBank a byl u nich určen rod (Figura *et al.*, 2021). Přehled použitých hub, jejich značení a sekvence uvedená v GenBank je v tabulce 5.

Označení houby v DP	Rod houby	Původní označení	Sekvence v GenBank
Cer1	<i>Ceratobasidium</i>	A36	KY014293
Cer2	<i>Ceratobasidium</i>	CerOTU14	MT733820
Tul	<i>Tulasnella</i>	Tul7n	MT733821
Seb	<i>Serendipita</i>	SEB1	MK951654

Tabulka 5 Přehled používaných kultur hub a jejich klasifikace.

5.1.3.2. Kultura v tekutém živném médiu

Z udržovací kultury s houbovým myceliem byl vykrojen segment (přibližně 3×3 mm), který byl přenesen do kultivační lahve, a k segmentu bylo následně přilito 20 ml tekutého média. Lahve byla pevně uzavřena pro zachování sterilních podmínek (viz kapitola 3.1.1.2. Tekutá média). Kultivace hub probíhala v kultivačním boxu ve tmě při teplotách 17±1 °C. Lahve s tekutým živným médiem a kostičkou pevného média s myceliem byly položeny a nebylo s nimi hýbáno, aby byla možná nenarušená tvorba mycelia na médiu. Na pozdější využití byla ponechána malá část (min 5 ml) sterilních tekutých médií. Uskladněna byla v plastových zkumavkách při laboratorní teplotě ve tmě.

5.2. Experimentální část

5.2.1. Ošetření semen

Pro testování fyzikální dormance byla semena rozdělena do skupin neošetřených semen, ošetřených anorganickými chemickými sloučeninami, ošetřených houbovými exudáty a vystavených působení pouze destilované vody. Pro zvýšení smáčivosti u některých variant předcházelo ošetření 70% EtOH.

5.2.1.1. Anorganické chemické sloučeniny

Jako anorganické sloučeniny byly vybrány roztok chlorového vápna, SAVO a kyselina sírová v kombinaci s roztokem chlorového vápna. Chlorové vápno i SAVO jsou pro desinfekci semen různých orchidejí před výsevem používány standartně. Kombinace kyseliny sírové (H_2SO_4) a chlorového vápna je někdy používána u obtížně klíčících druhů (např. Malmgren, 1993).

5.2.1.1.a. Chlorové vápno

Příprava roztoku chlorového vápna:

1. Odváženo 20 g komerčního chlorového vápna (KITTFORT PRAHA s.r.o., Praha, Radlická 608/2, 150 00) do Erlenmayerovy baňky.
2. K chlorovému vápnu bylo přidáno 100 ml destilované vody.
3. Baňka byla uzavřena alobalem a za občasného promíchání krouživým pohybem bylo vápno rozpouštěno po dobu min 90 minut.
4. Filtrace směsi přes filtrační papír; opět je vhodné přikrýt alobalem, aby se do místnosti neuvolňoval plynný chlor.
5. Přidání kapky smáčedla Tween 20 (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha 4 – Nusle, Na Hřebenech II 1718/10, 140 00) poloautomatickou pipetou s ustříženou plastovou špičkou.
6. Promíchání.

Do secího aparátu (viz obrázek 3 v kapitole 3.1.2.2. Příprava před experimentální částí) se semeny byl nejprve nasát 70% EtOH, následovalo promytí destilovanou vodou ve třech krocích a nasátí roztoku chlorového vápna, po kterém opět následovalo promytí sterilní destilovanou vodou ve třech krocích. Oba roztoky byly v polovině doby desinfekce, nebo nejpozději po 20 minutách, vyměněny za čerstvý roztok, délky ošetření jsou uvedeny v tabulkách 6, 7 podle typu testování.

70% EtOH [min]	0	4	4	4	4	4
Ca(OCl) ₂ + Tween 20 [min]	4	4	10	15	30	60

Tabulka 6 Doba trvání ošetření roztokem chlorového vápna pro výsev.

70% EtOH [min]	4	4	4
Ca(OCl) ₂ + Tween 20 [min]	10	30	60

Tabulka 7 Doba trvání ošetření roztokem chlorového vápna pro testování propustnosti a histochemii.

5.2.1.1.b. SAVO

Postup ošetření byl stejný jako v kapitole 3.2.1.1.a. Chlorové vápno a roztok chlorového vápna byl nahrazen 15% SAVO Original (Unilever Praha, spol. s.r.o.; Praha – Libeň, Voctářova 2497/18, 180 00). Doby jednotlivých ošetření jsou uvedeny v tabulce 8. Časové schéma bylo zvoleno na základě stanovení času, kdy semena získala barvu slonové kosti (Vejsadová, 2006); v našem případě po 60 minutách a pak bylo k tomuto času opakovaně přičítáno či odečítáno 15 minut.

70% EtOH [min]	4	4	4	4	4
15% SAVO [min]	30	45	60	75	90

Tabulka 8 Doba trvání ošetření SAVO.

5.2.1.1.c. H₂SO₄ a roztok chlorového vápna

Postup byl opět stejný jako v kapitole 3.1.2.2. Příprava před experimentální částí s tím rozdílem, že kroku s roztokem chlorového vápna (postup přípravy stejný jako v kapitole 3.2.1.1.a. Chlorové vápno) předcházelo ošetření 2% H₂SO₄ a mezi těmito kroky nedošlo k promytí destilovanou vodou. Jednotlivé délky ošetření jsou uvedeny v tabulce 9.

70% EtOH [min]	5	5	5
2% H ₂ SO ₄ [min]	10	30	60
5% Ca(OCl) ₂ + TWEEN 20 [min]	10	10	10

Tabulka 9 Doba trvání ošetření H₂SO₄ a roztokem chlorového vápna.

5.2.1.2. Houbové exudáty

V této části byly použity houbové izoláty získané dříve z orchidejí (tabulka 5), u nichž byla potvrzena schopnost tvorby orchideoidní mykorhizy (Figura *et al.*, 2021). Konkrétně se jedná o zástupce rodů tulasneovka (*Tulasnella*), pokrytka (*Sebacina*) a stopečník (*Ceratobasidium*), s cílem zahrnout zástupce hlavních skupin kultivovatelných orchideoidních mykorhizních hub.

Houbové izoláty byly kultivovány na tekutém médiu až do fáze, kdy mycelium zarostlo většinu objemu média. Zástupci rodů *tulasneovka* a *stopečník* rostli rychleji a k dalšímu zpracování tak mohlo dojít již po 42 dnech kultivace. Zástupce rodu *pokrytka* roste výrazně pomaleji, takže jeho kultivace tak stále probíhá a nebyl použit v dalších experimentech. Tekuté médium bylo po kultivaci odsáto z kultivační lahve pomocí 5 ml stříkačky se závitem a jehlou o průměru 0,8 mm. Jehla byla následně vyměněna za 1µm filtr Pall® Acrodisc®, obsahující skleněná vlákna (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha 4 - Nusle, Na Hřebenech II 1718/10, 140 00), přes který byl obsah stříkačky přečištěn do plastové zkumavky. Přečištěné médium bylo odsáto novou stříkačkou s jehlou o průměru 0,8 mm a opět přefiltrováno, tentokrát přes filtr 0,45 µm (Rotilabo® Ø33 mm). Při obou filtracích bylo nutné vytvářet nízký tlak na píst, aby nedošlo k protržení filtru.

Získaným roztokem přečištěného média byla ošetřena semena. Ta byla nejprve krátce desinfikována, a to nejprve po dobu 1 min máčena v 70% EtOH, následně třikrát promyta destilovanou vodou, po dobu 10 min povrchově sterilizováno roztokem chlorového vápna (bez smáčedla TWEEN20), který byl v polovině času vyměněn za čerstvý, a opět třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Poté byla semena ponechána v roztoku přečištěného média po dobu 20 h a poté jednou promyta sterilní destilovanou vodou.

5.2.1.3. Destilovaná voda

Do secího aparátu se semeny byla nasáta destilovaná voda a opakovaným vytlačováním a opětovným nasáváním vody bylo ze stříkačky odstraněno co nejvíce vzduchu vázaného na hydrofobní povrch semen. Stříkačka byla umístěna do lednice (6 °C bez přístupu světla), každý týden byla odebírána malá část semen pro testování vlivu ošetření a zbylá semena byla zatřesením promíchána pro zlepšení kontaktu s vodou. V případě potřeby byla do stříkačky doplňována destilovaná voda.

5.2.2. Testování vlivu ošetření

Účinky ošetření popsaných v kapitole 3.2.1. Ošetření semen bylo třeba otestovat, což lze výsevem a následnou dlouhodobou kultivací *in vitro*, bezprostředním testováním propustnosti pro vodu nebo histochemickou detekcí složek osemení. Kombinace postupů jsou rozepsány v tabulce 10. testování propustnosti nebylo provedeno u experimentálních variant s velice nízkou či nulovou klíčivostí. Výsev *in vitro* nebyl proveden u variant, kde semena nebyla desinfikována.

		Typ testování		
		Výsev	Propustnost	Histochemie
Způsob ošetření semen	Neošetřená	X	<i>D. majalis</i> <i>E. helleborine</i>	<i>D. majalis</i> <i>E. helleborine</i>
	Chlorové vápno	<i>D. majalis</i> <i>E. atrorubens</i> <i>E. helleborine</i>	<i>D. majalis</i> <i>E. helleborine</i>	<i>D. majalis</i> <i>E. helleborine</i>
	SAVO	<i>E. atrorubens</i> <i>E. helleborine</i>	X	X
	H ₂ SO ₄ a chlorové vápno	<i>E. atrorubens</i> <i>E. helleborine</i>	X	X
	Houbový "výluh"	<i>D. majalis</i> <i>E. helleborine</i>	X	X
	ddH ₂ O	X	<i>D. majalis</i> <i>E. helleborine</i>	<i>D. majalis</i> <i>E. helleborine</i>

Tabulka 10 Přehled kombinací způsobů ošetření semen a typů testování u jednotlivých druhů orchidejí.

5.2.2.1. Výsev

U secího aparátu s připravenými ošetřenými semeny byla vyměněna jehla za jehlu 1,8x40 mm (S.A.B. Impex Brno-jih, Firemní 710/2, 619 00), aby při výsevu nedošlo k poškození semen, a byla odstraněna nylonová síťovina. Malé množství vody se semeny bylo vystříknuto na médium BM-2 v Petriho misce, která byla následně uzavřena dvěma pruhy (10x2 cm) parafilmu (P-LAB as., Praha 3, Olšanská 2643/1a, 130 00). Vyseta byla semena ošetřená způsoby uvedenými v tabulce 10.

Semena byla v Petriho miskách kultivována ve tmě (v papírové krabici) při teplotě 22±1 °C. Kultivace ve tmě byla přerušena pouze po dobu kontroly případných kontaminací, při přesunech do chladu, nebo při počítání klíčivosti. Ke kontrole docházelo po 3 dnech a 2 týdnech po výsevu. Semena kruštíku šiolistého i tmavočerveného byla po měsíci inkubace vystavena tříměsíční chladové stratifikaci při 4,9 °C. Semena prstnatce májového byla po celou dobu v kultivační místnosti s teplotami 22±1 °C.

5.2.2.1.a. Získávání dat o klíčivosti semen

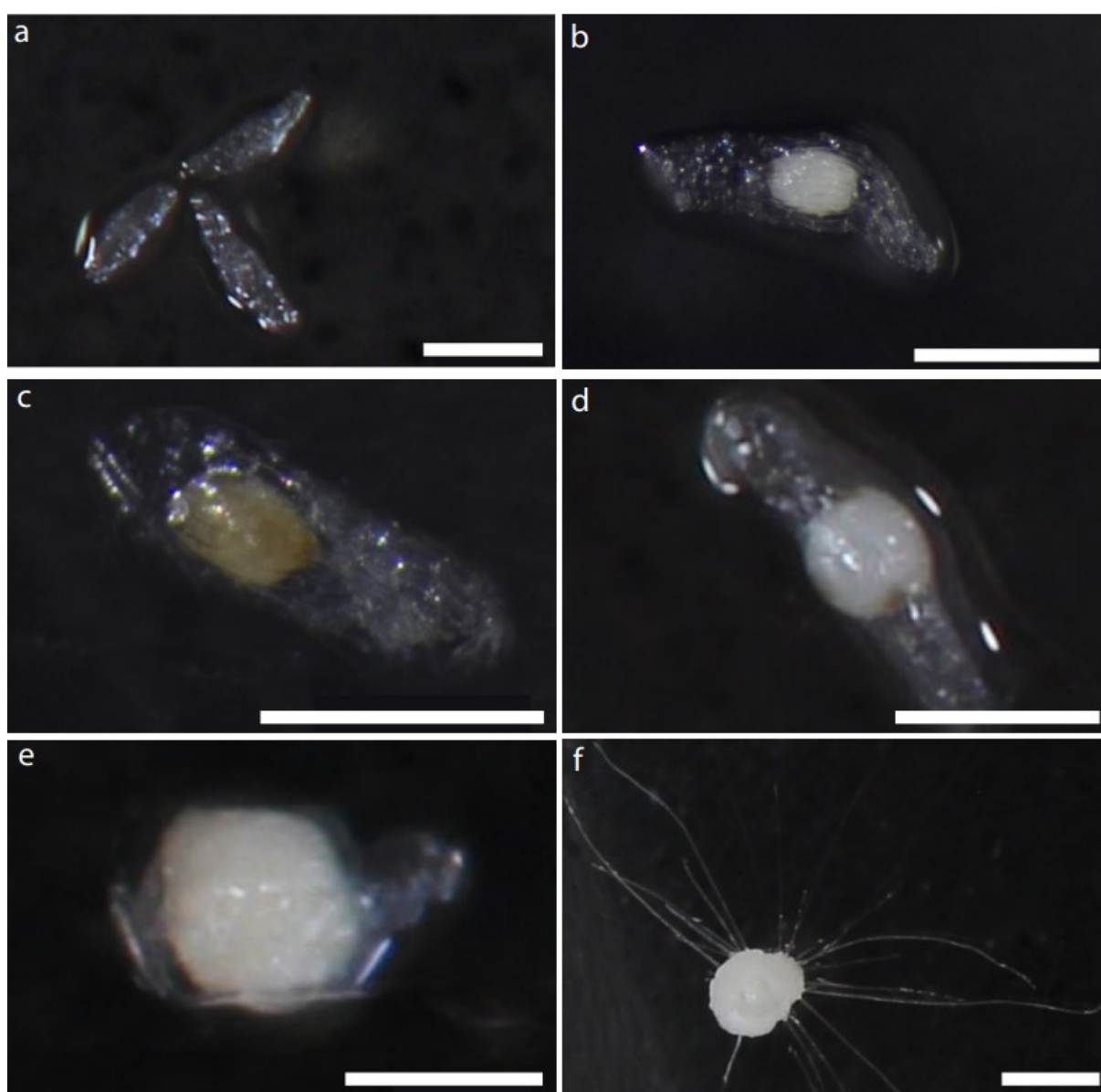
Petriho misky s médiem, na kterých byla vyseta semena, jsem v pravidelných intervalech kontrolovala a sledovala jsem změny v klíčivosti. Aby bylo pozorování po celou dobu konzistentní, stanovila jsem čtyři kategorie, do kterých jsem semena zařazovala. Příklady semen v jednotlivých kategoriích vidíme na obr. 4. V pravidelných intervalech byly Petriho misky pod binolupou kontrolovány a v náhodně vybraných oblastech byla počítána semena v jednotlivých kategoriích. V případě prstnatce májového byla klíčivost stanovována jednou za měsíc po dobu 4 měsíců a po 6 měsících od výsevu. Semena obou kruštíků byla počítána těsně před uložením do chladu, ihned po ukončení kultivace v chladu a následně v měsíčních intervalech až do uplynutí 6 měsíců od

konce chladové stratifikace. Klíčivost byla stanovena jako poměr vyklíčených semen vůči celkovému počtu vyvinutých semen (tedy bez kategorie 1. Nevyvinutá semena).

1. Nevyvinutá semena (obrázek 4 a) – zahrnuta prázdná osemení a semena s na první pohled nedostatečně vyvinutým embryem.
2. Neaktivní semena (obrázky 4 b, c) – embryo je u těchto semen vyvinuté, ale zatím se nezvětšuje; případně se začalo mírně zvětšovat, ale zatím nedosáhlo k okraji vnějšího osemení.
3. Bobtnající semena (obrázek 4 d) – u nich je embryo viditelně zvětšeno, dotýká se osemení nebo na něj tlačí a tím ho rozšiřuje.
4. Vyklíčená semena (protokormy, mladé rostliny) (obrázky 4 e, f) – protržené osemení nebo vytvořené vlásky vně osemení.

5.2.2.1.b. Analýza dat o klíčivosti semen

Vzhledem k faktoriálnímu uspořádání experimentů (vliv typu ošetření a času) byla získaná data vizualizována dvěma přístupy. Data ze všech variant daného experimentu jsou prezentována formou průměrů v trojrozměrných grafech, což umožňuje základní orientaci v daném experimentu. Další analýza spočívala v analýze vybraných situací z daných experimentů, kdy byl analyzován vliv jednoho faktoru pouze při určité vybrané hodnotě druhého faktoru. Tyto vybrané situace byly vizualizovány boxploty a statisticky analyzovány následujícím způsobem. Nejprve byla ověřena normalita dat a homogenita rozptylů jednotlivých variant. Podle toho byla data analyzována buď analýzou rozptylu (ANOVA) a následným Tukeyho testem (Kramer, 1956), nebo (v případě nesplnění předpokladů ANOVA) byla analyzována Kruskalovým–Wallisovým testem (Kruskal & Wallis, 1953) a párová porovnání byla provedena dvouvýběrovým Wilcoxonovým testem pro nezávislé skupiny (Mann & Whitney, 1947). Hladina průkaznosti byla ve všech případech 5 %. Analýzy byly provedeny v programu R 3.6.1 (R Core Team, 2019). Protože je pro interpretaci zde provedených experimentů zásadní porovnání variant mezi sebou, nikoliv porovnání vlivu dvou zkoumaných faktorů, tak jsem neprovedla dvoucestnou analýzu rozptylu.



Obrázek 4 Přehled kategorií semen, které byly v pravidelných intervalech počítány; měřítko = 500 μ m.

5.2.2.2. Testování propustnosti osemení

Pro analýzu propustnosti osemení byl využit secí aparát obrázek 3 kapitola 3.1.2.2. Příprava před experimentální částí pro zajištění homogenity barvení. Byl tvořený 2ml stříkačkou (menší spotřeba histochemických barviv), nylonovou síťovinou (zabránění úniku semen) a 1,8mm jehlou (snazší průchod semen). Ošetřená semena v secích aparátech byla barvena látkami rozpustnými ve vodě, které umožňují vizualizovat oblasti semen, do kterých voda prostoupila.

Pozorování a snímání probíhalo nejčastěji na mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Japan, Tokyo) s filtr bloky (Olympus U-MWU, U-MWB a U-MWG) a digitální kamerou Apogee U4000

(Apogee Imaging Systems, USA, CA, Roseville), nebo na konfokálním mikroskopu LeicaSP8. Stejně tomu bylo i při histochemické analýze (kapitola 3.2.2.3. Histochemická analýza vlastností osemení).

5.2.2.2.a. Pilotní experiment

V rámci pilotního experimentu bylo provedeno několik různých testů propustnosti s cílem vybrat nejvhodnější testy pro následnou detailní analýzu propustnosti osemení obou druhů orchidejí v jednotlivých variantách ošetření (viz 3.2.2.2.b. Hlavní experiment). Bylo vyzkoušeno několik sond propustnosti (tzv. apoplastických sond) – látek, které se v pletivech rostliny pohybují především apoplastem a jejich lokalizaci je možno následně detekovat na řezech nebo i v celých objektech (Pecková *et al.*, 2016). Jako materiál pro pilotní experimenty byla použita semena prstnatce májového – neošetřená a ošetřená roztokem chlorového vápna po dobu 60 min. Ve všech případech byla do roztoku zvolené apoplastické sondy namáčena celá semena. Použité postupy jsou podrobněji popsány níže a byly převzaty z Soukup, 2014; Pecková *et al.*, 2016. Na základě dosažených výsledků jsme vybrali nejvhodnější test pro propustnost vnějšího osemení a jeden pro vnitřní osemení. Tyto dva testy pak byly použity v Hlavním experimentu (kapitola 3.2.2.2.b. Hlavní experiment).

Test propustnosti pomocí berberin hemisulfátu

K barvení byl použit roztok 0.05 % (w/v) berberin hemisulfátu v destilované vodě (Enstone & Peterson, 1992; Soukup, 2014). Semena v něm byla inkubována 60 min v secím aparátu. Následně byla 6x nasáta a odstříknuta destilovaná voda. Obarvená semena byla umístěna na podložní sklíčko a byla montována do 65% glycerolu. Následovalo snímání na konfokálním mikroskopu LeicaSP8 při excitaci 405 nm a emisi 530-570 nm a vizuální vyhodnocení, v jakém rozsahu došlo k probarvení embrya. Příklady jednotlivých kategorií jsou zachyceny v obrázku 13. Berberin barví především lignifikované buněčné stěny, ale méně specificky i nemodifikované buněčné stěny, cytoplasmu a jádro (Brundrett *et al.*, 1988).

Test propustnosti pomocí PTS (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid trisodium salt; trisodná sůl kyseliny 8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonové)

Nejprve byl připraven 0,1% (w/v) barvicí roztok PTS v destilované vodě (Moon *et al.*, 1986). Vždy bylo pracováno s čerstvě připraveným roztokem. PTS nebarví buněčné stěny při průchodu pletivem, je proto nutno pozorovat jeho okamžitou lokalizaci v jednotlivých částech semene, které je roztoku PTS vystaveno nebo mu bylo vystaveno krátce před pozorováním. Test propustnosti pomocí PTS proto probíhal dvěma způsoby:

1. Přímo v mikroskopu – během pozorování byl roztok barviva o koncentraci 0,1 % přikapáván přímo k semenům na podložním sklíčku, která na něm byla umístěna v destilované vodě. Roztok PTS postupně difundoval k semenům a díky tomu mohlo být zaznamenáváno postupné probarvování semene bezprostředně po kontaktu s roztokem PTS. Snímání probíhalo v mikroskopu Olympus BX51 při excitaci modrým světlem (filtr blok Olympus U-MWB) a doba expozice byla vždy 0,5 s.
2. V secím aparátu – do secího aparátu bylo nasáto 0,5 ml roztoku PTS (koncentrace 0,1 %), aparát byl několikrát opatrně překlopen pro homogenní promíchání a bez prodlení byla semena přenesena na podložní sklíčko a okamžitě sekvenčně snímána při stejném nastavení mikroskopu Olympus BX51 jako při barvení přímo v mikroskopu. Pozorování jsme ověřili i na konfokálním mikroskopu Leica SP8 (excitace 405 nm, emise 513-540 nm; dle Hanson *et al.*, 1985).

Test propustnosti pomocí FDA (fluorescein diacetát) a PI (propidium jodid)

Byl použit 0,2% (w/v) zásobní roztok FDA v acetonu a zásobní roztok 0,1% (w/v) PI v PBS (fosfátem pufrovaný solný roztok; tabulka 11). Z obou zásobních roztoků bylo použito 200 µl na celkový objem 2 ml v destilované vodě, čímž byl připraven barvicí roztok. K semenům byl na podložní sklíčko přikápnut barvicí roztok, snímání probíhalo bezprostředně po obarvení v mikroskopu Olympus BX51 při excitaci modrým nebo zeleným světlem (filtr bloky Olympus U-MWB a U-MWG) po dobu 0,5 s. Princip tohoto barvení spočívá v tom, že FDA je v živých buňkách štěpeno buněčnými esterázami, čímž dochází ke vzniku fluoresceinu, který emituje zelenou fluorescenci po ozáření modrým světlem. Díky tomu můžeme detekovat živé buňky. PI se váže na DNA (deoxyribonukleová kyselina) v mrtvých buňkách a po ozáření zeleným světlem pozorujeme červenou fluorescenci jader mrtvých buněk (Jones & Senft, 1985). PI také barví buněčné stěny (Rounds *et al.*, 2011).

Chemikálie	složení
10x PBS	80,1 g NaCl, 2 g KCl, 14,7 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O a 2,38 g KH ₂ PO ₄ doplnit do 1 l ddH ₂ O, pH 6,8
1x PBS	Smíchat 100 ml 10x PBS a 900 ml H ₂ O, pH 7,3

Tabulka 11 Složení PBS (phosphate buffered saline, fosfátem pufrovaný solný roztok).

Test propustnosti pomocí 5,6-CFDA (5,6-karboxyfluorescein diacetát)

Barvicí roztok byl zhotoven smícháním 3 µl zásobního roztoku (1 mg 5,6-CFDA na 100 µl DMSO (dimethylsulfoxid) a 1 ml destilované vody (Botha *et al.*, 2008). Semena byla krátce barvena v secích aparátech, snímání probíhalo 0,5 s v mikroskopu Olympus BX51 při excitaci modrým světlem (filtr blok Olympus U-MWB). Princip tohoto barvení je velmi podobný FDA, jako štěpný

produkt vzniká fluorescenční karboxyfluorescein. Po excitaci modrým světlem pozorujeme zelenou fluorescenci.

Test propustnosti pomocí železnatých kationtů

Principem testu je pronikání iontů železa do pletiv, kde je jejich lokalizace následně detekována. Při testu byla semena v secím aparátu namočena na 30 min do 25 mM vodného roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, poté 4x omyta destilovanou vodou. Následně byly z těchto semen zhotoveny kryorezy (viz kapitola 3.2.2.3.a. Příprava řezů na kryotomu). Histochemická detekce lokalizace železa v pletivech proběhla na řezech následujícím postupem (dle (Meyer *et al.*, 2009; Pecková *et al.*, 2016)). Řezy byly ošetřeny po dobu 15 min 1% (w/v) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ v 0,5% (w/w) HCl, aby bylo možné lokalizovat železo jako modrou nerozpustnou sraženinu $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. Pro ověření správnosti barvení byly vytvořeny i odpovídající pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola sloužily řezy, které byly přímo vystaveny působení 25 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ po dobu 30 min a následně u nich byla provedena detekce železa pomocí $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. U těchto řezů byl zajištěn přímý kontakt roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se všemi částmi analyzovaných pletiv a mohlo tak být ověřeno, že následná detekce ionty železa dostatečně spolehlivě vizualizuje. Jako negativní kontrola sloužily řezy připravené ze semen neinkubovaných v roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, u kterých byla provedena detekce železa pomocí $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ stejným způsobem jako u řezů inkubovaných semen. Tímto způsobem byla ověřena možná nativní přítomnost iontů železa v pletivech. Následovalo montování do 50% (v/v) glycerolu a pozorování v mikroskopu Olympus BX51 ve světlém poli.

Test propustnosti pomocí PARS (kyselina jodistá-redukční činidlo-Schiffovo činidlo) reakce

Celé barvení probíhalo v secím aparátu. Semena byla po dobu 30 min inkubována v 0,02% (w/v) vodném roztoku kyseliny jodisté (H_5IO_6) (Pearse, 1968; Soukup, 2014; Pecková *et al.*, 2016). Následně byla 4x omyta destilovanou vodou a na 30 min namočena do redukčního činidla, které inaktivuje zbytky kyseliny jodisté. Z takto ošetřených semen byly připraveny kryorezy (kapitola 3.2.2.3.a. Příprava řezů na kryotomu). Kyselina jodistá při průchodu apoplastem oxiduje složky buněčné stěny a přeměňuje dioly na dialdehydy. Přítomnost aldehydických skupin byla na řezech detekována pomocí Schiffova činidla. Řezy byly 20 min barveny Schiffovým činidlem a 3 x 3 min omývány SO_2 vodou.

Redukční činidlo, Schiffovo činidlo a SO_2 voda byly připraveny podle Pearse, 1968 a Soukup, 2014. Pro přípravu redukčního činidla byl rozpuštěn 1 g KI a 1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v 50 ml H_2O a pak bylo přidáno 0,5 ml 2M HCl. Redukční činidlo je nutné vždy připravit čerstvé. Příprava Schiffova

činidla: byl rozpuštěn 1 g bazického fuchsinu v 200 ml vroucí destilované vody. Tento roztok byl míchán 5 min a zchlazen na 50 °C, pak přefiltrován přes filtrační papír. Následně bylo přidáno 20 ml 1M HCl a zchlazen na 25 °C. Následně byl přidán a rozpuštěn 1 g Na₂S₂O₅. Tento roztok byl ponechán ve tmě po dobu 14–24 h, abychom získali světle žluto-oranžový nezakalený roztok. Pak bylo přidáno dostatečné množství aktivního uhlí (přibližně 2 g) a roztokem bylo po několik minut třepáno, následovala filtrace přes filtrační papír, čímž byl získán bezbarvý roztok. Je možné jej skladovat v neprůhledné láhvi ve tmě při teplotě 4 °C. Když se roztok začne zbarvovat, není již možné ho použít. Pro přípravu SO₂ vody bylo smícháno 5 ml 1 M HCl s 5 ml 10% K₂S₂O₅ a 100 ml H₂O. Rostok je možné po několik dní uchovávat v uzavřené láhvi.

Snímání probíhalo v mikroskopu Olympus BX51 ve světlém poli. Vzhledem k tomu, že v pletivu jsou přítomny i nativní aldehydické skupiny, byla nutná i odpovídající negativní kontrola. Ta byla připravena stejným postupem, pouze byl vynechán první krok, tedy inkubace semen v H₅IO₆.

5.2.2.2.b. Hlavní experiment

Na základě pilotních experimentů byly vybrány dva testy, které byly aplikovány na širokou škálu různě ošetřených semen. Byly zvoleny testy, které byly snadno proveditelné, a z nichž jsme získali dobře analyzovatelné výsledky. To nám umožnilo snímání velkého množství testovaných semen. Zároveň jsme během pilotních experimentů zjistili, že pro testování propustnosti vnitřního osemení je nezbytné semena odvzdušnit, aby se barvivo vůbec do vnitřních částí semene dostalo. Testovali jsme neošetřená semena a ošetřená semena způsoby, které jsou uvedené v tabulce 12. Vždy se jednalo o semena kruštíku šírolistého a prstnatce májového.

		Ošetření semen							
		Roztok chlorového vápno			Máčení v ddH ₂ O				
		10 min	30 min	60 min	7 dní	14 dní	24 dní	30 dní	
Použité barvivo	PTS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Berberin hemisulfát	x	✓	✓	x	x	x	x	
	Sudanová červeň	✓	✓	✓	x	x	x	x	
	Fluorol Yellow 088	✓	✓	✓	x	x	x	x	
	Berberin hemisulfát + genciánová violet	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Floroglucinol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Tabulka 12 Přehled způsobů ošetření semen k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) a barviv použitých při testování propustnosti těchto semen a při jejich histochemické analýze vlastností osemení.

Test propustnosti vnějšího osemení pomocí PTS (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid trisodium salt; trisodná sůl kyseliny 8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonové)

Jako nejvhodnější test propustnosti vnějšího osemení jsme zvolili test pomocí roztoku PTS (Peterson & Edgington, 1975; Pecková *et al.*, 2016). V tomto případě semena nebyla odvzdušňována, abychom zjistili, zda je vnější osemení propustné pro vodu. Barvení probíhalo v secím aparátu, což nám umožnilo sledovat semena, ke kterým měla voda rovnoměrný přístup, a to jak těsně po vystavení barvivu, tak v časových rozestupech. Druhým přístupem bylo přidání barviva na podložní sklíčko přímo v mikroskopu (kapitola 3.2.2.2.a. Pilotní experiment – část věnována PTS), díky čemuž jsme mohli sledovat případný vstup barviva do semen a snímat časové sekvence probarvování. Zároveň byl stanovován počet propustných a nepropustných semen těsně po vystavení barvivu a po 30 min inkubace. Jako propustná semena byla označena semena, u kterých bylo barvivo patrné v prostoru mezi vnitřním a vnějším osemením. Snímání probíhalo po excitaci modrým světlem na mikroskopu Olympus BX51 (filtr blok Olympus U-MWB).

Test propustnosti vnitřního osemení pomocí berberin hemisulfátu

Jako nejvhodnější test propustnosti vnitřního osemení jsme vybrali barvení 0,1% (w/v) roztokem berberin hemisulfátu (Brundrett *et al.*, 1988; Soukup, 2014). Abychom zajistili, že se barvivo dostane do vnitřních částí semene a budeme skutečně testovat propustnost vnitřního osemení, byla semena odvzdušňována pomocí vakuové vývěvy po dobu 1 hodiny. Snímání probíhalo na konfokálním mikroskopu LeicaSP8 v mediální rovině embrya (excitace 405 nm, emise 530-570 nm). Od každé varianty ošetření bylo snímáno 30 embryí, následně byla hodnocena míra jejich probarvenosti.

5.2.2.3. Histochemická analýza vlastností osemení

Histochemická analýza slouží k detekci jednotlivých složek rostlinného materiálu prostřednictvím histochemických barviv. Díky tomu můžeme popsat chemické vlastnosti jednotlivých částí semene. Detekce probíhala na celých semenech (barvení v secím aparátu kvůli homogenosti barvení), aby bylo možné pozorovat celistvé vnější osemení, a na řezech (zhotovených na kryotomu), díky čemuž bylo možno pozorovat detaily vnějšího i vnitřního osemení. Zaměřili jsme se převážně na detekci ligninu, kutinu a suberinu. Testována byla semena kruštíku širolistého a prstnatce májového. Vždy byla barvena neošetřená semena a způsoby ošetření, které jsou uvedené v tabulce 12.

5.2.2.3.a. Příprava řezů pomocí kryotomu

Ošetřená semena jsme zpočátku inkubovali přes noc ve 2% sacharóze z důvodu kryoprotekce. Ukázalo se však, že to není potřeba, a proto jsme od toho při vytváření dalších řezů upustili. Řezání na kryotomu Shandon probíhalo dle standartního postupu. Na kryogel (Cryo-Gel™, Leica microsystems, Germany, Wetzlar) byla nanesena semena, vzorek byl zmražen při teplotě -63 °C na namrazovací plošině. Pracovní teplota v kryotomu se pohybovala okolo -20 °C. Následně byly zhotovovány jednotlivé řezy o tloušťce 20 μm, které byly přemísťovány na podložní sklíčko potažené kamencovou želatinou. V této formě byly řezy uchovávány v lednici. Barvení řezů probíhalo přímo na podložním sklíčku.

Před samotným potahováním podložních sklíček kamencovou želatinou byly rozpuštěny 3 g čisté želatiny v 600 ml destilované vody za současného zahřívání na 45 °C. Po dosažení této teploty bylo přidáno 0,3 g kamencové soli ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), díky čemuž se roztok vyčeřil. Následovala filtrace přes filtrační papír a filtrát byl přemístěn do obdélníkové nádoby. Podložní skla byla narovnána do nosiče, odmaštěna umytím v myčce, opláchnuta destilovanou vodou a usušena. Nosič se suchými podložními skly byl na 10 s ponořen do roztoku přefiltrované želatiny. Pak byla skla umístěna do sušičky do 50–60 °C na 2 h, po kterých bylo máčení opakováno, aby se dosáhlo vyšší přilnavosti řezů. Máčení je možné znovu opakovat. Závěrečné sušení probíhalo v 50–60 °C po dobu 12 h.

5.2.2.3.b. Detekce ligninu

Okyselený floroglucinol

Semena byla barvena okyseleným floroglucinolem (nasycený roztok 1% (w/v) floroglucinolu v 18% vodném roztoku HCl) (Clifford, 1974; Pomar *et al.*, 2002; Soukup, 2014) po dobu 5 min, pak byla 3x omyta destilovanou vodou. Montováno do okyseleného 50% glycerolu (směs 75 % glycerolu, 20 % H_2O a 5 % koncentrované H_2SO_4). Tímto způsobem byly barveny řezy (barvení probíhalo přímo na podložním sklíčku) i celá semena (barvení probíhalo v secím aparátu; součástí barvy je HCl, je tedy potřeba zkontrolovat nylonovou tkaninu, zda nebyla degradována a případně ji vyměnit za novou). Snímání probíhalo ve světlém poli v mikroskopu Olympus BX51. Lignifikované buněčné stěny jsou po detekci okyseleným floroglucinolem zbarveny červeně.

Berberin hemisulfát a genciánová violet'

Barvení 0,1% (w/v) roztokem berberin hemisulfátu (Brundrett *et al.*, 1988; Soukup, 2014) probíhalo 60 min, následovalo 6x odmytí barviva destilovanou vodou a dobarvení 0,05% (w/v) genciánovou violetí po dobu 10 min, pak opět 6x odmytí barviva destilovanou vodou. Montováno

do 65% glycerolu. Tímto způsobem byla barvena celá semena i řezy. Snímáno po excitaci UV světlem (filtr blok Olympus U-MWU) v mikroskopu Olympus BX51. Lignifikované buněčné stěny jsou po detekci žlutě obarvené. Méně specifická vazba berberinu (např. v nemodifikovaných buněčných stěnách, cytoplazmě a jádru) je přebarvena genciánovou violetí, což umožňuje specificky vizualizovat pouze lignifikované buněčné stěny (Brundrett *et al.*, 1988).

5.2.2.3.c. Detekce suberinu

Sudanová červen 7B

Řezy semen byly inkubovány v 0.01 % (w/v) sudanové červení (Sudan Red 7B) 60 min. Barvivo bylo odmyto nejprve 0,5% vodním roztokem detergentu SDS (Soukup, 2014; sodium dodecyl sulfate, dodecylsírán sodný) a následně 3x destilovanou vodou. Montováno do 65% glycerolu, snímáno ve světlém poli v mikroskopu Olympus BX51. Lipidické látky se sudanovou červení barví červeně.

Příprava barvicího roztoku (Brundrett *et al.*, 1991; Soukup, 2014): 0,1–0,2 % (w/v) sudanové červeně 7B bylo rozpuštěno v PEG-400 (polyethylenglykol 400), při čemž byl roztok zahříván na 90 °C (nesmí být překročeno 100 °C, aby nedošlo k poškození barviva). Následně byl přidán stejný objem 90% aq. glycerolu. Tato směs byla přefiltrována přes filtrační papír a uchovávána ve 4 °C.

Fluorol Yellow 088

Řezy semen byly barveny v 0,01% (w/v) Fluorol Yellow 088 po dobu 90 min, následovalo omytí řezů 0,5% vodním roztokem detergentu SDS a následně 3x destilovanou vodou. Montováno do 50% glycerolu, snímáno po excitaci UV světlem v mikroskopu Olympus BX51 (filtr blok Olympus U-MWU) a detaily osemení na konfokálním mikroskopu LeicaSP8 (excitace 405 nm, emise 529-572 nm).

Příprava barvicího roztoku (Brundrett *et al.*, 1991; Soukup, 2014) byla stejná, jako v případě sudanové červeně, pouze se změnou koncentrace Fluorol Yellow 088 na 0,01% (w/v).

5.2.2.4. Analýza ultrastruktury osemení

5.2.2.4.a. Skenovací elektronový mikroskop

Povrch vzorků byl pozlacen (2 nm tenkou vrstvou) v iontovém naprašovači (Bal-Tec SCD 050) a následně pozorovány a snímány na mikroskopu JEOL JSM-IT 200.

5.2.2.4.b. Transmisní elektronový mikroskop

Celá semena byla nejprve fixována v 2,5% glutaraldehydu v kakodylátovém pufru (0,1 M, pH 7,2), následně post-fixována v 2% oxidu osmičelém ve stejném pufru, dehydratována

v ethanolové řadě a zalita do pryskyřice Spurr. Ultratenké řezy byly pozorovány v mikroskopu JEOL JEM-1011 s kamerou Veleta CCD.

6. VÝSLEDKY

6.1. Výsev

6.1.1. Ošetření semen anorganickými látkami

6.1.1.1. Roztok chlorového vápna

Semena kruštíku širolistého po krátkých časech ošetření první měsíc po výsevu neklíčila takřka vůbec, po delší době kultivace jsem u některých misek pozorovala vyklíčená jednotlivá semena (přehled grafů 1 graf F). Po dlouhém ošetření chlorovým vápnem zpočátku klíčila jen jednotlivá semena a s postupem času se počet protokormů navyšoval. I přesto však klíčivost nedosahovala vysokých hodnot. Maximum bylo 12 % na jedné misce. To je patrně také důvod, proč je řada rozdílů mezi různými časy odečtů statisticky nevýznamných (přehled grafů 1). Rozdíly mezi nejkratšími a nejdelším ošetřením byly v rámci jednoho odečtu zpravidla statisticky významné (přehled grafů 1 grafy E, F).

Dalším druhem, u kterého jsem sledovala klíčivost, byl prstnatec májový. Na základě pravidelných odečtů klíčivosti jsem zjistila, že semena jsou nejen schopna přežít hodinovou chemickou skarifikaci roztokem chlorového vápna, ale že dokonce s narůstající dobou ošetření narůstá klíčivost semen (přehled grafů 2). Klíčivost se také zvyšovala po celou dobu kultivace, přičemž k nejvýraznějším nárůstům klíčivosti docházelo po delších ošetřeních semen. V případě nejdelšího ošetření (4 min EtOH, 60 min roztok chlorového vápna) narostla klíčivost z počáteční hodnoty 10 %, po půl roční kultivaci na 70 % (přehled grafů 2 graf D), zatímco u nejkratšího ošetření (pouze 4 min roztok chlorového vápna) klíčivost za půl roku narostla jen o 10 % (přehled grafů 2 graf B). Při středně dlouhých dobách desinfekce semen (4/10, 4/15) byla klíčivost zpočátku vyšší než při ostatních časech ošetření (přehled grafů 2 graf E), ale její nárůst během půlroční kultivace byl přibližně 10 %, tedy stejný jako v případě krátkého ošetření roztokem chlorového vápna (přehled grafů 2 graf C), díky čemuž byly po delší době kultivace klíčivosti na těchto variantách výrazně nižší, než po dlouhém ošetření (přehled grafů 2 graf F). Zatímco se tedy po měsíci kultivace jako nejvýhodnější ošetření jeví 4 min EtOH s 15 min roztoku chlorového vápna, tak po půl roce kultivace signifikantně nejvyšších hodnot klíčivosti dosahovala semena po nejdelším ošetření (4/60).

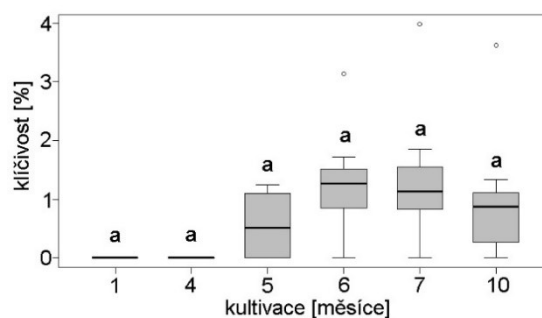
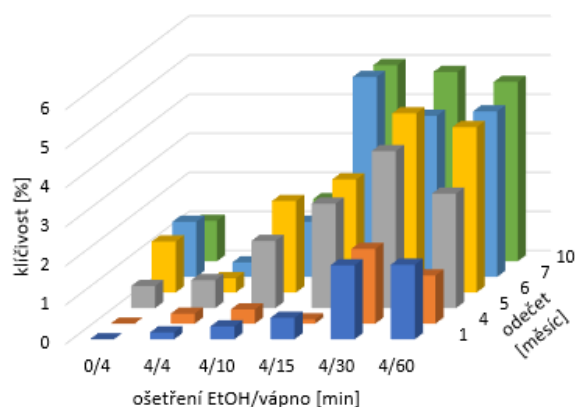
Posledním studovaným druhem byl kruštík tmavočervený. Tento druh však po celou dobu kultivace vykazoval jen minimální klíčivost (přehled grafů 3), i když po dlouhé kultivaci bylo možné na všech variantách pozorovat jednotlivá vyklíčená semena. Nevyšší klíčivosti bylo dosaženo po ošetření 4 min EtOH, 30 min chlorové vápno, jednalo se však o pouhých 0,6 % a patrně díky velice

nízkým klíčivostem nebyly žádné rozdíly statisticky významné. Lze však pozorovat trend vyšších klíčivostí po delších časech ošetření semen (přehled grafů 3 graf B).

Epipactis helleborine, ošetření chlorové vápno

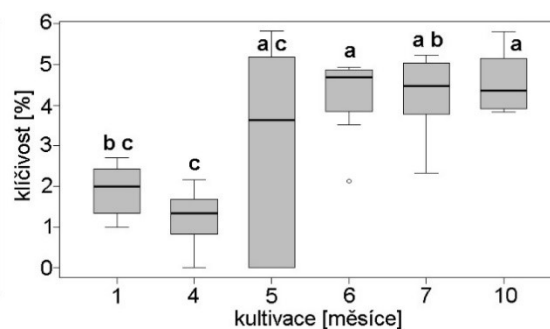
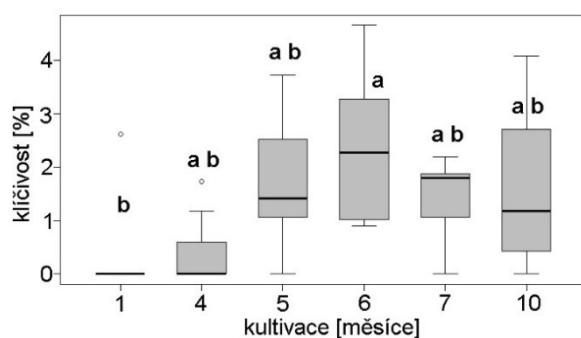
A – celý experiment

B – ošetření 0/4 [min]



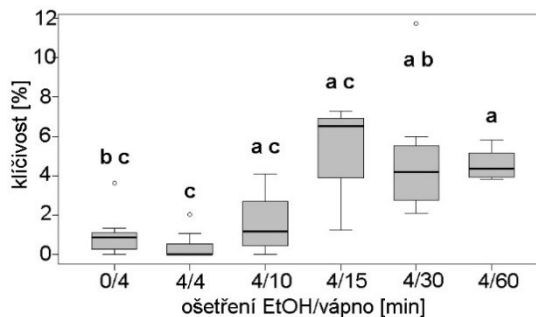
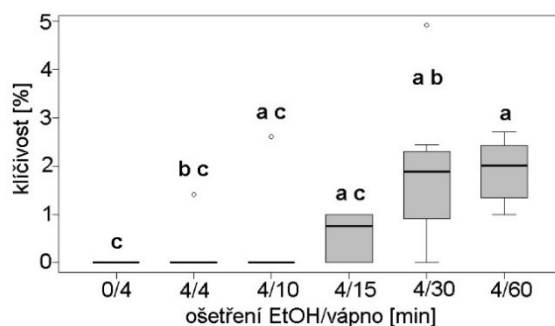
C – ošetření 4/15 [min]

D – ošetření 4/60 [min]



E – kultivace 1 měsíc

F – kultivace 6 měsíců

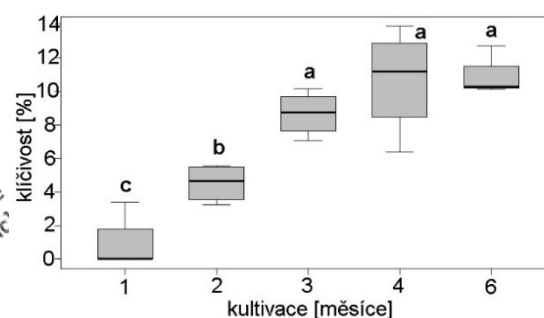
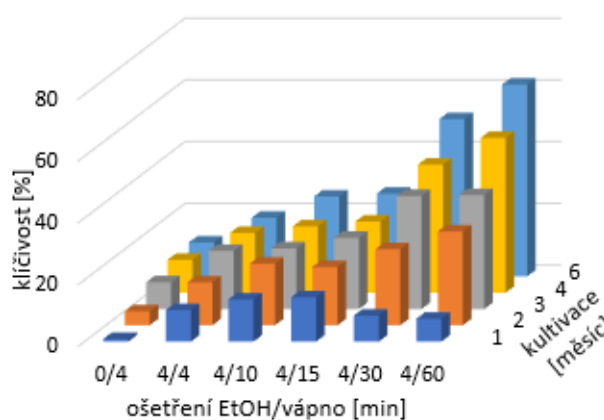


Přehled grafů 1 Grafy zobrazující klíčivost semen *p. májového* (*D. majalis*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 4 min EtOH a roztokem chlorového vápna; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem graf B – $p = 9 \times 10^{-4}$, graf C – $p = 5 \times 10^{-3}$, graf D – $p = 4 \times 10^{-4}$, graf E – $p = 6,3 \times 10^{-5}$, graf F – $p = 7,3 \times 10^{-5}$.

Dactylorhiza majalis, ošetření chlorové vápno

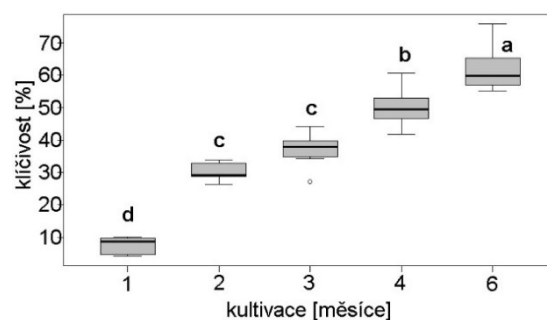
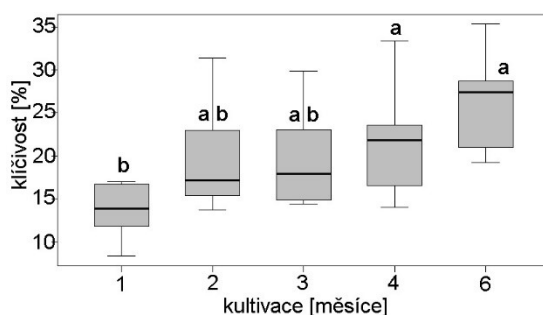
A – celý experiment

B – ošetření 0/4 [min]



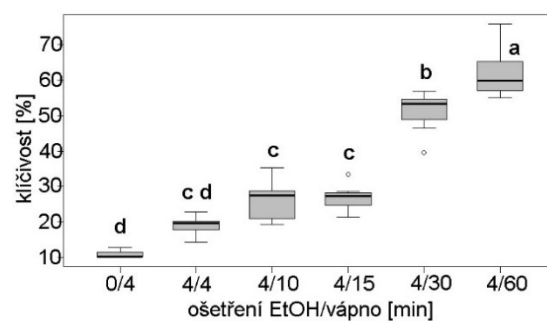
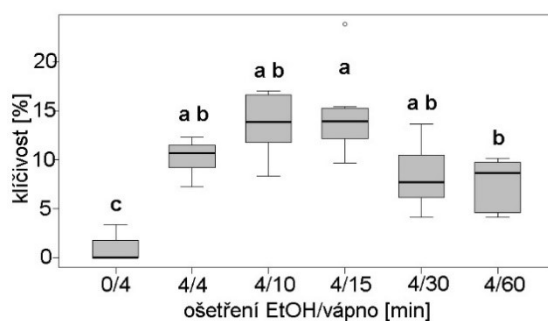
C – ošetření 4/15 [min]

D – ošetření 4/60 [min]



E – kultivace 1 měsíc

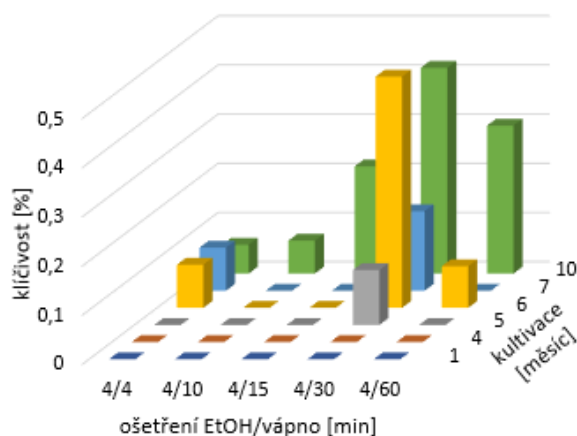
F – kultivace 6 měsíců



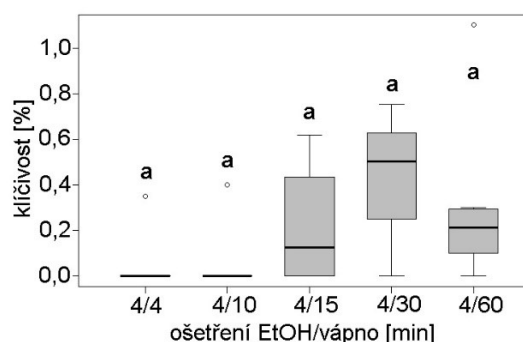
Přehled grafů 2 Grafy zobrazující klíčivost semen *p. májového* (*D. majalis*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 4 min EtOH a roztokem chlorového vápna; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné v případech B, C, D, F ANOVA a párovým porovnáním v Tukeyho HSD testu, graf B – $p = 6,8 \times 10^{-7}$; graf C – $p = 9 \times 10^{-4}$, graf D – $p < 2 \times 10^{-16}$, graf F – $p = 2 \times 10^{-16}$, data v grafu E byla hodnocena Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem $p = 1,5 \times 10^{-5}$.

Epipactis atrorubens, ošetření chlorové vápno

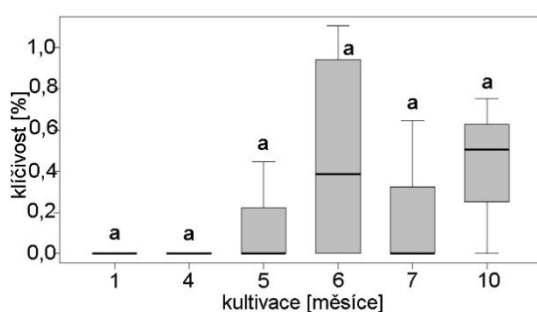
A – celý experiment



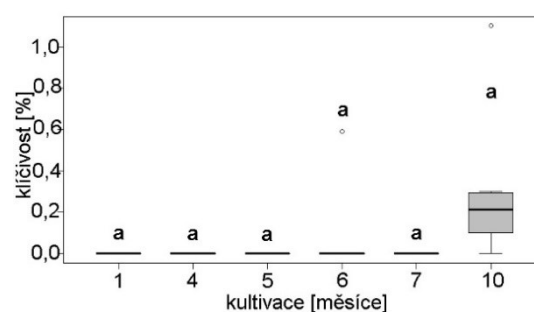
B – kultivace 10 měsíců



C – ošetření 4/30 [min]



D – ošetření 4/60 [min]



Přehled grafů 3 Grafy zobrazující klíčivost semen k. tmavočerveného (*E. atrorubens*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 4 min EtOH a roztokem chlorového vápna; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem, graf B – $p = 0,2$, graf C – $p = 0,1$, graf D – $p = 5 \times 10^{-4}$.

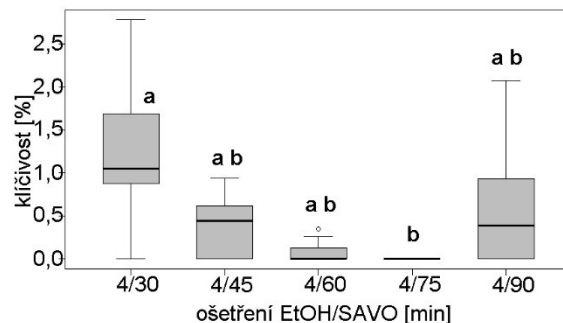
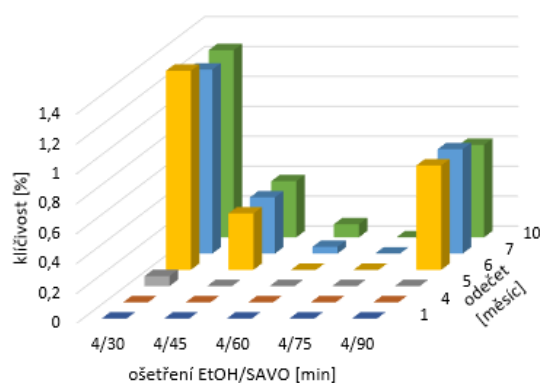
6.1.1.2. SAVO

EtOH a roztokem SAVO jsem desinfikovala pouze semena obtížně klíčících druhů, tedy kruštíků. U kruštíku širolistého docházelo ke klíčení semen okolo 5. měsíce kultivace (přehled grafů 4). Nejvyšší klíčivost byla pozorována po nejkratším ošetření (30 min) (přehled grafů 4 grafy A, C), nicméně i tak byly hodnoty klíčivosti velmi malé (nižší než při ošetření chlorovým vápnem – přehled grafů 1). Je zvláštní, že semena po středních dobách ošetření (60 a 75 min) takřka neklíčila, ale po nejdelším ošetření (90 min) opět malá část semen vyklíčila (přehled grafů 4 grafy A, D).

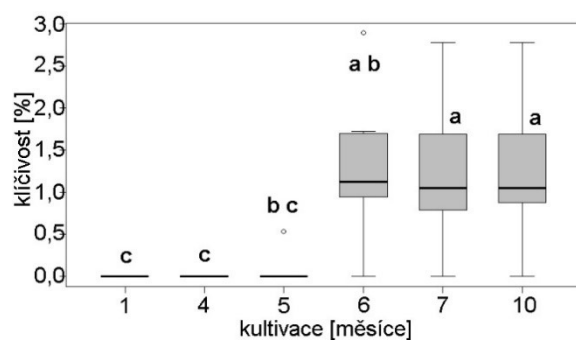
U semen kruštíku tmavočerveného došlo ke klíčení takřka výhradně až po devíti měsících kultivace, a i tak byla klíčivost minimální, a to bez ohledu na délku ošetření (přehled grafů 5).

Epipactis helleborine, ošetření SAVO

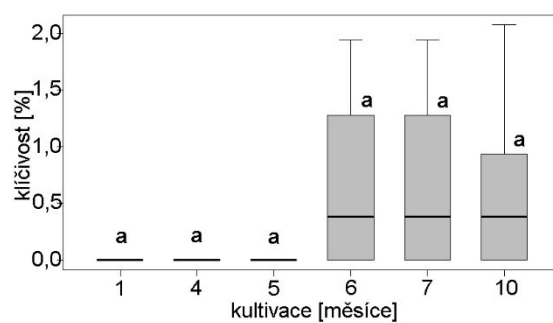
A – celý experiment **B – kultivace 10 měsíců**



C – ošetření 4/30 [min]



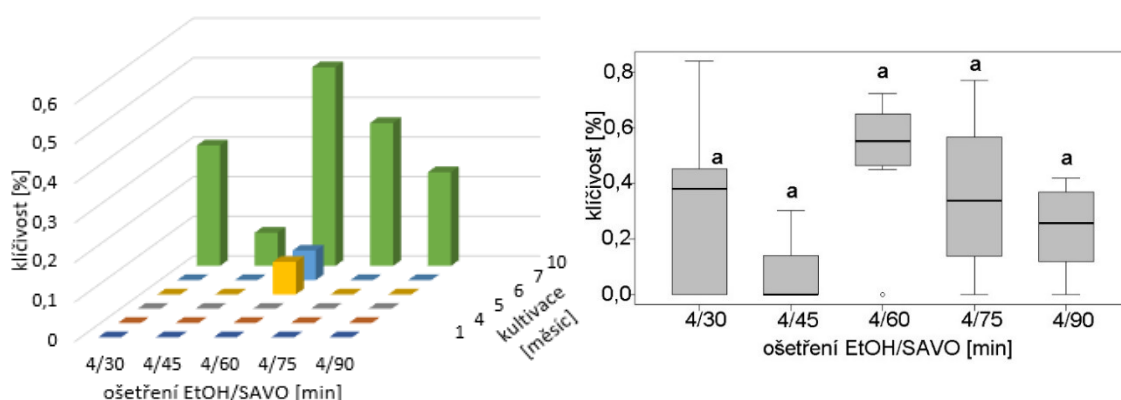
D – ošetření 4/90 [min]



Přehled grafů 4 Grafy zobrazující klíčivost semen k. šírolistého (*E. helleborine*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 4 min EtOH a roztokem SAVO; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem, graf B – $p = 2 \times 10^{-3}$, graf C – $p = 8,7 \times 10^{-6}$, graf D – $p = 7 \times 10^{-3}$.

Epipactis atrorubens, ošetření SAVO

A – celý experiment
B – kultivace 10 měsíců



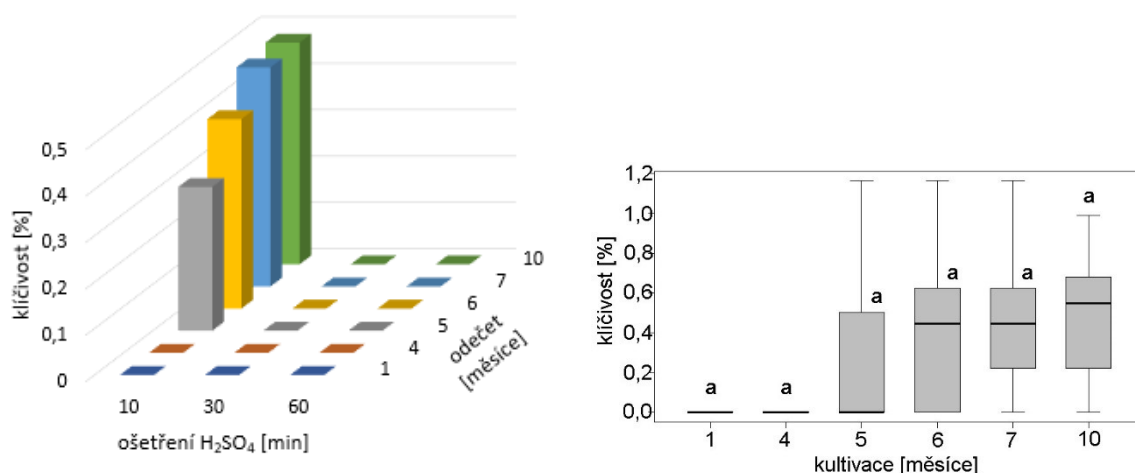
Přehled grafů 5 Grafy zobrazující klíčivost semen k. tmavočerveného (*E. atrorubens*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 4 min EtOH a roztokem SAVO; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem, graf B – $p = 0,04$.

6.1.1.3. Kyselina sírová

Kombinaci ošetření H_2SO_4 s 5 min EtOH a 10 min roztoku chlorového vápna jsem opět aplikovala pouze na obtížně klíčící semena krušítků. Semena klíčila pouze po nejkratším ošetření 10 min H_2SO_4 , a i tak vykazovala po celou dobu kultivace jen minimální klíčivost nepřesahující 1,2 % (přehled grafů 6).

Epipactis helleborine, ošetření H_2SO_4

A – celý experiment
B – ošetření 10 min



Přehled grafů 6 Grafy zobrazující klíčivost semen k. šírolistého (*E. helleborine*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 5 min EtOH, roztokem H_2SO_4 v uvedených délkách a 10 min roztokem chlorového vápna; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem, graf B – $p = 0,02$.

6.1.2. Houbové exudáty

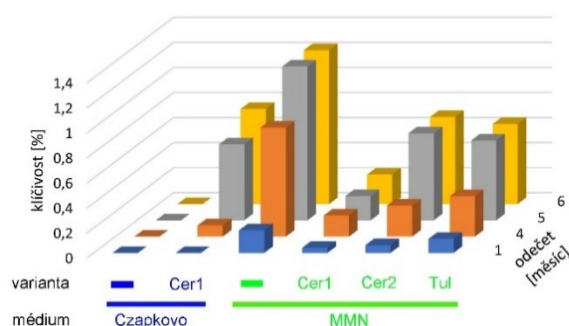
Tento experiment byl založen později, dosud nebyl ukončen, a proto jsou zatím dostupné jen průběžné výsledky.

Semena kruštíku širolistého vykazovala nižší klíčivost, než po ošetření EtOH a roztokem chlorového vápna. Obecně byly dosud dosažené klíčivosti velmi malé (přehled grafů 7), nicméně nelze vyloučit že v dalších měsících kultivace klíčivosti vzrostou. Nejvyšší klíčivosti (3 %) bylo dosaženo po 7 měsících kultivace po ošetření tekutým médiem MMN, které neobsahovalo houbové exudáty (přehled grafů 7, graf F). V porovnání s touto kontrolou klíčivost semen po ošetření tekutým médiem MMN obsahujícím houbové exudáty klesla, a to u všech testovaných hub, nicméně rozdíly nebyly statisticky průkazné. V případě Czapkova média byla klíčivost kontroly nižší, než když byly přítomny houbové exudáty. Získané rozdíly však opět nebyly statisticky významné.

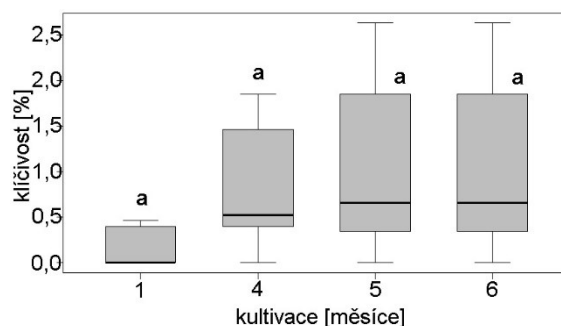
Semena prstnatce májového vykazovala jen velmi malou klíčivost, a to včetně kontrolních výsevů semen máčených v médiu bez houbových exudátů (přehled grafů 8). Je možné, že došlo k poklesu klíčivosti semen při skladování a experiment bude nutné zopakovat. Stejně jako v případě kruštíku širolistého se jako nejúspěšnější ukázalo ošetření, při kterém byla semena máčena pouze v tekutém médiu MMN, ve kterém nebyly žádné houbové exudáty přítomny. Máčení v samotném médiu MMN vedlo k výrazně vyšší klíčivosti oproti máčení v Czapkovu médiu (přehled grafů 8 grafy B, C). Máčení v médiích po kultivaci hub vedla vždy k nižším klíčivostem, i když rozdíly nebyly vždy průkazné (přehled grafů 8).

Epipactis helleborine, ošetření houbové exudáty

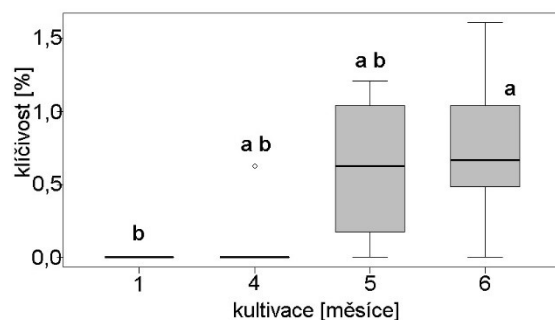
A – celý experiment



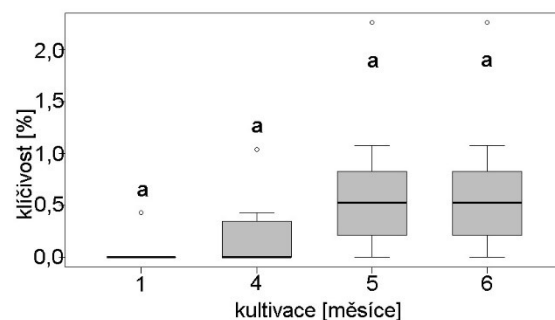
B – MMN bez houby



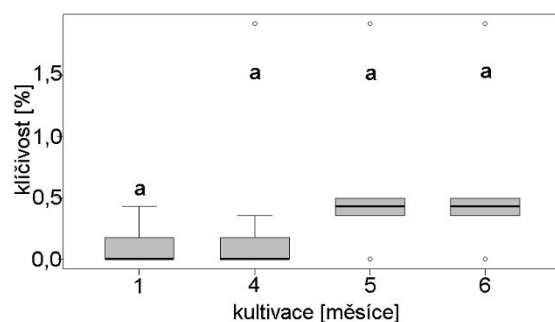
C – Cer1_Czapkovo



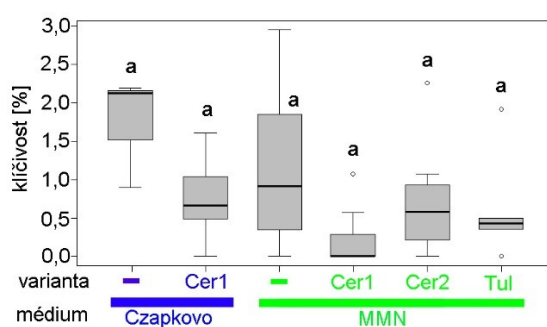
D – Cer2_MMN



E – Tul_MMN



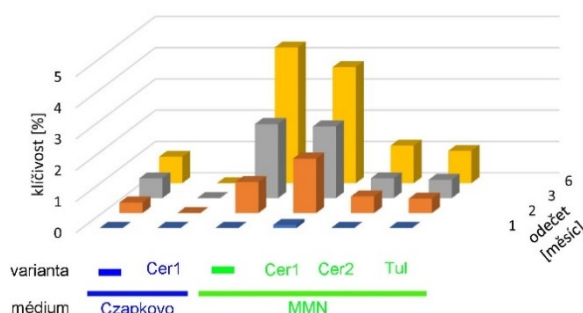
F – kultivace 7 měsíců



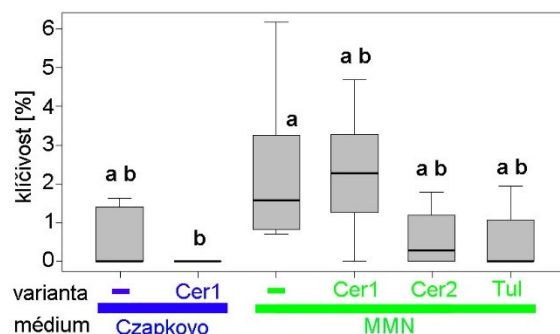
Přehled grafů 7 Grafy zobrazující klíčivost semen *k. šírolistého* (*E. helleborine*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 1 min EtOH, 10 min roztokem chlorového vápna a 20 h namáčení v tekutém médiu, ve kterém byly dříve kultivovány houby; v grafu A pomlčka značí, že na tekutém médiu houby kultivovány nebyly; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem, graf B – $p = 0,1$, graf C – $p = 3 \times 10^{-3}$, graf D – $p = 0,05$, graf E – $p = 0,08$, graf F – $p = 0,1$.

Dactylorhiza majalis, ošetření houbové exudáty

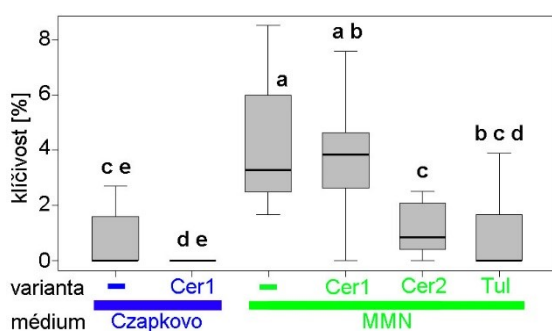
A – celý experiment



B – kultivace 3 měsíce



C – kultivace 6 měsíců



Přehled grafů 8 Grafy zobrazující klíčivost semen k. šírolistého (*E. helleborine*) v průběhu kultivace in vitro po ošetření 1 min EtOH, 10 min roztokem chlorového vápna a 20 h namáčení v tekutém médiu, ve kterém byly dříve kultivovány houby; v grafech A, B i C pomlčka značí, že na tekutém médiu houby kultivovány nebyly; rozdílná písmena značí signifikantní rozdíly mezi variantami zjištěné Kruskal-Wallisovým testem a Wilcoxonovým párovým testem, graf B – $p = 5 \times 10^{-4}$, graf C – $p = 4 \times 10^{-3}$.

Na základě kultivace výsevů semen po různých ošetřeních jsem zjistila, že:

- Nejefektivnějším ošetřením se ukázal EtOH a roztok chlorového vápna, po němž všechny tři testované druhy dosahovaly nejvyšší klíčivosti.
- Semena prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) jsou schopna i po 60 min v roztoku chlorového vápna vyklíčit a po půl roce kultivace klíčilo neuvěřitelných 70 % semen, což je výrazně více než po kratších dobách ošetření.
- Semena kruštíků klíčí po testovaných ošetřeních výrazně méně než semena prstnatce. Ani jedno z testovaných ošetření (EtOH + SAVO, EtOH + H₂SO₄ + chlorové vápno, EtOH + chlorové vápno) nevedlo k vyklíčení většího množství semen kruštíků.
- Předběžné výsledky ukazují, že samotné houbové exudáty v tekutém médiu nemají vliv na klíčivost semen.

6.2. Testování propustnosti osemení

6.2.1. Pilotní experiment

V rámci pilotního experimentu jsem se zaměřila na semena prstnatce májového, u něž dochází vlivem různých délek ošetření chlorovým vápnem k výrazným změnám v klíčivosti semen (kapitola 4.1.1.1. Roztok chlorového vápna). Za základě těchto poznatků z dlouhodobých kultivací semen v *in vitro* podmínkách se domnívám, že nárůst klíčivosti bude souviset se změnami propustnosti osemení. Tyto změny jsem se snažila analyzovat pomocí testování propustnosti osemení. Porovnávala jsem semena neošetřená se semeny ošetřenými. Ošetřená semena byla v secím aparátu (kapitola 3.1.2.2. Příprava před experimentální částí) nejprve 4 min ošetřována EtOH, následně 3x promyta destilovanou vodou, 30 min inkubována v roztoku chlorového vápna s kapkou detergentu Tween20 a pak opět 3x omyta destilovanou vodou (viz kapitola 3.2.1.1.a. Chlorové vápno). Na základě literatury a průběžných výsledků z kultivace semen prstnatce májového jsem již u tohoto ošetření očekávala detekovatelné změny. V pilotním experimentu jsem proto tento materiál využila jako modelový a testovala jsem různé metody detekce propustnosti osemení. Cílem bylo najít test, který dokáže změny v propustnosti detekovat a bude jej možné využít pro testování většího množství semen v následujícím hlavním experimentu. V případě, že by změny v osemení nebyly daným testem propustnosti dobře detekovatelné u prstnatce májového, lze předpokládat, že by daná metoda detekce nedokázala zachytit rozdíly ani u kruštíku široolistého, kde očekávám méně výrazné změny v propustnosti.

První test, který jsem vyzkoušela, je barvení pletiv ve vodě rozpustným berberin hemisulfátem. Celá semena jím byla barvena po dobu 60 min. Výsledkem bylo obarvení pletiv embryí v případě, kde byla osemení propustná a k embryu se dostala voda s barvou. Tento test se ukázal velice vhodný pro stanovení propustnosti vnitřního osemení, a proto jsem jej v následném hlavním experimentu aplikovala na všechny testované způsoby ošetření. Pro vyhodnocení barvení je však problém silná autofluorescence semen, která se také liší mezi jednotlivými semeny a ukazuje velkou heterogenitu semen (obrázky 5 b, d). Intenzita barvení i autofluorescence se však nápadně lišila také v závislosti na tom, zda byla semena ošetřena roztokem chlorového vápna či nikoliv (obrázek 5).

Dalším úspěšným testem, který byl později využit v hlavním experimentu na všechny testované způsoby ošetření semen, je využití barvy (apoplastické sondy) PTS. PTS jsem aplikovala ve vodném roztoku a u neošetřených semen bylo na první pohled patrné, že se roztok obtížně dostává do kontaktu s povrchem vnějšího osemení a pod něj neprochází vůbec (obrázky 6 c, d). U ošetřených semen naopak roztok většinou pronikal do prostoru pod vnější osemení, což bylo

patrné při pozorování ve fluorescenčním i konfokálním mikroskopu (obrázky 6 a, b). Konfokální mikroskop LeicaSP8 jsem využila pro detailnější ověření, že barvivo skutečně vstupuje do vnitřního prostoru semene pod vnějším osemením a není pouze nad a pod semenem, čímž pádem by se semeno mohlo jevit jako obarvené, přestože ve skutečnosti není. Výsledky pozorování v konfokálním mikroskopu se však shodovaly s výsledky pozorování ve fluorescenčním mikroskopu. Zároveň jsem tímto testem zjistila, že pro možnost testování propustnosti vnitřního osemení je u neošetřených semen nutné zajistit kontakt vodného roztoku s hydrofobním vnějším osemením a jeho prostup pod něj. Proto jsem všechna semena před testováním propustnosti vnitřního osemení odvzdušnila ve vakuové vývěvě. Takto ošetřená semena jsem vystavila roztoku PTS a sledovala jeho pronikání přes vnitřní osemení do embrya (obrázek 6). Tam ale PTS nebylo pozorovatelné u neošetřených ani u ošetřených semen, a to ani s pomocí konfokálního mikroskopu. Test propustnosti pomocí PTS se tedy ukázal jako velmi vhodný pro tetování vnějšího osemení, méně vhodný pro vnitřní osemení.

Jako méně vhodný se ukázal test propustnosti kombinující FDA a PI. Testovala jsem několik koncentrací barvicího roztoku FDA, s žádnou z nich jsem však nezískala dostatečný počet obarvených semen (respektive embryí). A to ani u variant ošetření, o kterých jsem z jiných testů propustnosti a kultivace výsevů předpokládala, že semena jsou propustná. Také PI nebyl v buněčných stěnách embrya dobře patrný, a to ani při pozorování na konfokálním mikroskopu. Dále jsem tedy s FDA a PI nepracovala.

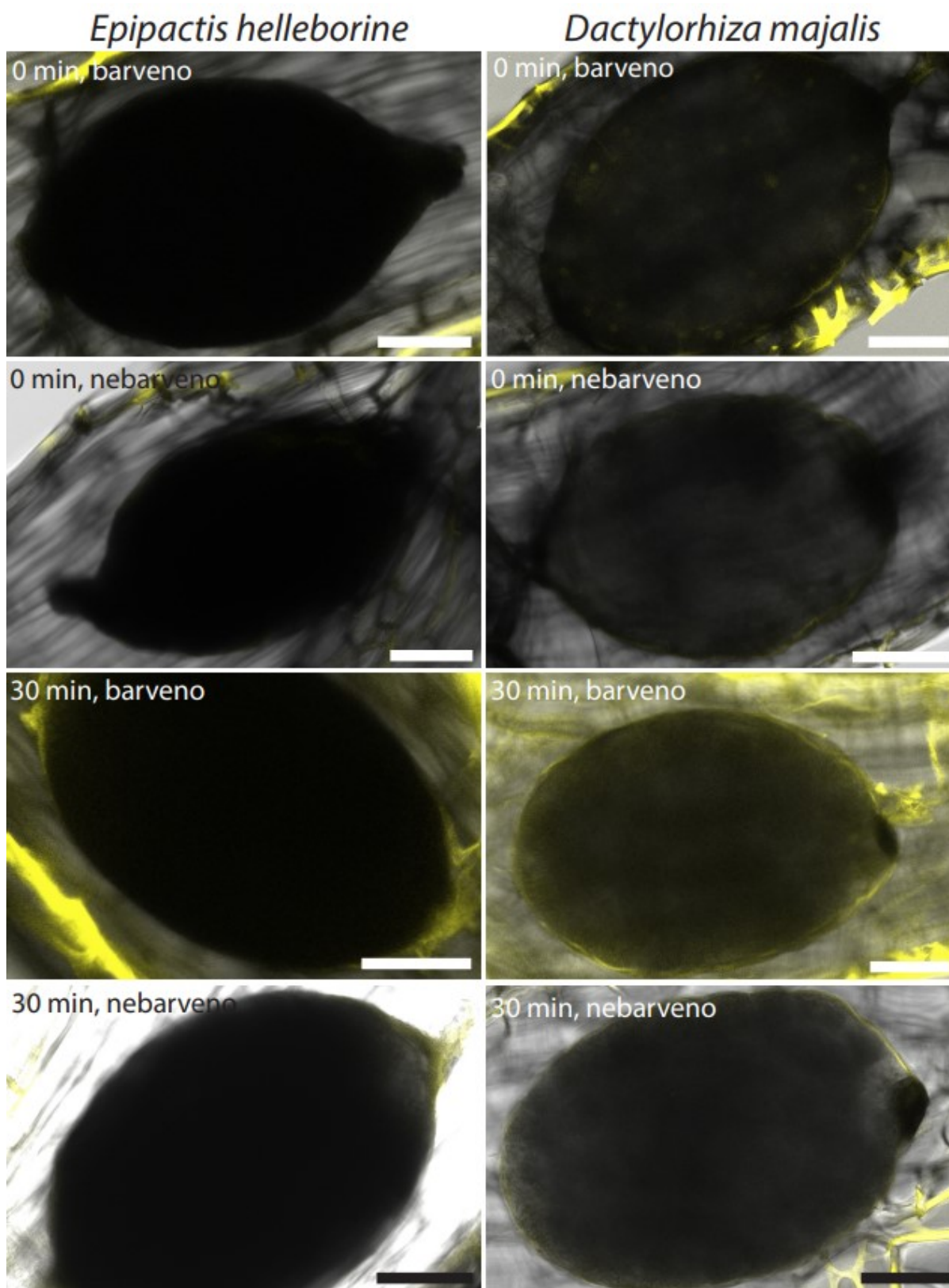
Obdobné výsledky, ze kterých nebylo možné vyvodit závěry o propustnosti semen, byl test fluorescenčním barvivem 5,6-CFDA, které funguje na stejném principu jako FDA. V případě 5,6-CFDA se obarvila jen jednotlivá semena (obrázek 7) prstnatce májového ve variantě semen ošetřených 4 min EtOH a 30 min chlorovým vápnem a následně odvzdušněných. Tento výsledek neodpovídal výsledkům z kultivace semen, kde po tomto ošetření semena vykazují výrazně vyšší procento klíčivosti a lze předpokládat poměrně vysokou frekvenci propustných semen. Proto jsem tento test propustnosti dále nepoužívala.

Testy propustnosti pomocí železnatých kationtů (obrázek 8) a test propustnosti pomocí PARS reakce (obrázek 9) přinesly očekávané výsledky. Jednalo se však o testy náročné na provedení (nutno připravit řezy semeny), proto jsem ani tyto testy dále nepoužívala. Těmito testy byla zkoumána suchá semena prstnatce májového, která vůbec nebyla nijak ošetřena, semena prstnatce májového, která byla přes noc v destilované vodě v lednici a semena prstnatce májového ošetřená 4 min EtOH, 3x promyta destilovanou vodou, 30 min inkubována v roztoku

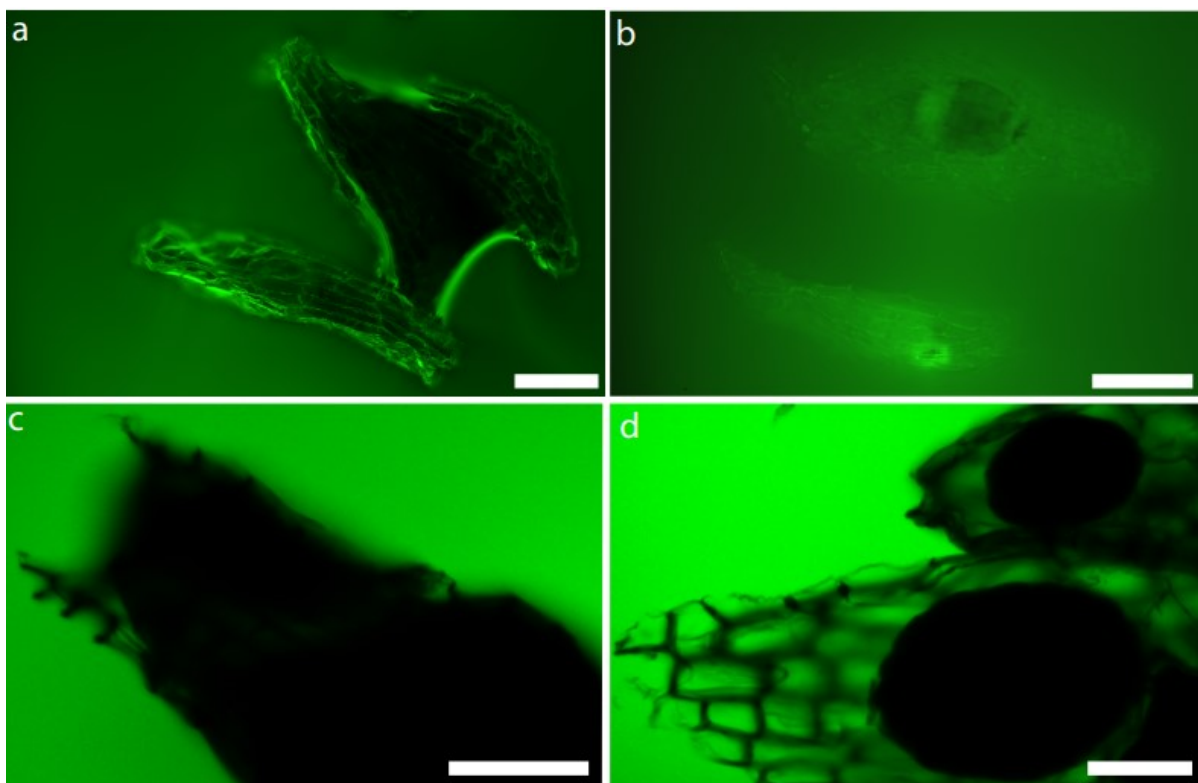
chlorového vápna a 3x promyta destilovanou vodou a odvzdušněna. Dále byly vytvořeny potřebné kontroly pro ověření správnosti barvení.

V případě testu pomocí železnatých kationtů bylo patrné, že u semen ošetřených chlorovým vápnem železo velmi dobře proniká do vnitřního osemení a částečně i přes vnitřní osemení do embrya, kde byla po detekci na řezech embryem patrná modrá sraženina. Její absence v negativní kontrole (semena nevystavená roztoku Fe^{2+}) a naopak výrazná přítomnost v pozitivních kontrolách (řezy ošetřené roztokem Fe^{2+}) potvrdila správné provedení testu. V semenech neošetřených chlorovým vápnem Fe^{2+} do embrya nepronikly, u některých semen se velmi slabě barvilo vnější osemení. Test se tedy ukázal jako vhodný především pro testování propustnosti vnitřního osemení, ale kvůli pracnosti nebyl nakonec v hlavním experimentu použit.

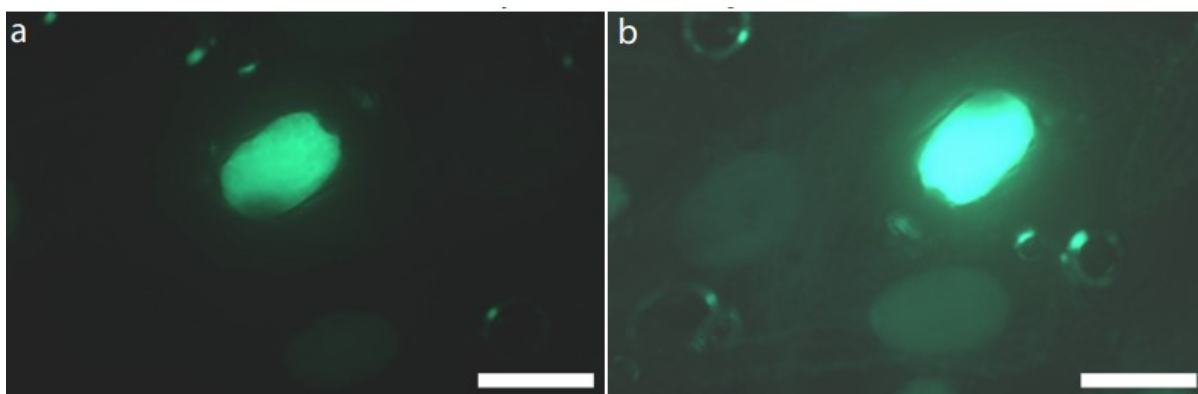
Test pomocí PARS reakce také ukázal částečné pronikání vody do embrya u semen ošetřených chlorovým vápnem. Semena byla vystavena roztoku kyseliny jodisté a její průnik byl detekován pomocí detekce aldehydických skupin, které v buněčných stěnách působením kyseliny jodisté vznikají. Výsledkem detekce je fialové zbarvení buněčných stěn, které bylo na řezích semen patrné výrazněji v případě semen ošetřených chlorovým vápnem než u semen neošetřených. Rozdíly však byly méně výrazné než v případě testu s pomocí železnatých kationtů. Z tohoto důvodu, a i vzhledem k pracnosti provedení, nebyl ani tento test dále používán.



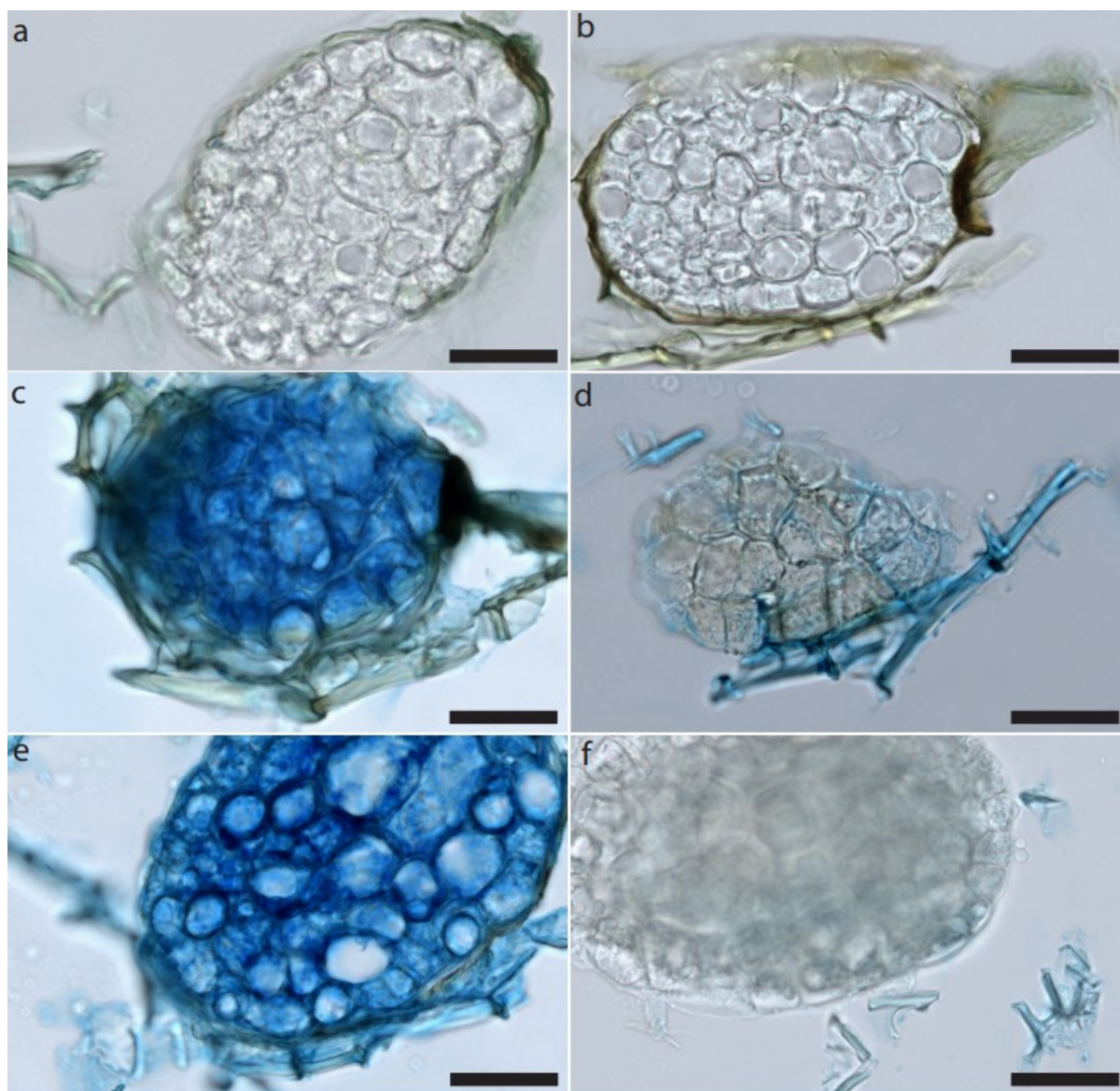
Obrázek 5 Embrya v semenech k. širolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*); barveno berberin hemisulfátem (60 min); uvedené časy jsou délka ošetření chlor. vápnem, snímky z konfokálního mikroskopu (excitace 405nm, emise 530-570nm, gain 250), měřítko = 50 μ m; pro ilustraci byla vybrána semena s neobarvenými embryi.



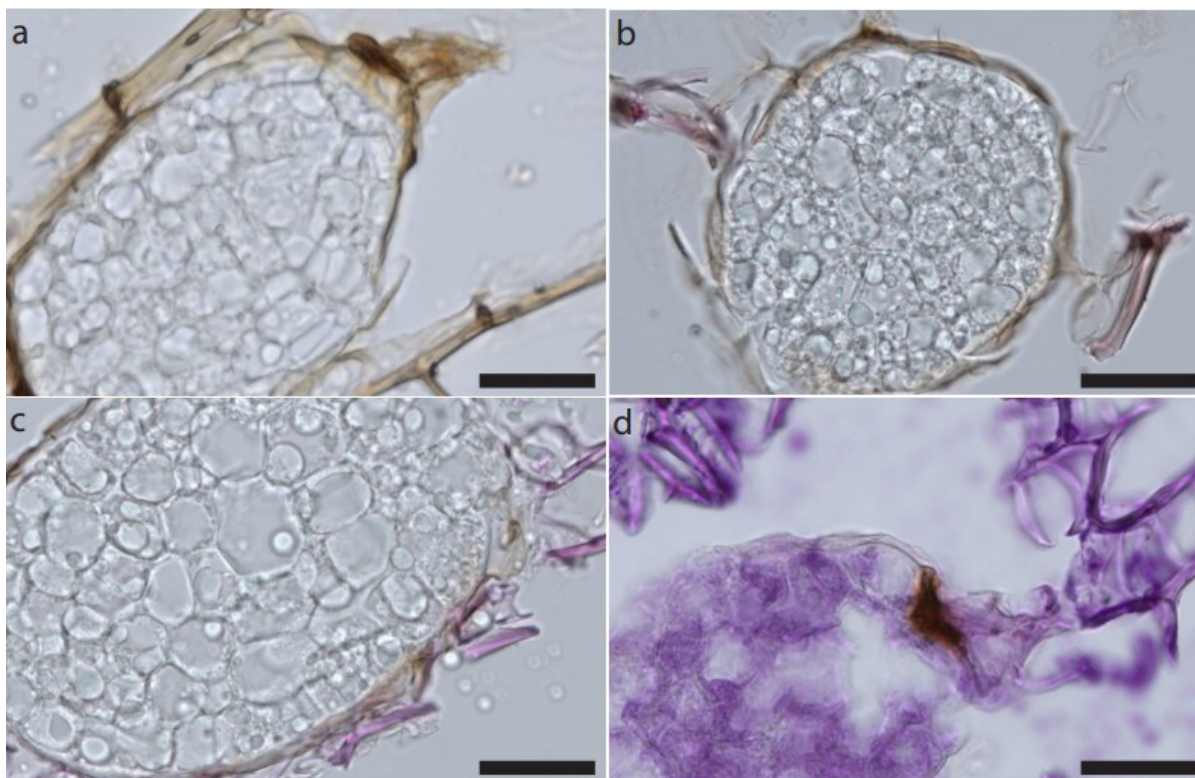
Obrázek 6 Semena *p. májového* (*D. majalis*), barvená PTS; měřítko = 100 μm ; a – suchá neodvzdušněná semena (u všech semen je patrné, že roztok PTS neprostoupil pod vnější osemení), b – semena ošetřená EtOH a 60 min chlor. vápnem (u obou semen je patrné probarvení prostoru pod vnějším osemením), c – suché neodvzdušněné semeno, d – semena ošetřená EtOH a 30 min roztokem chlorového vápna; a, b – snímek z fluorescenčního mikroskopu, snímáno 1 min po obarvení při excitaci modrým světlem (filtr blok Olympus U-MWB); c, d – snímek z konfokálního mikroskopu (excitace 405nm, emise 513-540nm).



Obrázek 7 Semena *p. májového* (*D. majalis*) ošetřeného 30 min chlorovým vápnem, barvená 5,6-CFDA; měřítko = 100 μm ; snímáno 1 min po obarvení při excitaci modrým světlem (filtr blok Olympus U-MWB); a - doba expozice snímku 0,5 s; b - doba expozice snímku 3s. Na snímku b (s delší dobou expozice) jsou kromě obarveného embrya patrná i embrya, která se pomocí 5,6-CFDA neobarvila.



Obrázek 8 Semena *p. májového* (*D. majalis*) testovaná pomocí roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; snímáno ve světlém poli, měřítko = $50 \mu\text{m}$; a - suchá semena, b - přes noc máčená semena, c - pozitivní kontrola k suchým semenům, d - semena ošetřená 30 min chlor. vápnem, e - pozitivní kontrola pro ošetření vápnem, f - negativní kontrola detekci železa u semen ošetřených vápnem; modrá barva značí přítomnost železa (detekováno jako modrá sraženina $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$).



Obrázek 9 Semena p. májového (*D. majalis*) testovaná PARS reakcí; snímáno ve světlém poli, měřítko = 50 μm ; a - suchá semena, b - přes noc máčená semena, c - ošetření 30 min chlor. vápnem, d - negativní kontrola pro semena ošetřená vápnem; fialová barva značí přítomnost aldehydických skupin v pletivech (nativních i vzniklých působením kyseliny jodisté).

6.2.2. Hlavní experiment

V rámci hlavního experimentu jsem testovala všechny vybrané způsoby ošetření (viz tabulky 10 a 12) semen kruštíku širolistého a prstnatce májového. Na základě kvality výsledků a náročnosti na provedení jsem vybrala test propustnosti vnějšího osemení pomocí PTS a vnitřní osemení bylo testováno berberin hemisulfátem.

6.2.2.1. Propustnost vnějšího osemení – test pomocí PTS

6.2.2.1.a. Dynamika vstupu PTS do semen

Semena byla vystavena roztoku PTS přímo na podložním sklíčku v mikroskopu. Semena byla umístěna v kapce vody, roztok PTS byl přikápnut k okraji krycího sklíčka a postupně difundoval k semenům. To umožnilo sledovat a zaznamenávat postupné probarvování jednotlivých semen.

Na obrázku 10 vidíme ukázky z testování propustnosti semen kruštíku širolistého, která nebyla před testem ošetřena vůbec (suchá, neošetřená semena) a semen, která jsem před testem ošetřila EtOH a roztokem chlorového vápna (po dobu 10, 30 nebo 60 min). Test ukázal, že suchá semena se skoro vůbec nedostala do přímého kontaktu s barvicím roztokem kvůli jejich hydrofobnímu povrchu. Po ošetření roztokem chlorového vápna došlo ve všech případech ke zvýšení propustnosti vnějšího osemení. Některá semena se neobarvila ihned, ale po delší inkubaci

(do 30 min) v roztoku PTS i u nich apoplastická sonda společně s vodou vstoupila do prostoru pod vnějším osemením.

Velmi podobné výsledky (obrázek 11) jsem získala při testování semen prstnatce májového. I v tomto případě u suchých semen pravděpodobně vůbec nedošlo ke kontaktu barvicího roztoku s hydrofobním povrchem semen. U všech variant ošetření EtOH a roztokem chlorového vápna se ukázalo, že semena jsou pro vodu propustná. Mnoho z nich bezprostředně po začátku testu (roztok PTS byl ihned po kontaktu se semenem patrný v prostoru pod vnějším osemením), u některých variant došlo k probarvení všech semen po krátké inkubaci (do 10 min) v apoplastické sondě PTS.

V případě varianty ošetření semen máčením v destilované vodě 14 nebo 30 dní jsou ukázky výsledků průniku PTS do prostoru pod vnější osemení u obou druhů zachycené v obrázku 12. V případě kruštíku širolistého vidíme, že žádné ze semen propustné pro vodu nebylo. Bez ohledu na to, zda byla semena před testem v destilované vodě máčena po dobu 14 nebo 30 dní, roztok PTS pod vnitřní osemení nepronikal. V případě prstnatce májového nebyla máčená semena propustná, pokud byla před testem máčena 14 dní, a i semena máčená 30 dní se jeví jako nepropustná. U velmi malého počtu semen prstnatce májového byl výsledek testu propustnosti diskutabilní, jednoznačně propustná semena však nebyla pozorována.

6.2.2.1.b. Inkubace semen v roztoku PTS

Semena z každé varianty ošetření byla roztoku PTS vystavena ve stříkačce, aby byl zajištěn homogenní a synchronní přístup apoplastické sondy ke všem semenům. Po krátké inkubaci (2 min) semen v roztoku PTS byla část semen přenesena společně s barvicím roztokem na podložní sklíčko a byl stanovován počet propustných (obarvených) a nepropustných semen. Semena byla počítána vždy ihned po přenesení na podložní sklíčko (2 min inkubace v PTS) a dále znovu po 30 min inkubaci v PTS na podložním sklíčku. Tímto způsobem byla testována semena obou druhů ve všech variantách ošetření semen.

V případě suchých (neošetřených semen) a semen ošetřených EtOH a roztokem chlorového vápna jsme získali výsledky zaznamenané v tabulkách 13 a 14. Žádné ze semen ani jednoho z testovaných druhů nebylo propustné, pokud nebylo nijak ošetřeno. Pokud byla semena chemicky skarifikována roztokem chlorového vápna, pak po všech testovaných délkách ošetření (10, 30 a 60 min) byla semena pro vodu propustná. Pokud nedošlo ke vstupu apoplastické sondy s vodou bezprostředně po kontaktu se semenem, pak k tomu došlo během 30 min inkubace na podložním sklíčku.

<i>Epipactis helleborine</i> ošetření chlorovým vápnem			
	Nepropustná	Ihned propustná	Propustná po 30 min v PTS
Neošetřená semena	100 %	0 %	0 %
Ošetření 10 min	12,5 %	87,5 %	100 %
Ošetření 30 min	14 %	86 %	100 %
Ošetření 60 min	6 %	94 %	100 %

Tabulka 13 Semena k. širolistého (*E. helleborine*) ošetřená chlor. vápnem, barvená roztokem PTS (n = 15-50).

<i>Dactylorhiza majalis</i> ošetření chlorovým vápnem			
	Nepropustná	Ihned propustná	Propustná po 30 min v PTS
Neošetřená semena	100 %	0 %	0 %
Ošetření 10 min	0 %	100 %	100 %
Ošetření 30 min	0 %	100 %	100 %
Ošetření 60 min	0 %	100 %	100 %

Tabulka 14 Semena p. májového (*D. majalis*) ošetřená chlor. vápnem, barvená roztokem PTS (n = 15-50).

Dále byla testována semena, která byla po dobu 14 dní (tabulky 15 a 16) a 30 dní (tabulky 17 a 18) před testem máčena v destilované vodě. Z tabulek je zřejmé, že dlouhodobé máčení semen v destilované vodě u kruštíku širolistého nevede k překonání nepropustnosti vnějšího osemení. U prstnatce májového došlo k porušení nepropustnosti vnějšího osemení u několika semen po 30 dnech máčení v destilované vodě. Mohlo se jednat o semena, která byla napadena houbou (obrázek 16) a ke zpropustnění semen tedy nedošlo pouze v důsledku máčení v destilované vodě. Vzhledem k jednoznačnosti výsledků jsme každé pozorování prováděli jen při jednom opakování a data tedy nebyla statisticky vyhodnocena.

<i>Epipactis helleborine</i>, máčení 14 dní v ddH₂O		
	Ihned po vystavení PTS	Po 30 min v PTS
Propustná semena	0 %	0 %
Nepropustná semena	100 %	100 %

Tabulka 15 Semena k. širolistého (*E. helleborine*) máčená 14 dní v ddH₂O, barvená roztokem PTS. (n=50).

<i>Dactylorhiza majalis</i>, máčení 14 dní v ddH₂O		
	Ihned po vystavení PTS	Po 30 min v PTS
Propustná semena	0 %	0 %
Nepropustná semena	100 %	100 %

Tabulka 16 Semena p. májového (*D. majalis*) máčená 14 dní v ddH₂O, barvená roztokem PTS (n=35).

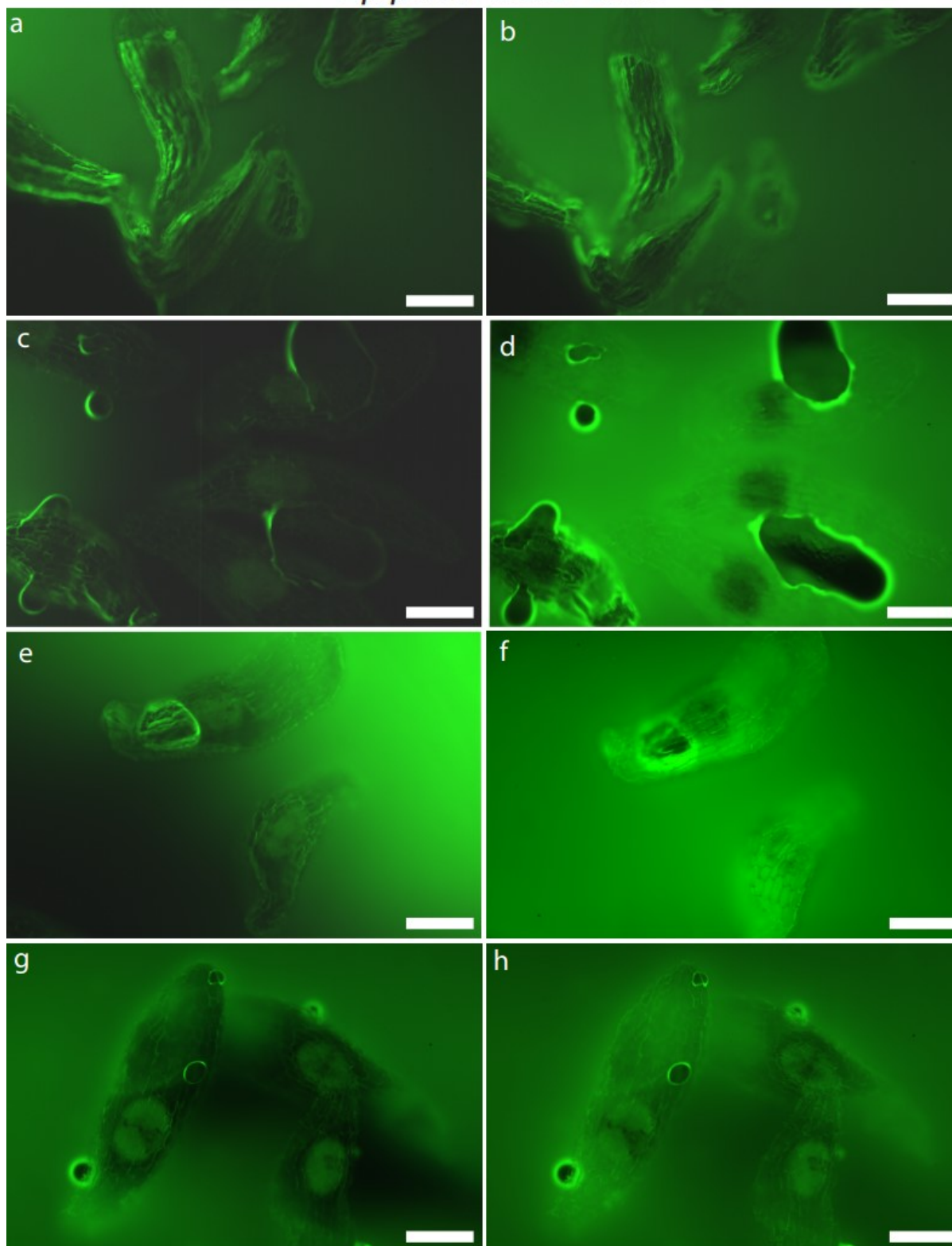
<i>Epipactis helleborine</i>, máčení 30 dní v ddH₂O		
	Ihned po vystavení PTS	Po 30 min v PTS
Propustná semena	0 %	0 %
Nepropustná semena	100 %	100 %

Tabulka 17 Semena k. širolistého (*E. helleborine*) máčená 30 dní v ddH₂O, barvená roztokem PTS (n=50).

<i>Dactylorhiza majalis</i> máčení 30 dní v ddH₂O		
	Ihned po vystavení PTS	Po 30 min v PTS
Propustná semena	6 %	14 %
Nepropustná semena	86 %	94 %

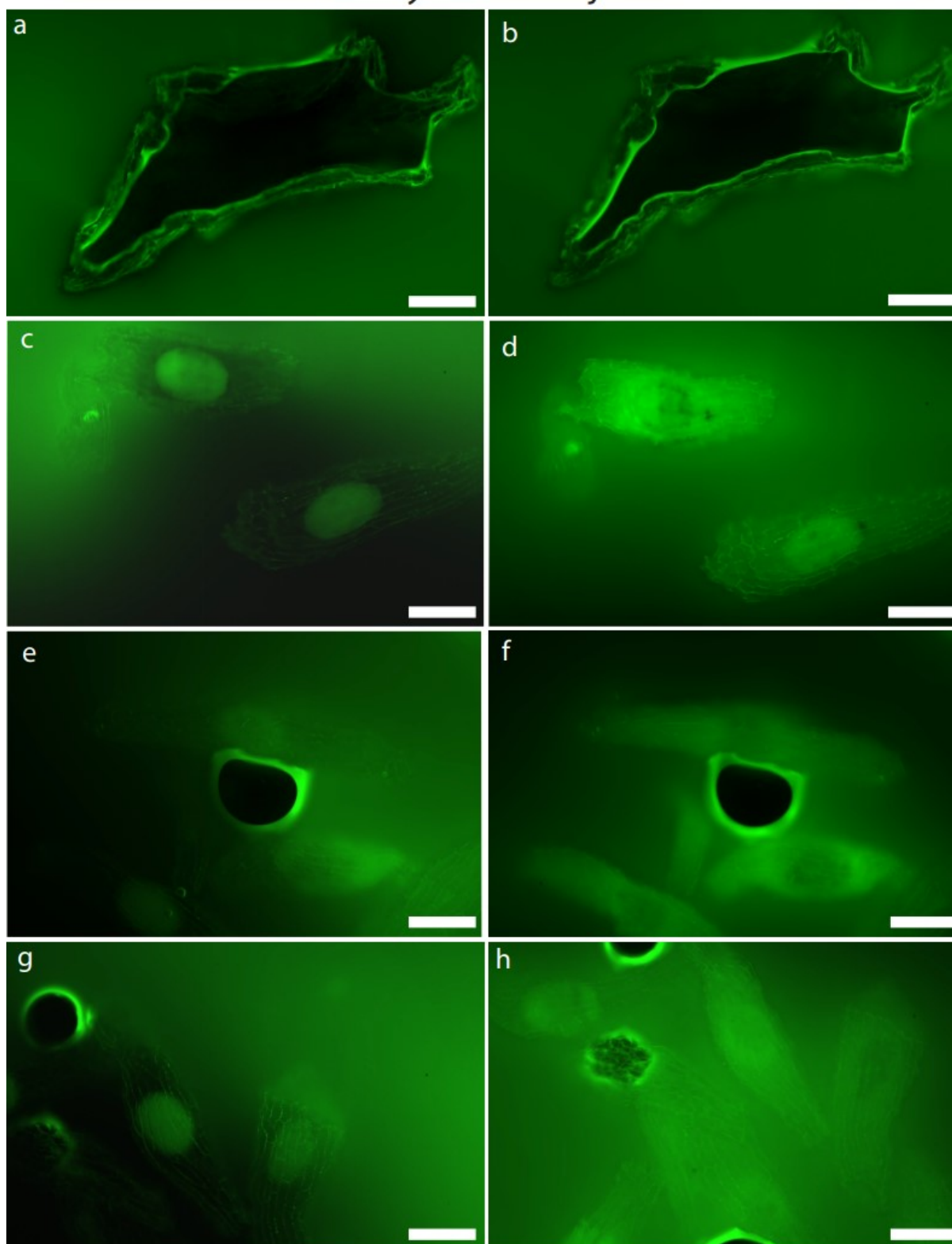
Tabulka 18 Semena p. májového (*D. majalis*) máčená 30 dní v ddH₂O, barvená roztokem PTS (n=35).

Epipactis helleborine

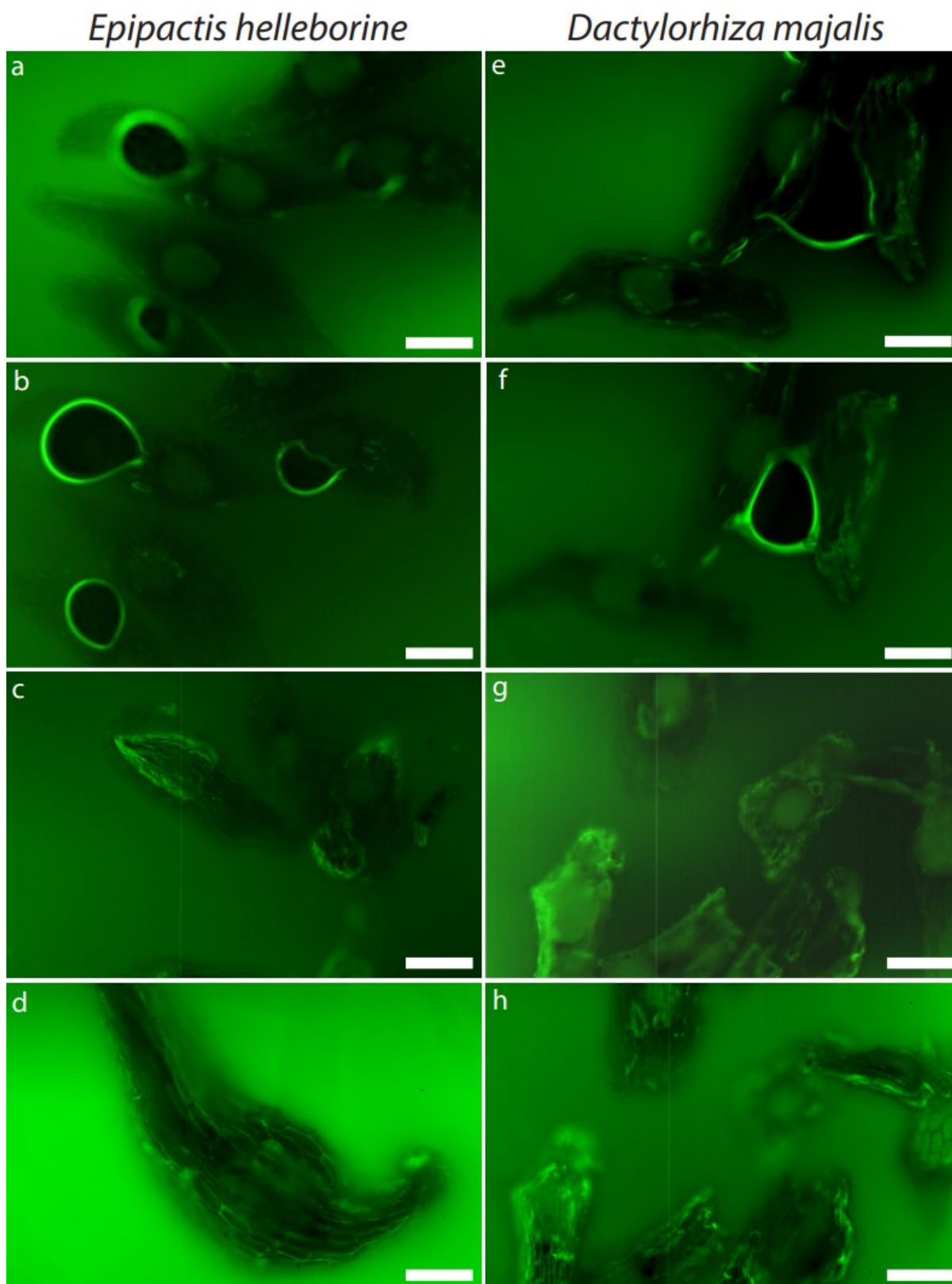


Obrázek 10 Semena k. šírolistého (*E. helleborine*) ošetřená roztokem chlorového vápna, barvena PTS, měřítko = 100 μm ; a – neošetřená, barveno PTS 0,5 min, b – neošetřená, barveno PTS 25 min, c – ošetřená chlor. vápnem 10 min, barvená PTS 2 min, d – ošetřená chlor. vápnem 10 min, barvená PTS 15 min, e – ošetřená chlor. vápnem 30 min, barvená PTS 1 min, f – ošetřená chlor. vápnem 30 min, barvená PTS 25 min, g – ošetřená chlor. vápnem 60 min, barvená PTS 0,5 min, h – ošetřená chlor. vápnem 60 min, barvená PTS 5 min; snímáno v roztoku PTS při excitaci modrým světlem (filtr blok Olympus U-MWB).

Dactylorhiza majalis



Obrázek 11 Semena p. májového (*D. majalis*) ošetřená roztokem chlorového vápna, barvena PTS, měřítko = 100 μ m; a – neošetřená, barveno PTS 0,5 min, b – neošetřená, barveno PTS 20 min, c – ošetřená chlor. vápnem 10 min, barvená PTS 1 min, d – ošetřená chlor. vápnem 10 min, barvená PTS 8 min, e – ošetřená chlor. vápnem 30 min, barvená PTS 2 min, f – ošetřená chlor. vápnem 30 min, barvená PTS 6 min, g – ošetřená chlor. vápnem 60 min, barvená PTS 1 min, h – ošetřená chlor. vápnem 60 min, barvená PTS 11 min; snímáno v roztoku PTS při excitaci modrým světlem (filtr blok Olympus U-MWB).

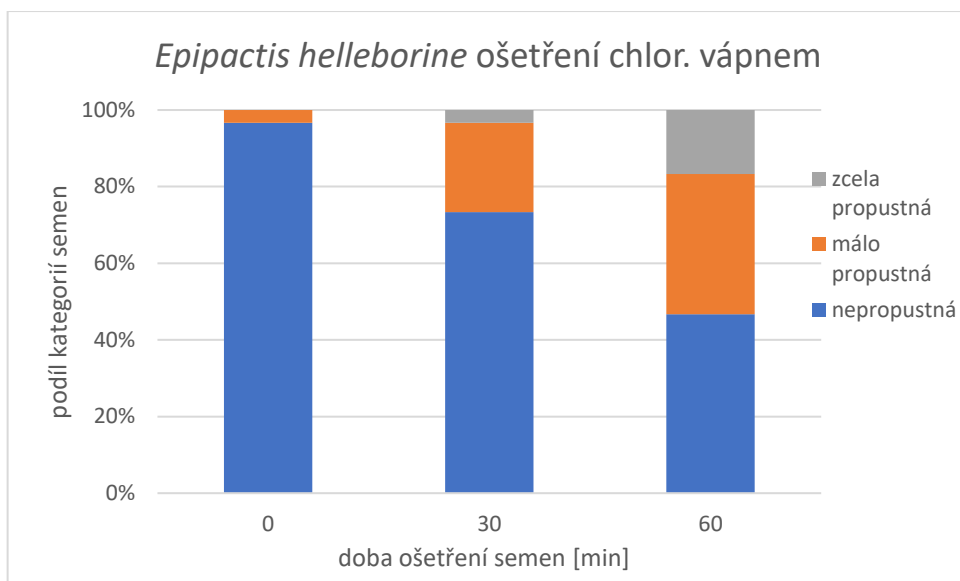


Obrázek 12 Semena k. širolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) máčena v ddH₂O, barvena roztokem PTS, měřítko = 100 μ m; a – máčena v ddH₂O 14 dní, barveno PTS 3 min, b – máčena v ddH₂O 14 dní, barvena PTS 20 min, c – máčena v ddH₂O 30 dní, barvena PTS 3 min, d – máčena v ddH₂O 30 dní, barvena PTS 20 min, e – máčena v ddH₂O 14 dní, barvena PTS 1 min, f – máčena v ddH₂O 14 dní, barvena PTS 9 min, g – máčena v ddH₂O 30 dní, barvena PTS 1 min, h – máčena v ddH₂O 30 dní, barvena PTS 9 min; snímáno v roztoku PTS při excitaci modrým světlem (filtr blok Olympus U-MWB).

6.2.2.2. Propustnost vnitřního osemení – test pomocí berberin hemisulfátu

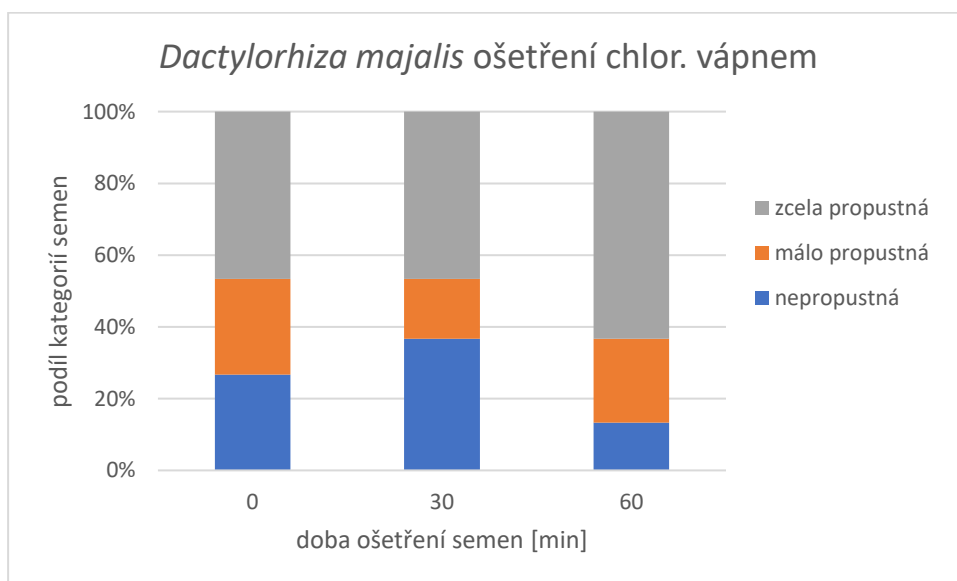
Propustnost vnitřního osemení jsem testovala pomocí berberin hemisulfátu. Testovaná semena patřila kruštíku širolistému a prstnatci májovému. Jednalo se o neošetřená (suchá) semena a semena, která jsem ošetřila EtOH a roztokem chlorového vápna (30 a 60 min). Semena jednotlivých variant ošetření byla nejprve odzdušněna (aby i u suchých semen došlo ke kontaktu barvicího roztoku s vnitřním osemením), následně inkubována 60 min v roztoku berberin hemisulfátu a snímána na konfokálním mikroskopu LeicaSP8. Optický řez jsem prováděla v mediální rovině embrya s 30 opakováními od každé varianty ošetření. Následně jsem na snímkách vyhodnocovala míru propustnosti vnitřního osemení. Stanovila jsem tři kategorie, jejichž ukázkou u každého testovaného druhu vidíme na obrázku 13. Kategorie nepropustné vnitřní osemení zahrnuje semena, v jejichž embryu nedošlo k obarvení buněčných stěn uvnitř embrya a ani jednoho jádra. Kategorie málo propustné vnitřní osemení zahrnuje škálu semen, v jejichž embryích došlo k obarvení některých buněčných stěn a jednotlivých jader až po embrya, v nichž byly obarveny buněčné stěny a všechna jádra v povrchové vrstvě a případně jednotlivá jádra v druhé vrstvě od povrchu. Do kategorie zcela propustné vnitřní osemení kromě semen s obarvenými buněčnými stěnami a všemi obarvenými jádry v embryu spadají i semena, která mají barvená i všechna jádra a buněčné stěny ve druhé vrstvě buněk pod povrchem a další více obarvená embrya.

Výsledky získané tímto testem byly zaneseny do grafu. Z grafu 1 je patrné, že semena kruštíku širolistého jsou bez ošetření téměř všechna nepropustná s výjimkou jednotlivých semen, která byla částečně propustná. Na první pohled z grafu 1 vidíme, že s narůstající dobou ošetření se postupně zvyšuje počet málo i zcela propustných semen. Téměř 75 % semen ošetřených roztokem chlorového vápna po dobu 30 min bylo nepropustných, 23 % semen bylo pro vodu částečně propustných a jen 3 % semen měla zcela propustné vnitřní osemení.

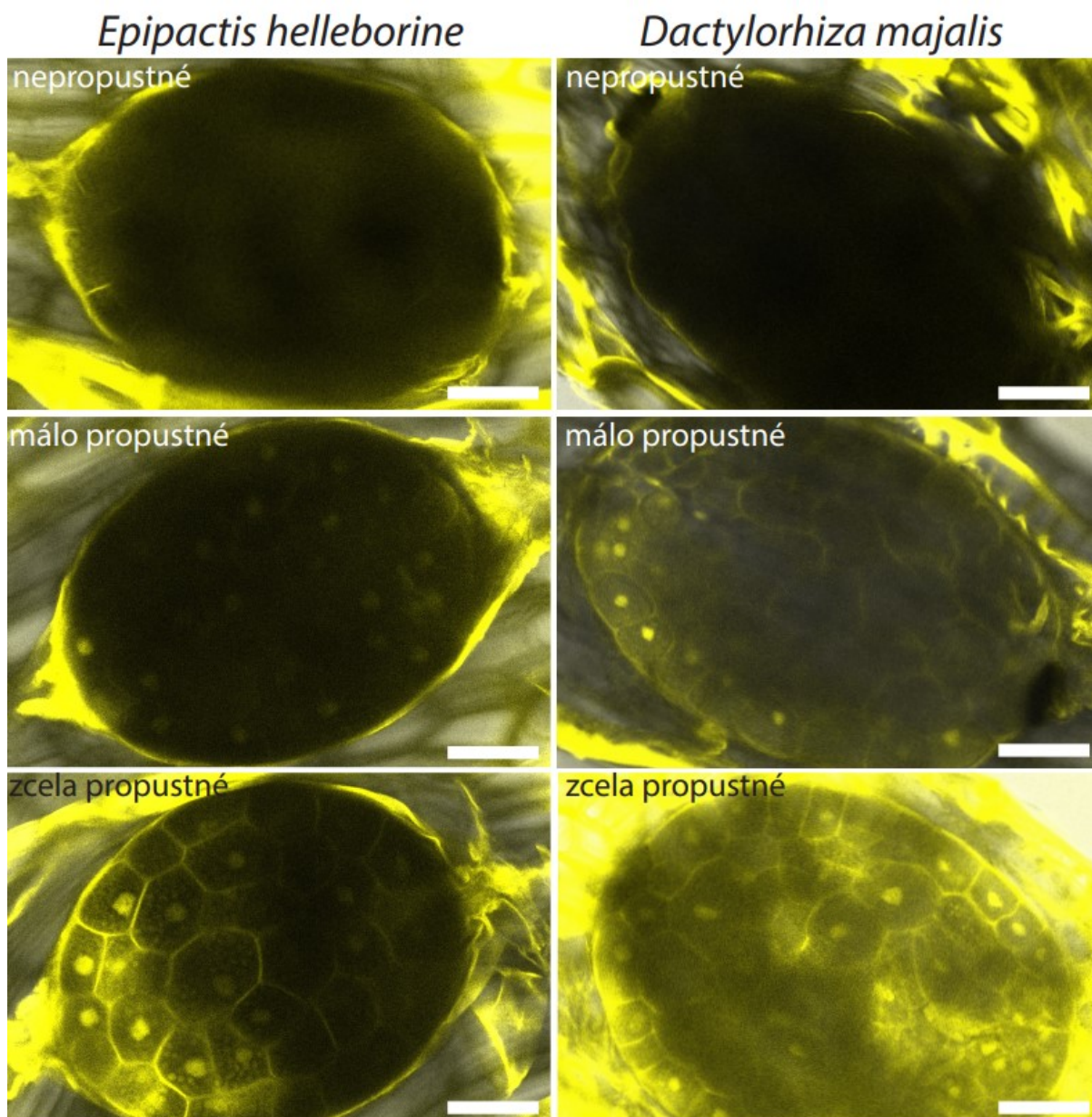


Graf 1 Míra propustnosti vnitřního osemení semen k. šírolistého (*E. helleborine*) ošetřených chlor. vápnem, testováno berberin hemisulfátem (barveno berberin hemisulfátem po dobu 60 min, $n = 30$).

Z grafu 2 vidíme, že vnitřní osemení v semenech prstnatce májového bylo propustnější, než vnitřní osemení kruštíku. Již u neošetřených semen prstnatce májového byla polovina embryí zařazena do kategorie zcela propustné. Po ošetření 30 min v roztoku chlorového vápna se poměr příliš nezměnil, i když překvapivě mírně narostl poměr nepropustných semen. Po ošetření 60 min v roztoku chlorového vápna bylo 65 % semen zcela propustných, 23 % málo propustných a jen 13 % nepropustných pro vodu.



Graf 2 Míra propustnosti vnitřního osemení semen p. májového (*D. majalis*) ošetřených chlor. vápnem, testováno berberin hemisulfátem (barveno berberin hemisulfátem po dobu 60 min; $n = 30$).



Obrázek 13 Kategorie míry propustnosti vnitřního osemení semen k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*), barveno berberin hemisulfátem po dobu 60 min; snímky z konfokálního mikroskopu (excitace 405nm, emise 530-570nm, gain 250), měřítko = 50 μ m.

Na základě testování propustnosti semen jsem zjistila, že

- Pokud je po ošetření semen EtOH a roztokem chlorového vápna propustné vnější osemení, pak je možné tuto propustnost u naprosté většiny semen detekovat prostřednictvím apoplastické sondy PTS ihned po kontaktu semen a sondy, nebo ve velmi krátké době po inkubaci semen v apoplastické sondě.
- I po krátkém ošetření semen v EtOH a roztoku chlorového vápna dochází ke zpropustnění vnějšího osemení. S narůstající dobou ošetření chlorovým vápnem dochází k narůstání propustnosti vnitřního osemení u obou testovaných druhů.
- U suchých neošetřených semen je nutné semena odvodušnit, aby došlo ke kontaktu semene s barvicím roztokem a bylo možné testovat propustnost vnitřního osemení.
- Změny v propustnosti vnějšího osemení jsou výraznější a detekované u většího počtu semen u prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) než u kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*).
- Pro překonání vnitřního osemení kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) je třeba dlouhé ošetření chlorovým vápnem, a přesto zůstává velká část semen nepropustná.

6.3. Histochemická analýza vlastností osemení

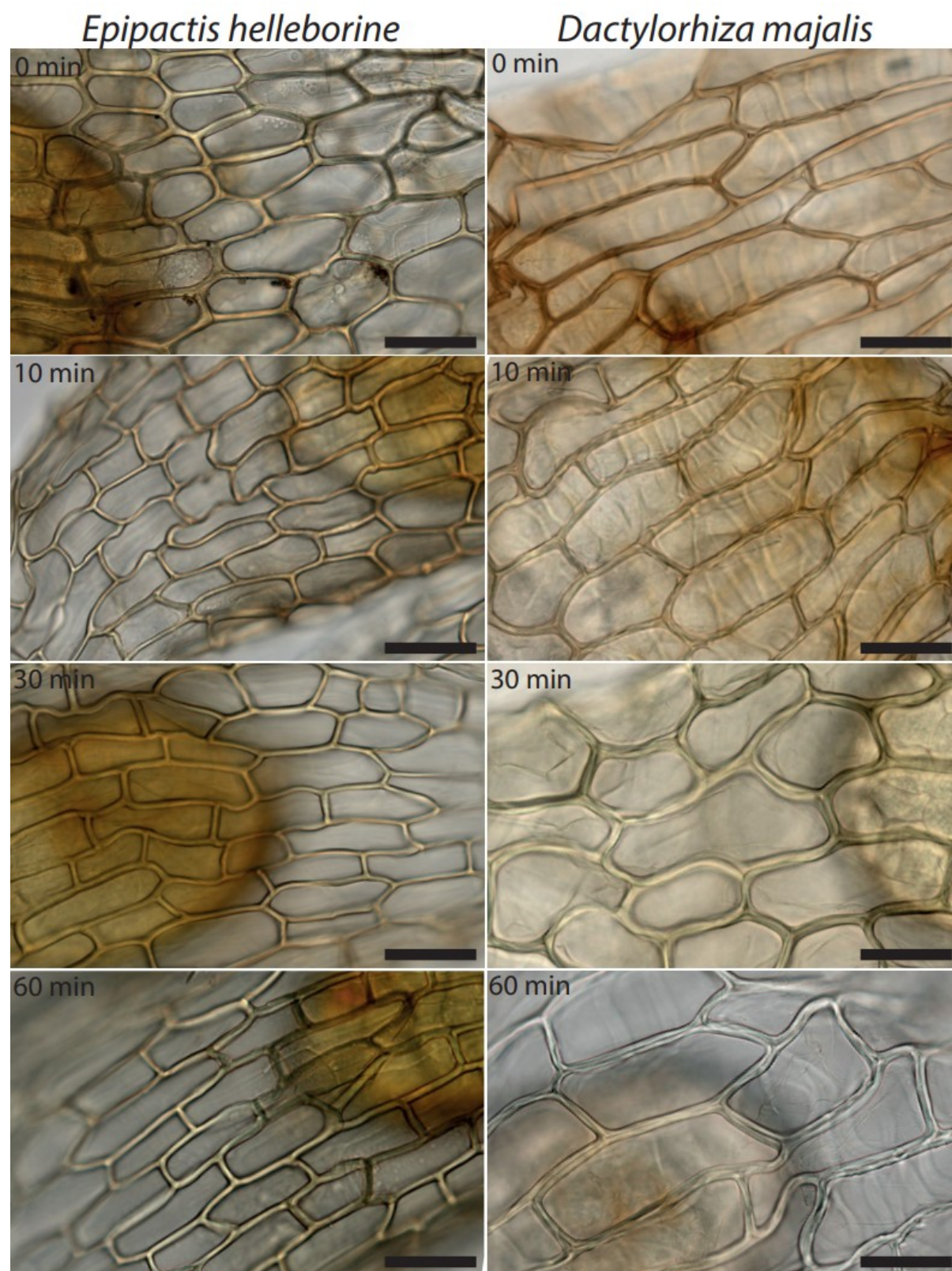
6.3.1. Vnější osemení

Nejprve jsem se zaměřila na sledování změn ve vnějším osemení, což se lépe provádělo na celých semenech než na řezech zhotovených na kryotomu, kde bylo vnější osemení často rozdrčeno na velmi malé fragmenty.

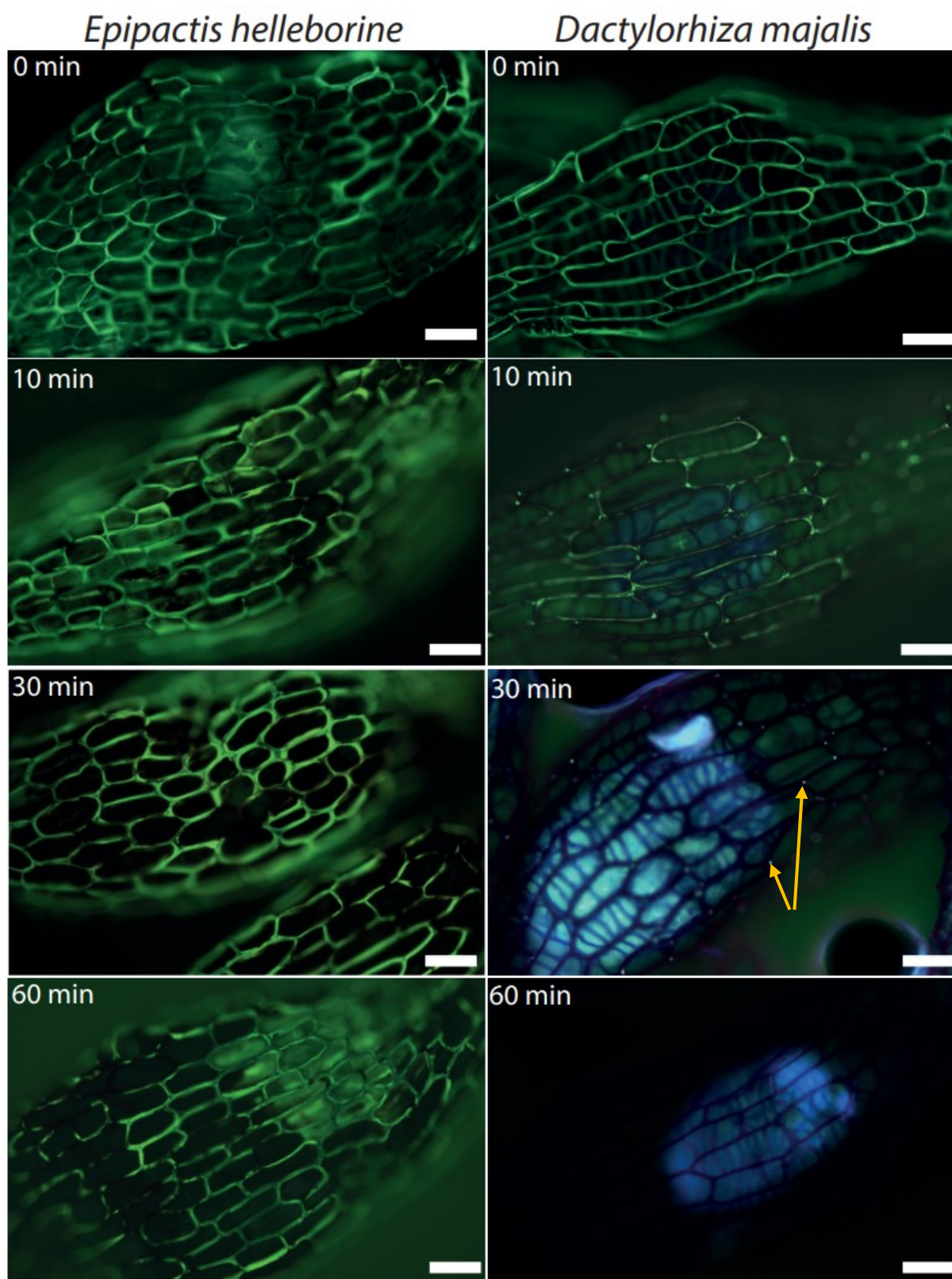
Lignin byl histochemicky detekován ve vnějším osemení u semen kruštíku širolistého i prstnatce májového, a to u semen neošetřených i semen ošetřených EtOH a roztokem chlorového vápna. U prstnatce májového docházelo s prodlužující se dobou ošetření semen chlorovým vápnem k výraznějším změnám v depozici ligninu ve vnějším osemení v porovnání se semeny kruštíku širolistého (obrázek 14 a 15), což koresponduje s předchozími výsledky z analýzy propustnosti semen. Na obrázku 15 vidíme, že i u kruštíku dochází po chemické skarifikaci k postupné ztrátě lignifikace ve vnějším osemení, tyto úbytky ligninu jsou však podstatně slabší a ostrůvkovité. S narůstající dobou ošetření roztokem chlorovým vápnem narůstá heterogenita rozložení ligninu ve vnějším osemení. V případě semen prstnatce májového jsou změny výraznější. U neošetřených semen je lignin rozložen homogenně, to se však mění již po 10 min ošetření

chlorovým vápnem. Tyto změny jsou ještě patrnější po 30 min inkubaci v roztoku chlorového vápna. Lignin zůstává detekovatelný berberin hemisulfátem jen v rozích buněčných stěn, kde se buňky stýkají. V ostatních částech vnějšího osemení již lignin není detekovatelný. Po 60 min v roztoku chlorového vápna dochází ke ztrátě lignifikace ve vnějším osemení do té míry, že již není použitým histochemickým barvením detekovatelný. Tyto změny byly detekovány nejen pomocí berberin hemisulfátu a dobarvení genciánovou violetí, ale i pomocí floroglucinolu (obrázek 14). Změny v depozici ligninu však nebyly po obarvení floroglucinolem tak dobře pozorovatelné, jako po obarvení berberin hemisulfátem a genciánou violetí, neboť pozitivní výsledek detekce floroglucinolem se projevuje vznikem červeného zbarvení, které je u hnědého osemení špatně pozorovatelné. Zároveň při ošetření chlorovým vápnem dochází k odbarvení osemení, je tedy obtížné porovnávat varianty mezi sebou.

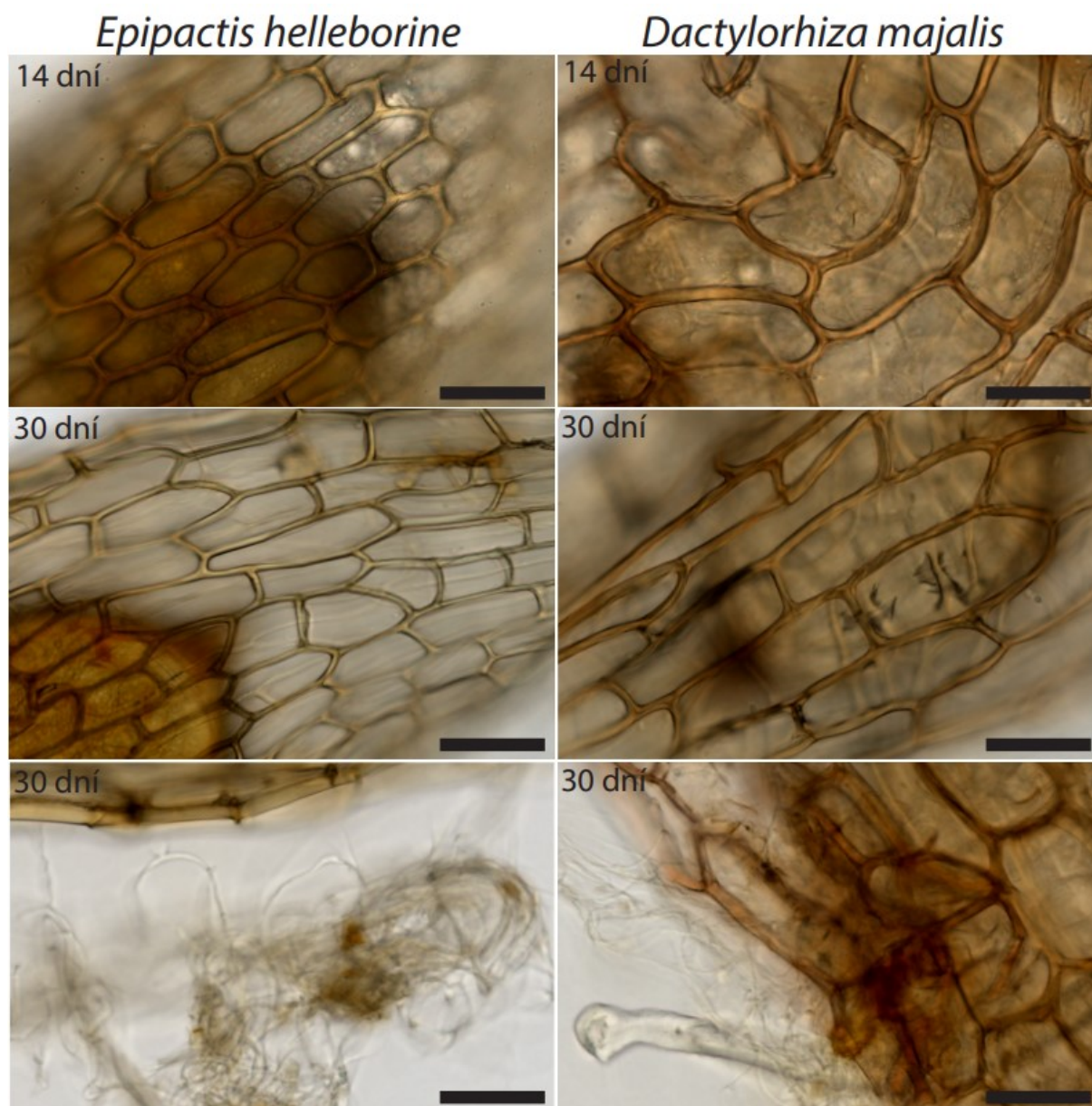
Dále jsem provedla histochemickou detekci ligninu u semen máčených v destilované vodě po dobu 14 a 30 dní před barvením. Na obrázku 16 vidíme semena obou zkoumaných druhů barvených floroglucinolem. Na spodních obrázcích vidíme houbové mycelium, které u nesterilních semen během inkubace ve vodě narostlo. Vzhledem k tomu, že vnější osemení je hnědé a v průběhu máčení svou barvu neztrácí, jsou fotografie porovnatelné, ale červené zbarvení detekující přítomnost ligninu je těžko rozeznatelné. Proto jsem i v tomto případě semena barvila i citlivějším fluorescenčním barvivem (berberin hemisulfátem a genciánovou violetí; obrázek 17). Z tohoto obrázku je zřejmé, že již u 14 dní máčených semen kruštíku široolistého je rozložení ligninu nehomogenní a s prodlužující se dobou máčení se zvětšují oblasti, kde lignin není detekovatelný. Tato místa jsou na semenech náhodně rozmístěna a ze snímku celého semene je patrné, že většina ligninu v osemení zůstává. Naopak semena prstnatce májového měla po 14 dnech máčení v destilované vodě lignin homogenně rozložený, ale po 30 dnech došlo k jeho výraznému až úplnému úbytku na koncích semen. Ve středové části semene, kde se pod vnějším osemením nachází embryo, lignin zůstal detekovatelný pomocí berberin hemisulfátu. Tento jev byl velmi častý, nevyskytoval se však u 100 % pozorovaných semen.



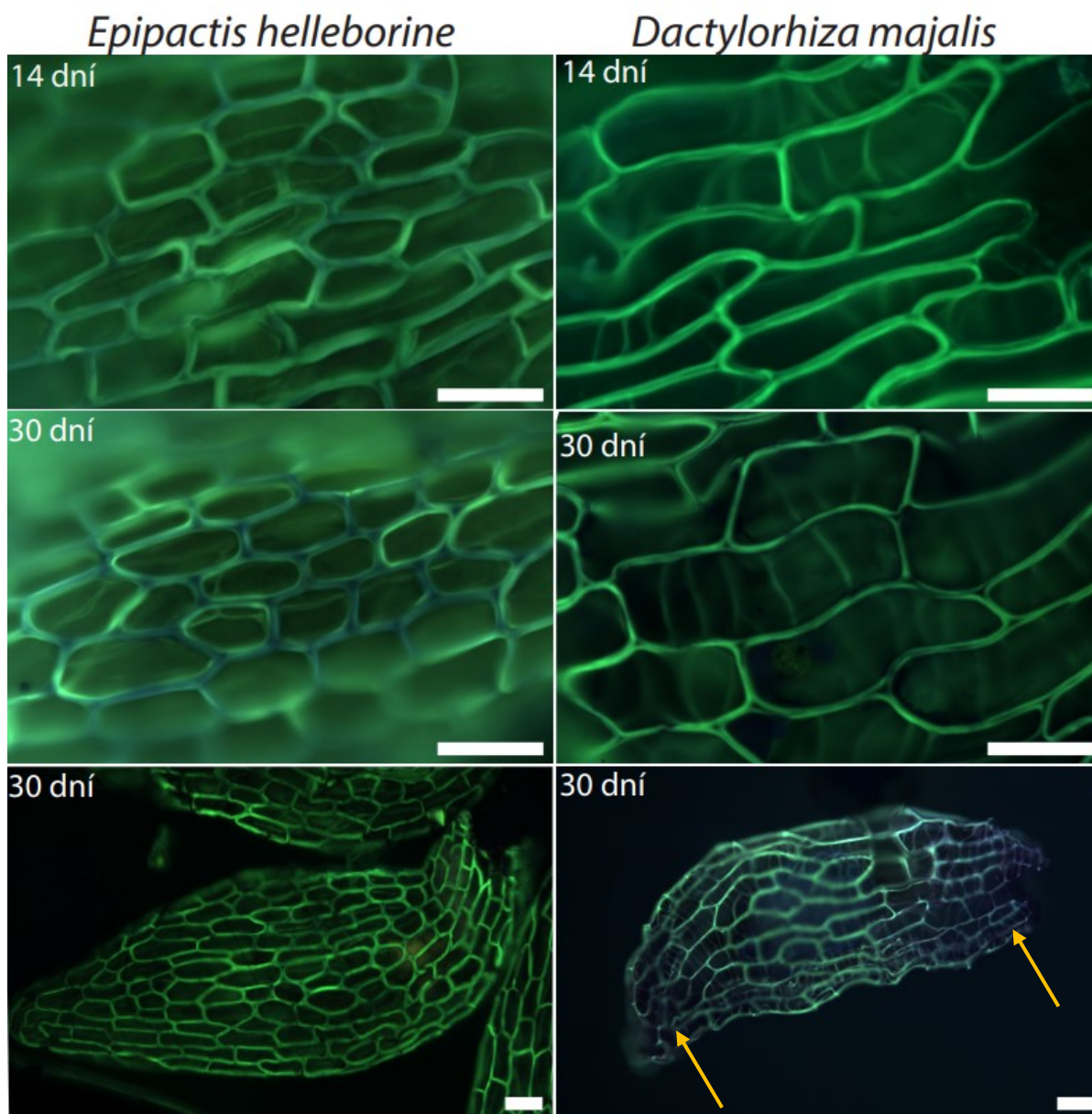
Obrázek 14 Semena k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) ošetřená chlor. vápnem (doba ošetření uvedena u jednotlivých snímků), barvená floroglucinolem 5 min; měřítko = 50 μm; snímáno ve světlém poli.



Obrázek 15 Semena k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) ošetřená chlor. vápnem (doba ošetření uvedena u jednotlivých snímků), barvená berberin hemisulfátem 60 min a dobarvená genciánovou violetí 10 min; měřítko = 50 μ m, lignifikované buněčné stěny jsou zbarveny žlutě; šipky označují oblasti buněčných stěn, kde u semen p. májového zůstává po ošetření EtOH a následně chlor. vápnem po dobu 30 min lignin detekovatelný. Snímáno při excitaci UV zářením (filtr blok Olympus U-MWU).

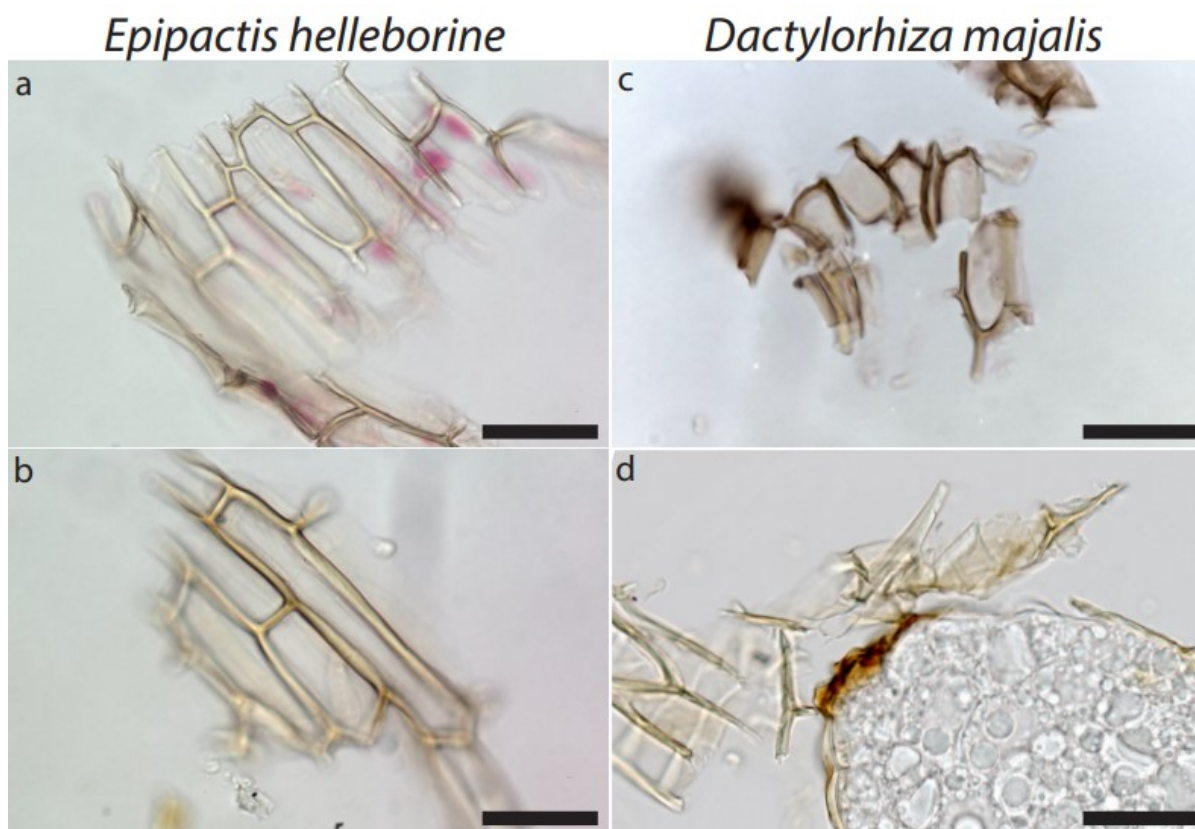


Obrázek 16 Semena k. širolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) máčená v ddH₂O po dobu 14 a 30 dní před barvením (dobu máčení uvedena u jednotlivých snímků), barvená floroglucinolem 5 min; měřítko = 50 μm; snímáno ve světlém poli. Na spodních snímcích samovolně narostlé houbové mycelium.



Obrázek 17 Semena k. širolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) máčená v ddH₂O po dobu 14 a 30 dní před barvením (dobu máčení uvedena u jednotlivých snímků), barvená berberin hemisulfátem 60 min a dobarvená genciánovou violetí 10 min; měřítko = 50 μ m; lignifikované buněčné stěny jsou zbarveny žlutě; šipky označují koncové části vnějšího osemení p. májového, které vykazují slabší barvitelnost berberinem. Snímáno při excitaci UV zářením (filtr blok Olympus U-MWU).

Vnější osemení jsem také testovala na přítomnost lipidického materiálu (suberin nebo kutinu) barvením sudanovou červení 7B. Snímky z detekce vidíme na obrázku 18. Ve vnějším osemení však přítomnost lipidického materiálu barvitelného sudanovou červení 7B prokázána nebyla. Tato pozorování byla potvrzena i citlivějším barvením fluorescenčním barvivem Fluorol Yellow 088.



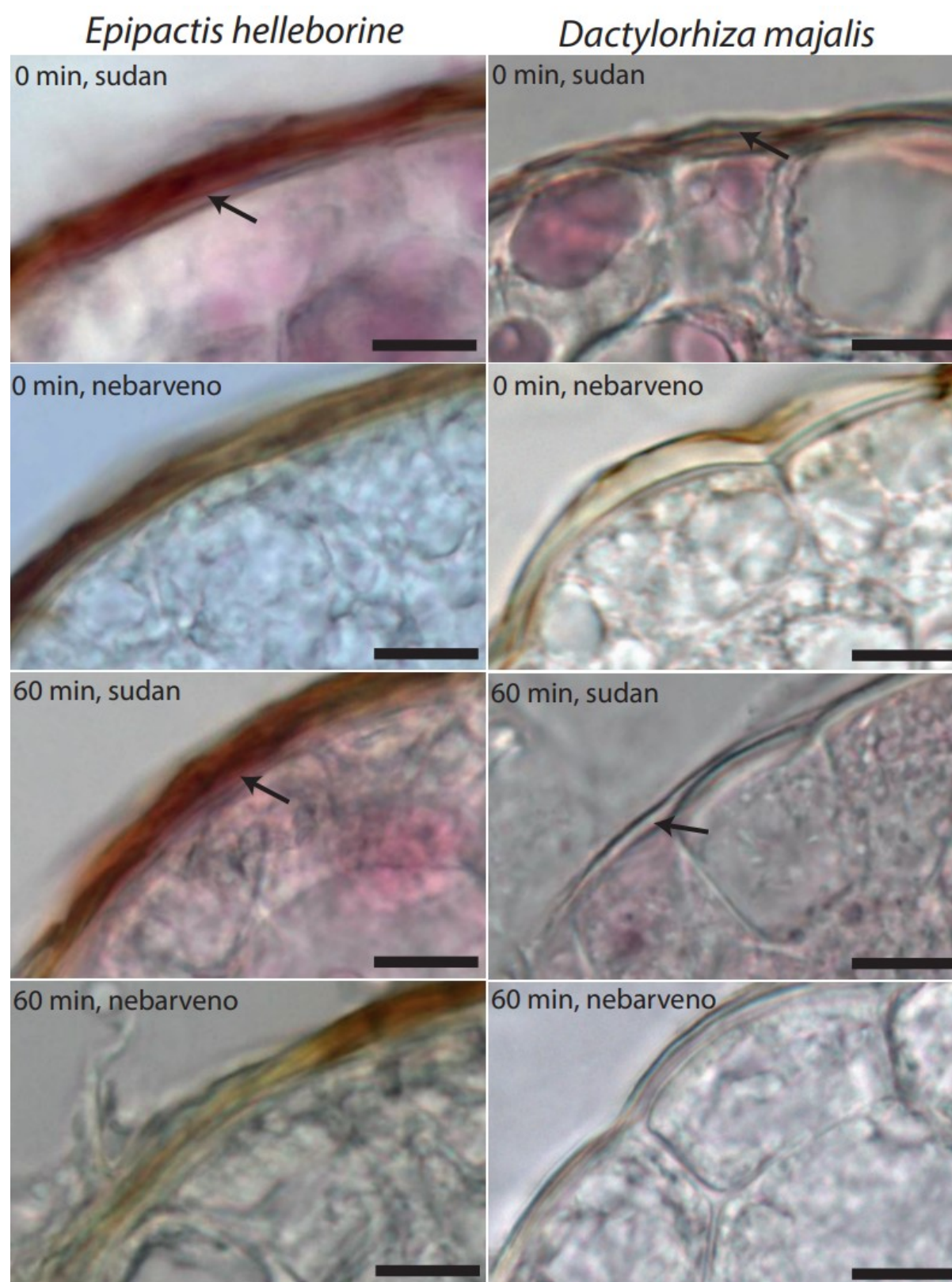
Obrázek 18 Vnější osemení neošetřených semen k. širolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*), měřítko = 50 μm ; a, c – barveno sudanovou červení 7B po dobu 120 min, b, d – nebarveno; snímáno ve světlém poli.

6.3.2. Vnitřní osemení

Dále jsem analyzovala chemické vlastnosti vnitřního osemení. Tato analýza probíhala na řezech, aby bylo vnitřní osemení lépe pozorovatelné a barvitelné. Testovala jsem semena kruštíku širolistého a prstnatce májového neošetřená (suchá) a semena ošetřená EtOH a roztokem chlorového vápna po dobu 10, 30 a 60 min. Nejprve jsem vnitřní osemení testovala na přítomnost ligninu barvením floroglucinolem a následně i barvením fluorescenčním berberin hemisulfátem v kombinaci s genciánovou violetí. Žádné z barvení neukazovalo na přítomnost ligninu ve vnitřním osemení. Při excitaci UV světlem jsem však pozorovala silnou autofluorescenci, která se s ošetřením trochu mění, v rámci semen jsem však pozorovala velkou heterogenitu (obrázek 5).

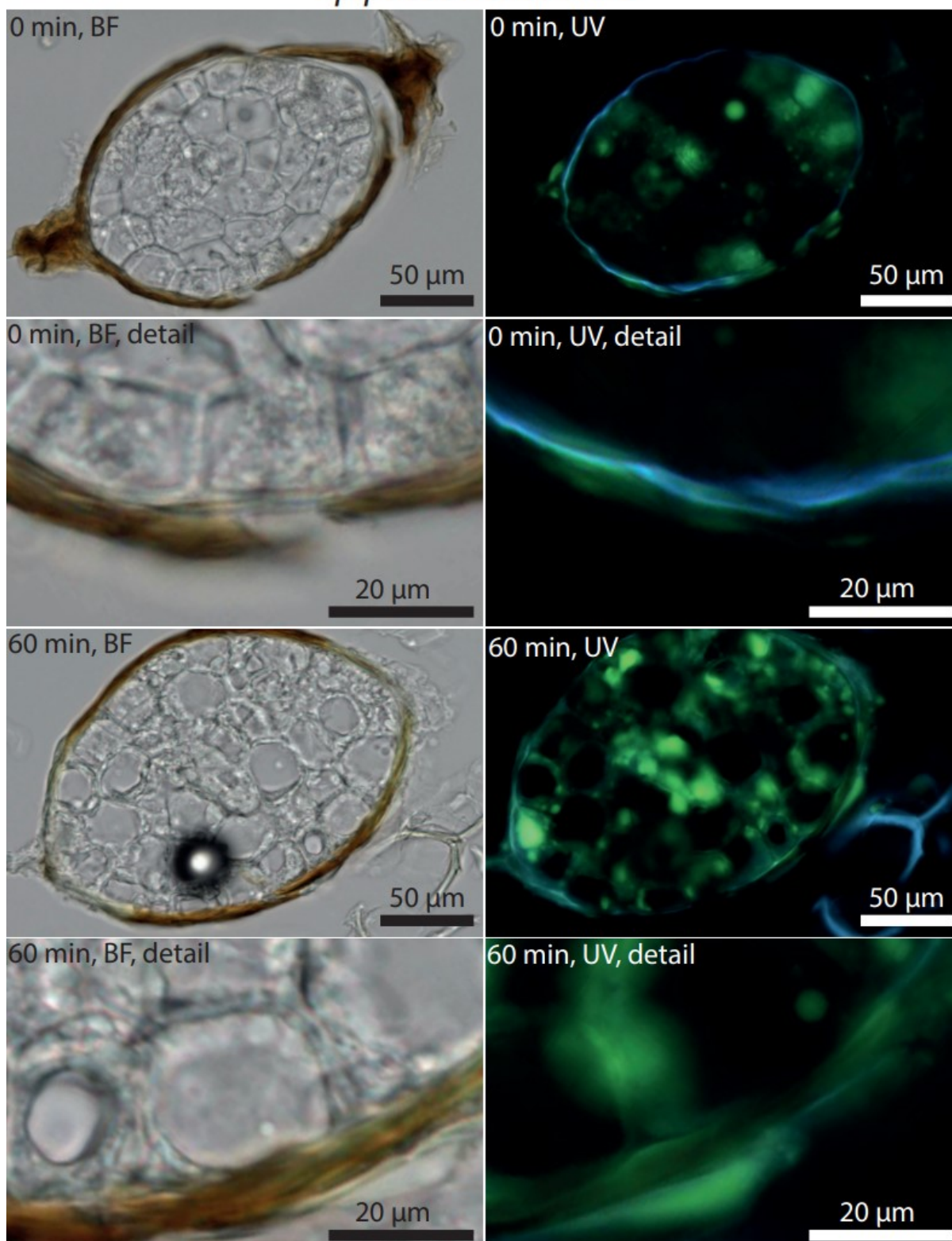
Dále jsem vnitřní osemení testovala na přítomnost lipidického materiálu (kutinu nebo suberinu) barvením sudanovou červení 7B (obrázek 19). Na snímcích vidíme, že ve vnitřním osemení je tenká vrstva, která se pravděpodobně červeně barví. Není to však možné tvrdit s naprostou jistotou. Další komplikací při pozorování je hnědě zbarvené neošetřené osemení a červená barva detekující přítomnost lipidického materiálu. I přesto je červená linka docela dobře pozorovatelná u kruštíku širolistého, jehož vnitřní osemení je mohutné. Naopak vnitřní osemení

prstnatce májového je velmi tenké a na řezech se často odtrhává od embrya. U těchto semen je výsledek detekce nejistý. Proto jsem semena barvila citlivější fluorescenční Fluorol Yellow 088 (obrázky 20 a 22). Pro snadnější orientaci a přehlednost je na snímku vždy stejné embryo ve světlém poli i při excitaci UV světlem a dále detail zaměřený na vnitřní osemení. V tomto případě vyhodnocení pozorování komplikuje silná autofluorescence (obrázky 21 a 23), k určitému posunu barvení však dochází. Pouze na základě histochemického barvení nicméně není možné s jistotou říci, zda se lipidický materiál ve vnitřním osemení skutečně nachází. Je potřeba provést i jeho biochemickou analýzu. Detaily vnitřního osemení po barvení Fluorol Yellow 088 byly snímány i na konfokální mikroskopu LeicaSP8 (obrázek 24). Ani tyto snímky však nepřinesly jednoznačné potvrzení přítomnosti vrstvy lipidického materiálu. Je na nich však dobře patrná přítomnost dvou silně autofluorescenčních vrstev ve vnitřním osemení. Vzhledem k silné autofluorescenci, která však vzhledem k heterogenitě semen výrazně komplikuje hodnocení vlivu ošetření, nebylo možné jednoznačně hodnotit vliv ošetření roztoku chlorového vápna.



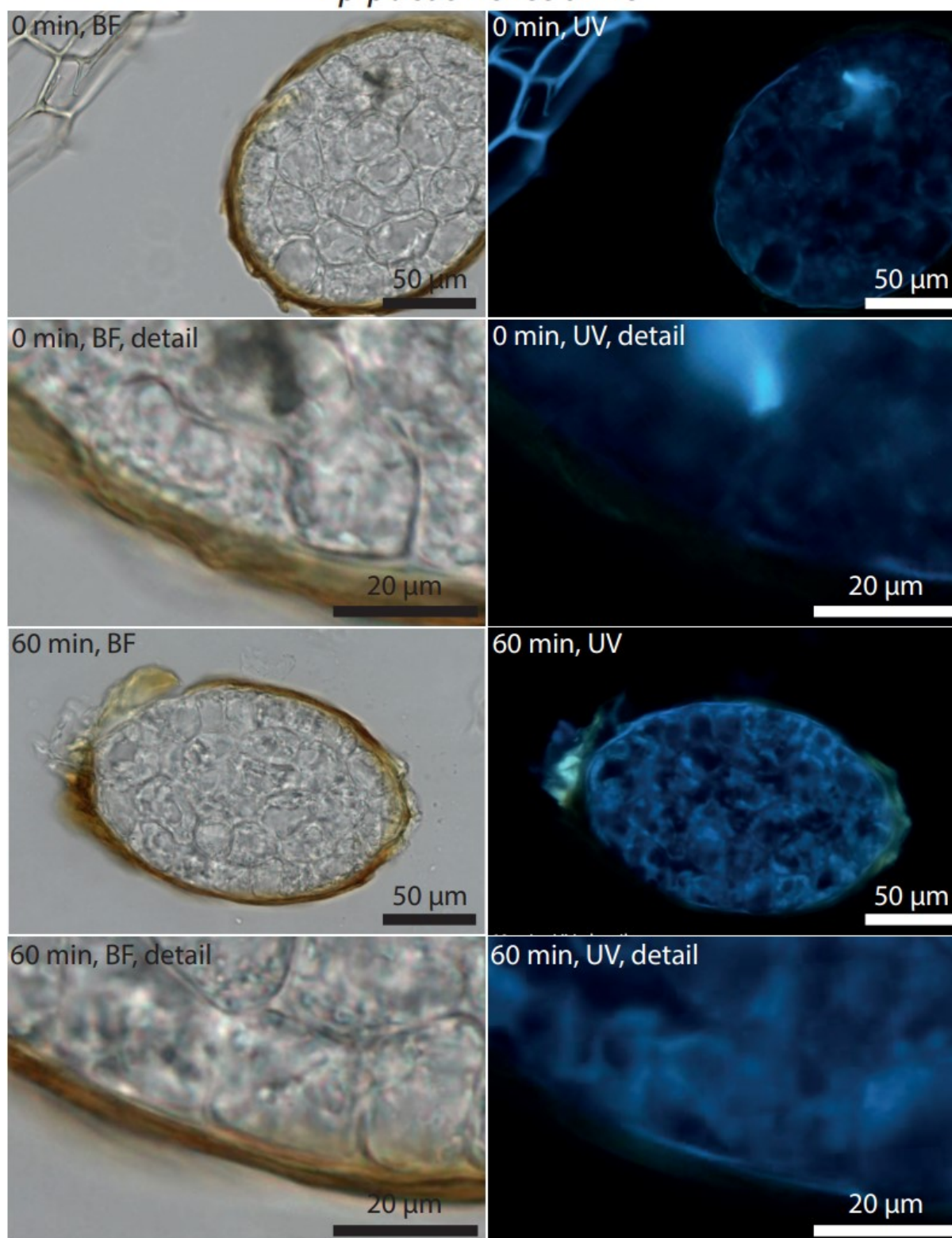
Obrázek 19 Semena k. širolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) ošetřená chlor. vápnem po různě dlouhou dobu (dobu ošetření uvedena u jednotlivých snímků; nebarveno – negativní kontrola k detekci, sudan - barvení sudanovou červení 7B po dobu 60 min; měřítko = 50 μ m; snímáno ve světlém poli.

Epipactis helleborine



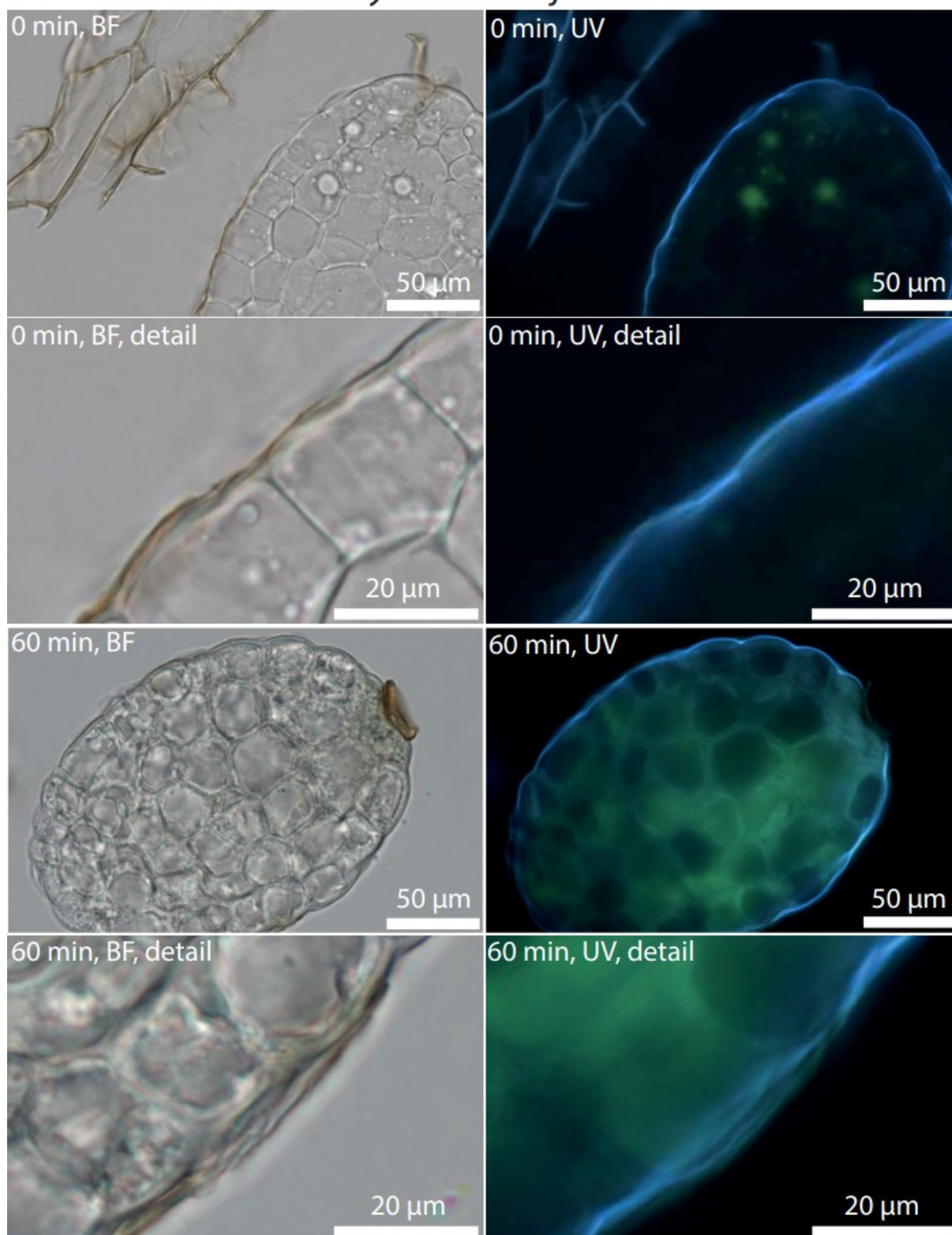
Obrázek 20 Semena k. šírolistého (*E. helleborine*) barvena Fluorol Yellow 088 po dobu 60 min, v min je uvedena doba ošetření chlor. vápnem; BF – pozorování probíhalo ve světlém poli (z angl. bright field), UV – pozorování identického semene při excitaci ultrafialovým zářením (z angl. ultraviolet; filtr blok Olympus U-MWU).

Epipactis helleborine



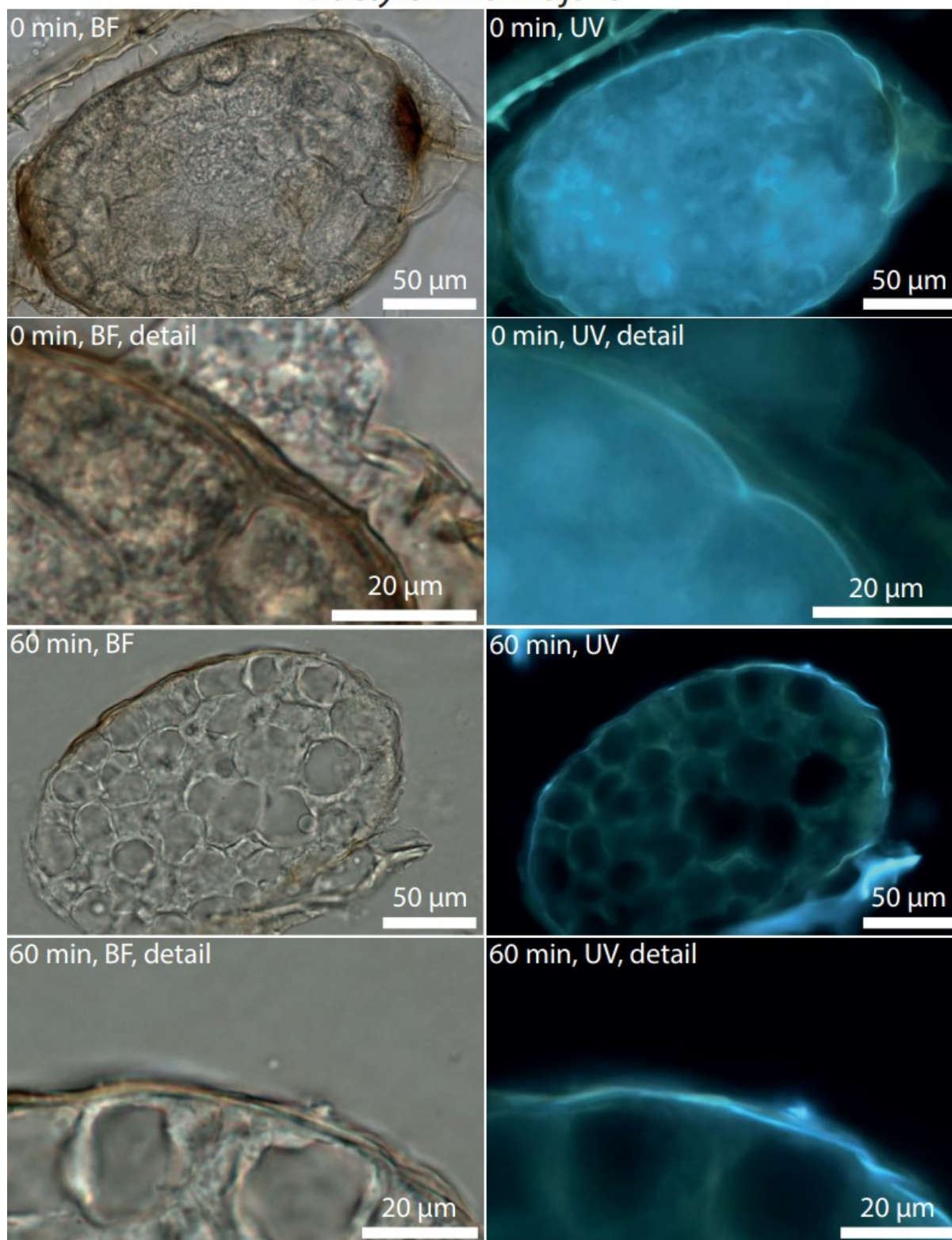
Obrázek 21 Autofluorescence semen k. šírolistého (*E. helleborine*), nebarveno, v min je uvedena doba ošetření chlor. vápnem; BF – pozorování probíhalo ve světlém poli (z angl. bright field), UV – pozorování identického semene při excitaci ultrafialovým zářením (z angl. ultraviolet; filtr blok Olympus U-MWU).

Dactylorhiza majalis

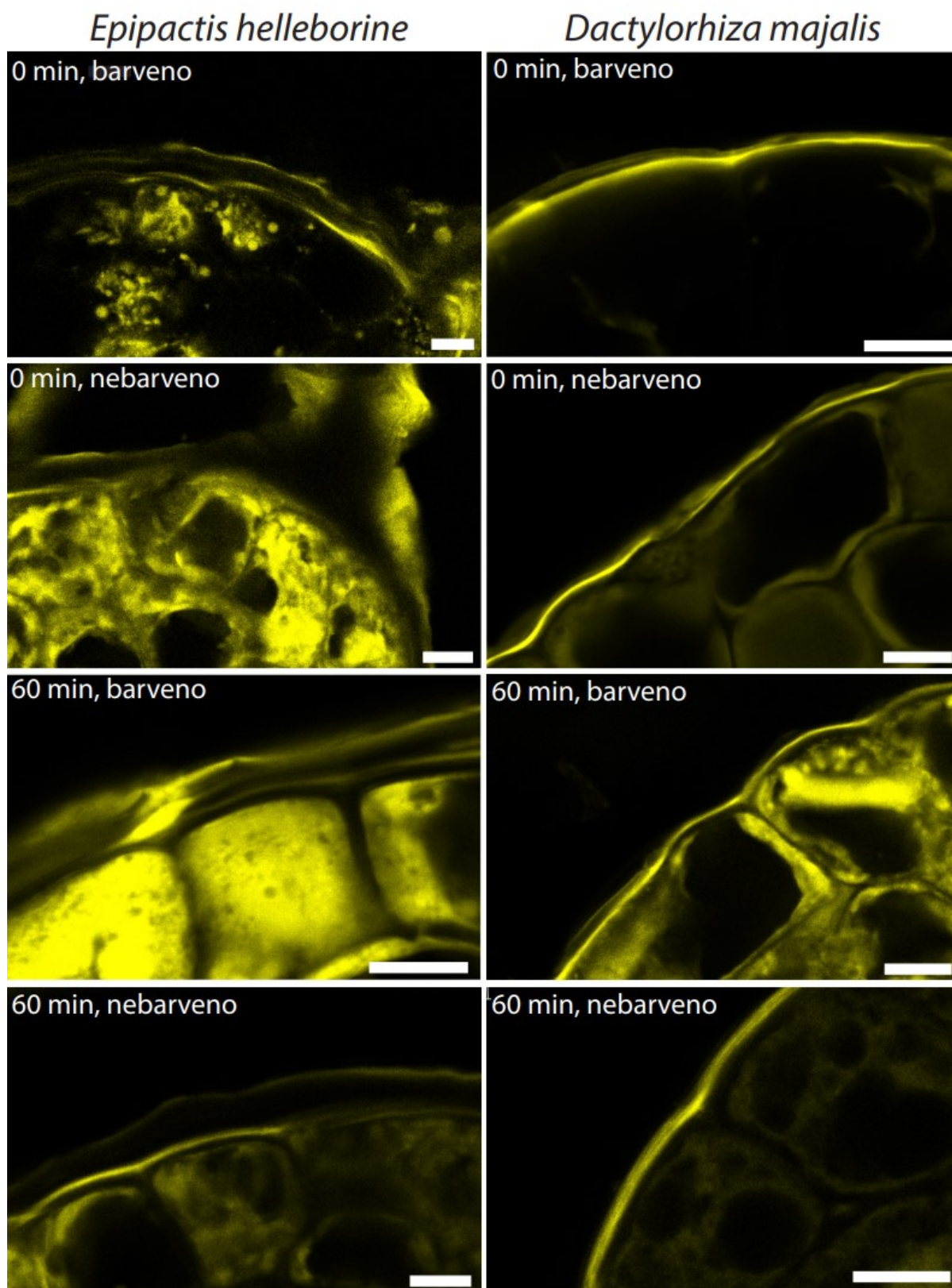


Obrázek 22 Semena *p. májového* (*D. majalis*) barvena Fluorol Yellow 088 po dobu 60 min, v min je uvedena doba ošetření chlor. vápnem; BF – pozorování probíhalo ve světlém poli (z angl. bright field), UV – pozorování identického semene při excitaci ultrafialovým zářením (z angl. ultraviolet; filtr blok Olympus U-MWU).

Dactylorhiza majalis



Obrázek 23 Autofluorescence semen *p. májového* (*D. majalis*), nebarveno, v min je uvedena doba ošetření chlor. vápnem; BF – pozorování probíhalo ve světlém poli (z angl. bright field), UV – pozorování identického semen při excitaci ultrafialovým zářením (z angl. ultraviolet; filtr blok Olympus U-MWU).



Obrázek 24 Detail vnitřního osemení k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*) po ošetření 4 min EtOH a v různých délkách chlor. vápnem (délka ošetření je uvedena v min), snímáno na konfokálním mikroskopu (excitace 405 nm, emise 529-572), barvení Fluorol Yellow 088 po dobu 60 min, měřítko = 10 μ m; EH 0 min barveno – gain 497, EH 0 min nebarveno – gain 497, EH 60 min barveno – gain 86,8, EH 60 min nebarveno – gain 150, DM 0 min barveno – gain 50, DM 0 min nebarveno – gain 42, DM 60 min barveno – gain 150, DM 60 min nebarveno – gain 230.

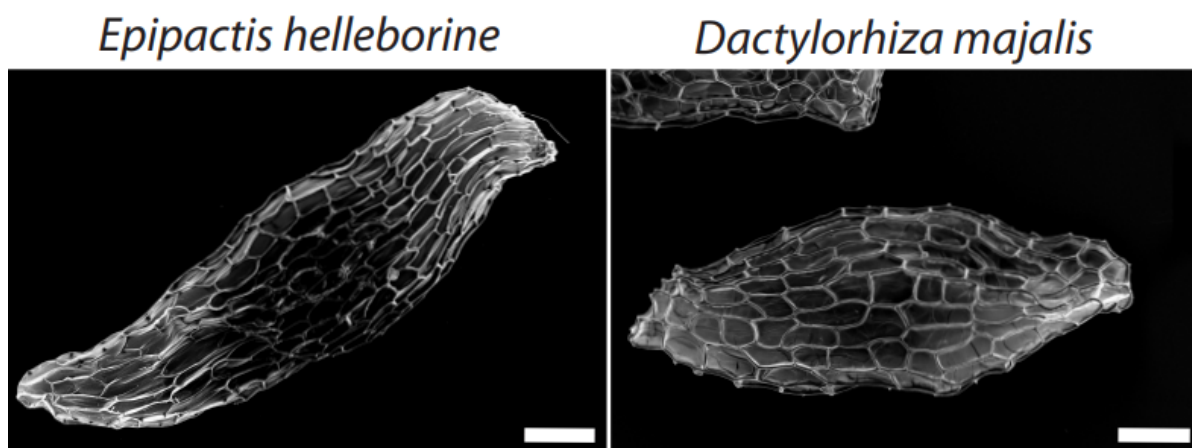
Na základě histochemické analýzy osemení jsem zjistila, že:

- Kruštík širolistý (*Epipactis helleborine*) má mohutnější vnitřní osemení než prstnatec májový, což by mohlo mít souvislost s fyzikální dormancí.
- Ošetření semen EtOH a roztokem chlorového vápna vede k postupné ztrátě hnědého zbarvení osemení, což komplikuje detekci složek osemení sudanovou červení 7B a floroglucinolem, neboť pozitivním výsledkem detekce je červené zbarvení, které je v kombinaci s hnědou špatně pozorovatelné. Je tedy vhodnější použít fluorescenční barvení.
- Vlivem ošetření semen EtOH a chlorovým vápnem dochází ke snížení množství detekovatelného ligninu ve vnějším osemení.
- Přítomnost lipidického materiálu (kutin u nebo suberinu), nebyla ani u jednoho zkoumaného druhu s jistotou prokázána, mnoho výsledků barvení však nasvědčuje existenci takových látek ve vnitřním osemení.
- Součástí vnitřního osemení je vrstva, která má silnou autofluorescenci; tato vrstva má větší mocnost u semen kruštíku širolistého, což by mohlo mít souvislost s fyzikální dormancí.

6.4. Ultrastruktura osemení

6.4.1. Skenovací elektronový mikroskop

Abych získala lepší představu o struktuře povrchu a celkovém vzhledu semen kruštíku širolistého a prstnatce májového, snímala jsem suchá neošetřená semena na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM) (obrázek 25). I v tomto případě se potvrdila vysoká heterogenita semen, a to především v jejich šířce. Celkově se ale od sebe tyto dva druhy nijak nápadně neliší. Většina buněk vnějšího osemení je tetra-, penta-, nebo hexagonální a jsou mírně protažené ve směru hlavní podélné osy. Přičemž u kruštíku širolistého byly buňky protaženější než u prstnatce májového. Ani na jednom konci jsem nepozorovala žádné speciální buňky. Antiklinálně orientované buněčné stěny jsou rovné, vyztužené a vystupují z povrchu osemení, které tedy není ploché. U obou druhů byla v některých buňkách jasně viditelná ornamentace tvořená periklinálními výztuhami buněčných stěn. Je možné, že v některých místech došlo k jejímu úplnému překrytí při pozlacování, a proto nemusela být patrná. Intercelulární mezery jsem nepozorovala.



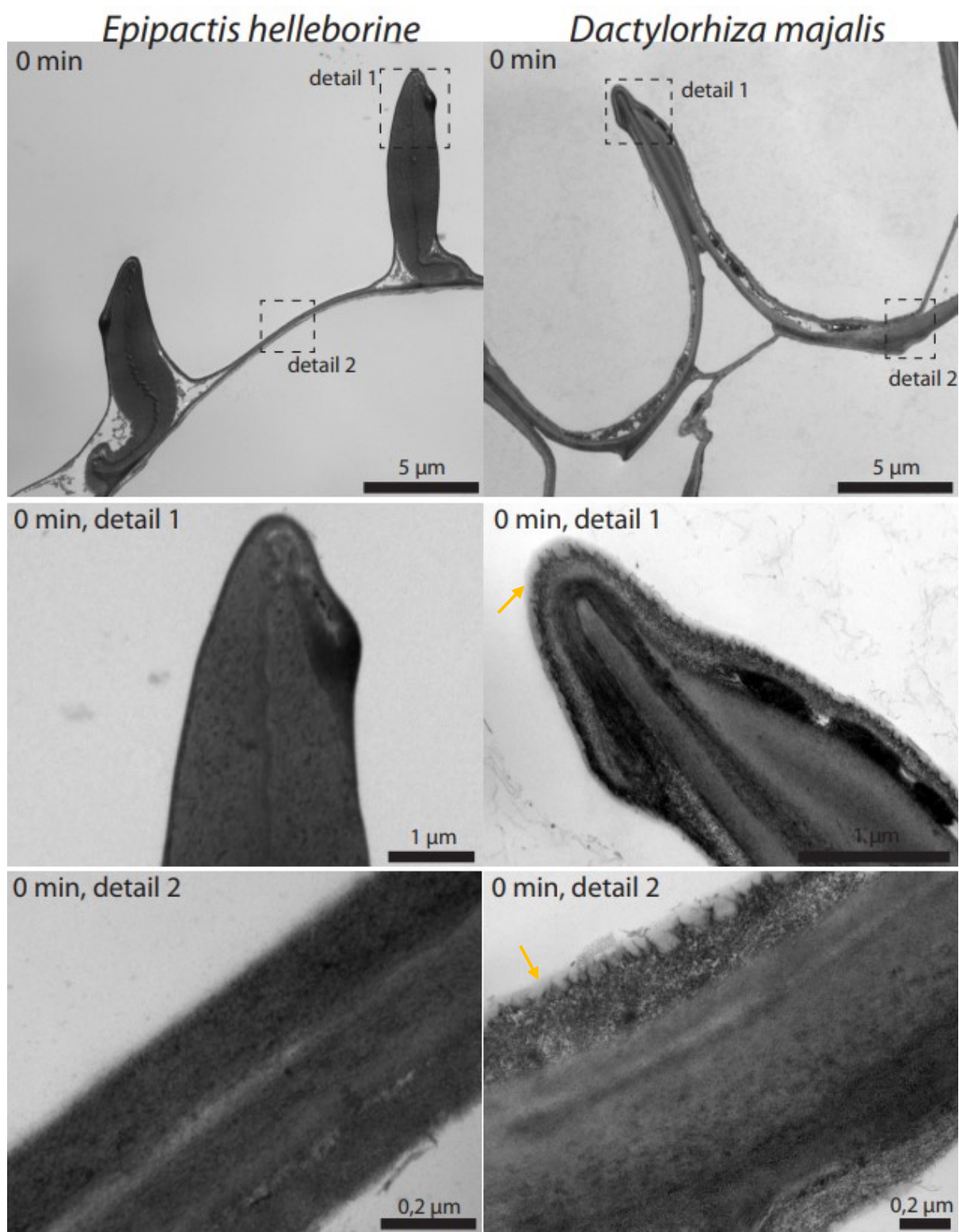
Obrázek 25 Snímky povrchu semen k. širolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*); měřítko = 100 μm .

6.4.2. Transmisní elektronový mikroskop

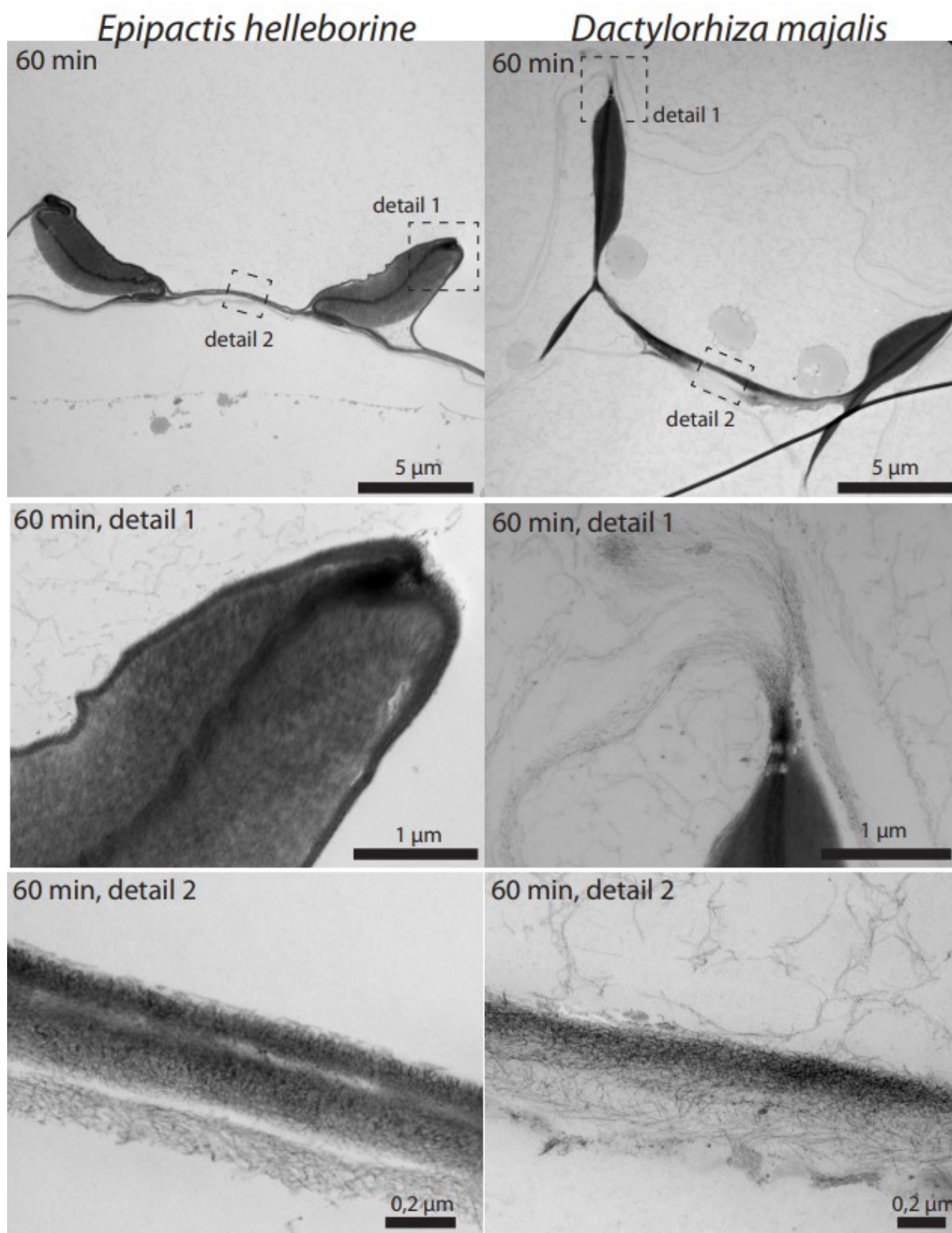
Analýza ultratenkých řezů pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) byla provedena pro získání detailnější informace o stavbě vnějšího i vnitřního osemení obou zkoumaných druhů. U kruštíku širolistého i prstnatce májového byla porovnávána varianta suchých, neošetřených semen a semen, která byla ošetřována 4 min EtOH a 60 min v roztoku chlorového vápna. U obou druhů u suchých semen vidíme pevné celistvé vnitřní i vnější osemení. Vnější osemení je u kruštíku širolistého pravděpodobně tvořeno jednou vrstvou kolabovaných buněk, které jsou v místě styku sousedních buněk antiklinálně vyztužené (obrázky 26 a 27). Vnější osemení prstnatce májového je velice podobné, ale pravděpodobně jej tvoří dvě vrstvy kolabovaných buněk. Periklinální buněčné stěny obou druhů jsou tenké a vnější buněčné stěny vnějších buněk osemení jsou jakoby propadlé dovnitř a těsně přiléhající k ostatním stěnám dotýčných buněk. Na povrchu vnějšího osemení u prstnatce májového se nachází vrstva, která vzhledem odpovídá kutikule (obrázek 26 detaily 1 a 2), při histochemické analýze se však vnější osemení Fluorol Yellow 088 nebarvilo. Po ošetření roztokem chlorového vápna došlo k rozvolnění tenkých primárních buněčných stěn, v antiklinálně vyztužených buněčných stěnách jsem žádné rozvolnění nepozorovala. U kruštíku širolistého jsou tyto změny méně výrazné než u prstnatce májového, u kterého je rozvolnění struktur rozsáhlejší (obrázky 28 a 29).

Pozorování vnitřního osemení se ukázalo náročnější. Problémem při snímání bylo nedostatečné prosycení semen pryskyřicí a možná i fixáží, kvůli čemuž docházelo k vylamování embryí z řezů a pozorovala jsem pouze malé části vnitřního osemení, které místy zůstaly v pryskyřici zachovány. Tento jev byl nejvýraznější u semen neošetřených chlornanem a od neošetřených semen prstnatce májového jsem nezískala žádné dostatečně kvalitní řezy vnitřním osemením. Podařilo se mi tedy zdokumentovat pouze strukturu vnitřního osemení ošetřených semen obou druhů a neošetřených semen kruštíku širolistého. Vnitřní osemení je u kruštíku

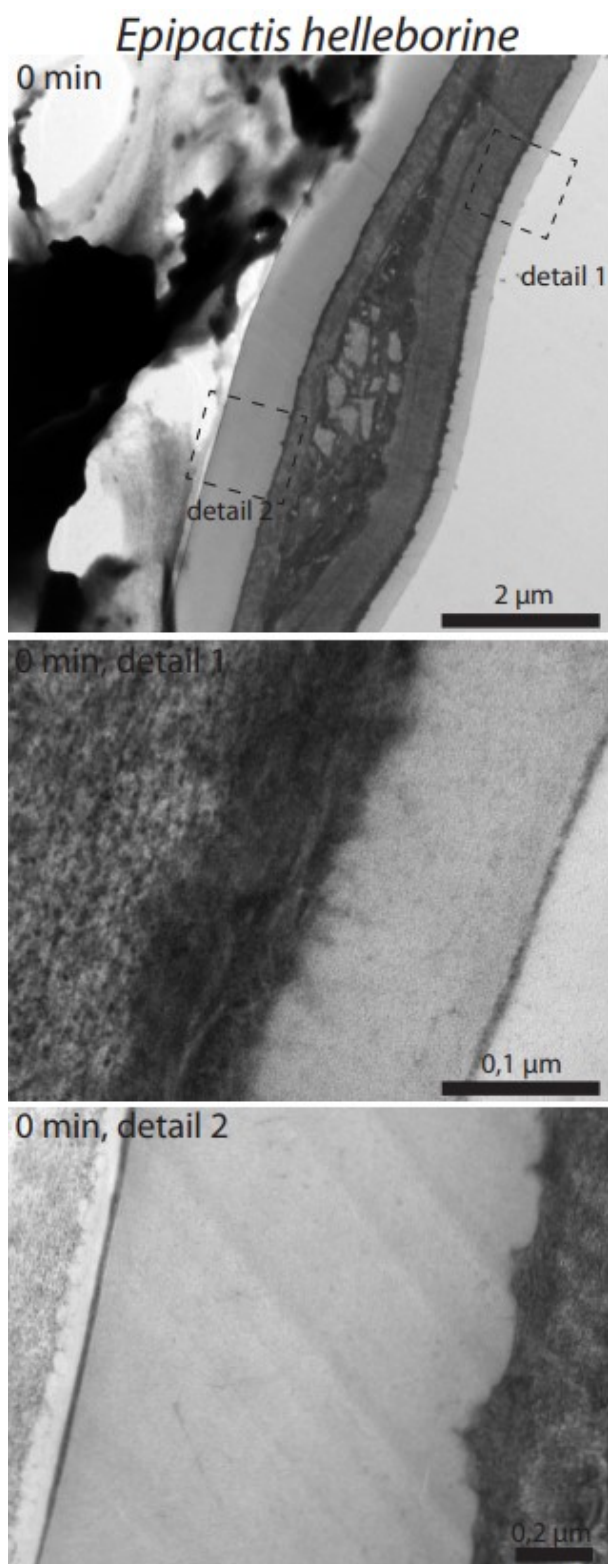
širolistého i prstnatce májového vícevrstevné. U neošetřených semen kruštíku širolistého je poměrně kompaktní a obsahuje vrstvy buněčné stěny s různým zastoupením polysacharidů (obrázek 28). Po ošetření chlorovým vápnem dochází k rozvolnění některých vrstev vnitřního osemení i celkovému rozvolnění vnitřního osemení, které tedy po ošetření ztrácí svou kompaktnost (obrázek 29). Nedochází však k rozpadu všech vrstev. Na povrchu embrya je u obou druhů i po ošetření chlorovým vápnem patrná vrstva vzhledem připomínající kutikulu (obrázky 28 a 29). Další vrstva, která svým vzhledem odpovídá kutikule, je vnější vrstva vnitřního osemení (obrázky 28 a 29).



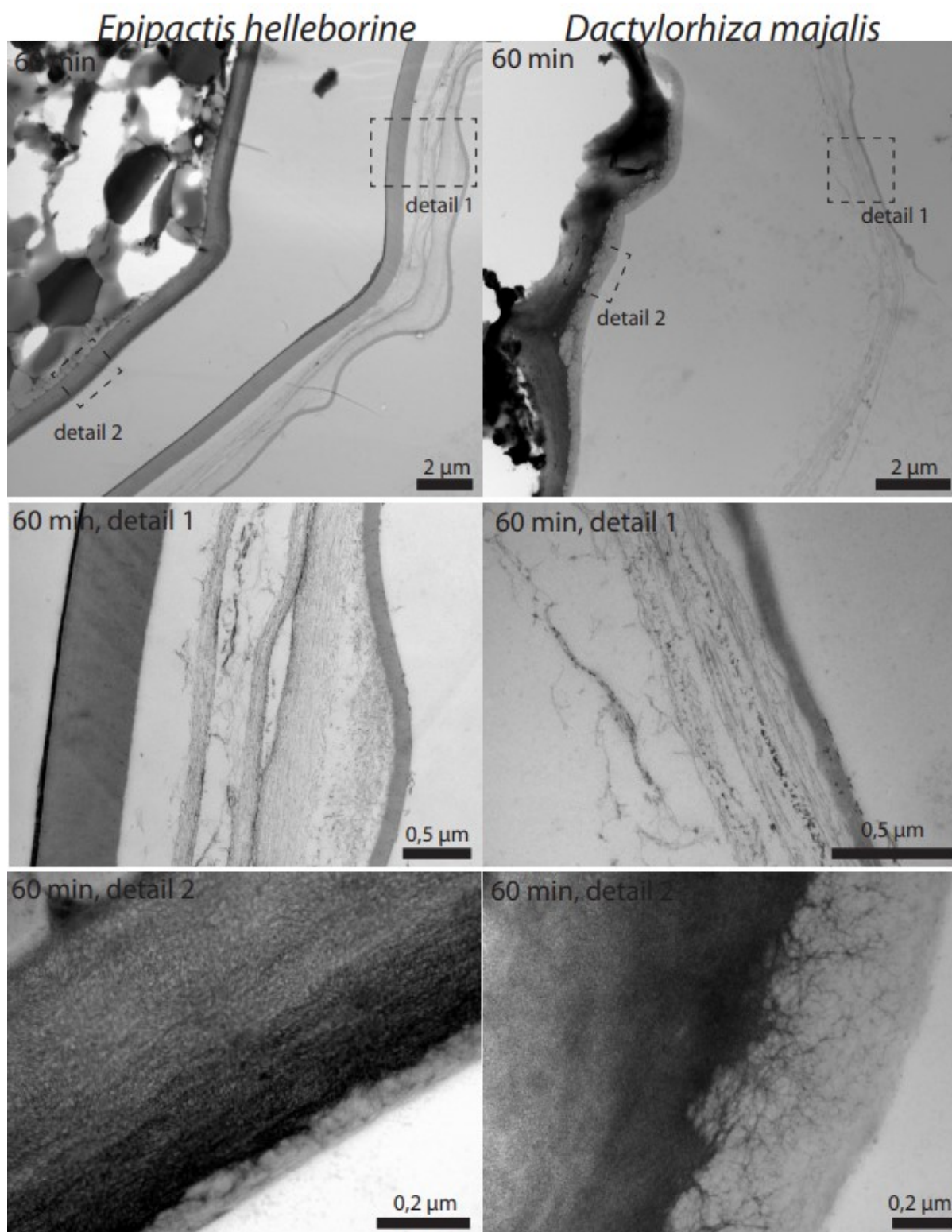
Obrázek 26 Příčné řezy vnějším osemením suchých neošetřených semen k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*); antiklinální buněčné stěny jsou ztlustlé, periklinální buněčné stěny tenké; obrázky jsou orientovány tak, že svrchní strana je vždy vpravo nahoře. Na detailech p. májového je na povrchu osemení patrná vrstva vzhledem odpovídající kutikule (zdůrazněno šipkami); snímáno na TEM.



Obrázek 27 Příčné řezy vnějším osemením ošetřených semen (4 min EtOH, 60 min chlor. vápno) k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*); antiklinální buněčné stěny jsou ztlustlé, periklinální buněčné stěny tenké a v důsledku ošetření se rozvolňují; obrázky jsou orientovány tak, že svrchní strana je vždy nahoře; snímáno na TEM.



Obrázek 28 Příčné řezy vnitřním osemením suchých neošetřených semen k. šírolistého (*E. helleborine*), vnitřní osemení je kompaktní, vícevrstvé, vnější vrstva vnitřního osemení a vrstva na povrchu embrya vzhledem připomínají kutikulu; snímky jsou orientovány tak, že embryo je vlevo, snímáno na TEM.



Obrázek 29 Příčné řezy vnitřním osemením ošetřených semen (4 min EtOH, 60 min chlor. vápno) k. šírolistého (*E. helleborine*) a p. májového (*D. majalis*), snímky jsou orientovány tak, že embryo je vlevo; vnitřní osemení je vícevrstevné, detaily 1 - pravděpodobně celulózní vrstvy se v důsledku ošetření rozvolňují, zatímco vnější vrstva vnitřního osemení vzhledem připomínající kutikulu zůstala kompaktní, detaily 2 - vrstva vzhledem připomínající kutikulu na povrchu embrya zůstala kompaktní; snímáno na TEM.

Na základě pozorování ultrastruktury osemení jsem zjistila, že:

- Antiklinální buněčné stěny jsou ztlustlé, zatímco periklinální stěny jsou tenké, díky čemuž povrch semen není hladký.
- Na povrchu vnějšího osemení prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) se nachází vrstva, která vzhledem odpovídá kutikule.
- Vnitřní osemení kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) i prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) je mnohvrstevné.
- Ve vnější vrstvě vnitřního osemení kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) i prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) se vyskytuje vrstva, která vzhledem odpovídá kutikule.
- Po ošetření semen kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) i prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) roztokem chlorového vápna dochází k rozvolnění pravděpodobně celulóзовých vrstev.
- Vrstvy vzhledem odpovídající kutikule, která se vyskytují ve vnější vrstvě vnitřního osemení a na povrchu embrya, vypadají, že ošetřením roztokem chlorového vápna nejsou ovlivněny ani u semen kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) ani u prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*).

7. DISKUZE

7.1. Výsev

Kultivace semen orchidejí v *in vitro* podmínkách ukázala, že pokud semena povrchově desinfikujeme korozivními roztoky chlornanů, vede to k podpoře klíčení semen. To bylo pozorováno již na velkém množství druhů (např. Harvais & Hadley, 1967; Eilhard, 1980; Harvais, 1980; Lindén, 1980, 1992), což vedlo k tomu, že se chlornany staly běžně používaným desinfekčním prostředkem před výsevem semen v aseptických podmínkách. V souladu s těmito pozorováními jsem ve svých experimentech s dlouhodobou kultivací semen v *in vitro* podmínkách zjistila, že pokud semena ošetříme EtOH a roztokem chlorového vápna, tak s narůstající dobou ošetření narůstá i klíčivost. Tento trend byl velmi dobře pozorovatelný zejména u prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*). Nejkratší doby ošetření roztokem chlorového vápna (4 min) vedly k nejnižším klíčivostem (necelých 15 % po 6 měsících kultivace), zatímco nejdelší doba (60 min) k nejvyšším klíčivostem (více než 70 % po 6 měsících kultivace). Kromě změny klíčivosti docházelo u semen také ke změně barvy. U krátce ošetřených semen bylo osemení stále tmavě hnědé. S prodlužující se dobou desinfekce získávalo světlejší odstín, až se semena odbarvila zcela. To odpovídá dřívějším pozorováním například u prstnatce nachového (*Dactylorhiza purpurea*), kdy u tohoto druhu bylo pozorováno, že optimální délka desinfekce trvá tak dlouho, dokud semena neztratí přirozené hnědé zbarvení (Harvais & Hadley, 1967). Zároveň však bylo zjištěno, že semena není možné desinfikovat neomezeně dlouho, ale od určitého druhově specifického bodu začne klíčivost různých druhů orchidejí dramaticky klesat (Lindén, 1980; Van Waes, 1984; Van Waes & Debergh, 1986a; Rasmussen, 1992; Miyoshi & Mii, 1998). Překvapilo mě, že jsem se k této hranici v případě chlornanů nedostala a pozorovala jsem pouze nárůst klíčivosti. Na základě poznatků z literatury o tom, že prstnatec májový je v umělých podmínkách snadno klíčící druh a k vyklíčení jeho semen je dostačující desinfekce 5 min v roztoku chlorového vápna (Ponert *et al.*, 2021), jsem očekávala, že po hodinové skarifikaci roztokem chlorového vápna již nebudou semena životaschopná. Velmi mě tedy překvapilo zjištění, že po takto dlouhém ošetření byla klíčivost nejvyšší a po půlroční kultivaci dosáhla 70 %. Vzhledem k dosaženým klíčivostem se domnívám, že již po krátké době desinfekce došlo ke zpropustnění některých semen, s narůstající dobou v chlornanu docházelo ke zpropustňování stále dalších semen a ta již propustná byla schopna v roztoku chlorového vápna přežít a později vyklíčit. Vzhledem k poměrně vysokým dosaženým klíčivostem je totiž nepravděpodobné, aby po každém testovaném času desinfekce klíčila jiná část semen. V budoucnu bych však ráda ještě s desinfekcí a výsevem těchto semen pokračovala a zjistila, po jak dlouhé době již chlornan embrya poškodí a semena nebudou schopna vyklíčit. To

by mohlo umožnit přesnější odhad toho, jak dlouho mohou semena setrávat v roztoku chlorového vápna v klíčení schopné podobě. U prstnatce májového s ohledem na 70% klíčivost předpokládám, že většina semen byla po hodině propustná pro vodu a nebudou schopna další hodinu odolávat působení chlornanu.

Také dlouhodobá kultivace semen v *in vitro* podmínkách kruštíku širolistého přinesla překvapivá pozorování. Semena kruštíků jsou v literatuře považována za velice obtížně klíčící (např. Lindén, 1980, 1992) a pokud v umělých podmínkách vůbec vyklíčí, tak to bylo pozorováno po velice dlouhém ošetření (několik hodin) slabým roztokem chlornanu (Van Waes, 1984; Van Waes & Debergh, 1986a; Rasmussen, 1992). Očekávala jsem, že se klíčivost bude i v případě poměrně silného roztoku použitého v této práci blížit nule a že semena budou klíčit pouze po dlouhém ošetření. Překvapilo mě tedy vyklíčení poměrně velkého počtu semen a především to, že ani po krátkém ošetření (4 min chlorové vápno a 4 min EtOH a 4 min chlorové vápno) nebyla klíčivost zcela nulová. Je možné, že se jedná o semena, která měla poškozené osemení, nebo u nich nebyla utvořena dostatečná dormance. Nejvyšší klíčivosti jsem ale dle předpokladu dosáhla po nejdelším ošetření chlorovým vápnem (60 min). Klíčivost v průběhu dlouhodobé kultivace postupně po celou dobu narůstala, podobně jako u prstnatce májového. Osobně si výrazné rozdíly v efektu ošetření EtOH a roztokem chlorového vápna na semena kruštíku širolistého a prstnatce májového vysvětluji tak, že se jedná o druhy rostoucí v odlišných podmínkách. Kruštík širolistý se přirozeně vyskytuje v lese, což je prostředí, kde je nutné mít vyvinuté mechanismy zajišťující vyšší odolnost semen a zároveň je výhodné tvořit velmi polymorfická semena, která budou schopna klíčit postupně a za odlišných podmínek, což zvyšuje šanci druhu na přežití (Stoutamire, 1974). Naopak prstnatec májový je druh orchideje rostoucí v bažinách. Velmi vlhké a stabilní prostředí vytváří menší selekční tlak na variabilitu semen a jejich odolnost k nepříznivým podmínkám. Vysokou přirozenou polymorfii semen předpokládal i Warren P. Stoutamire (1974), který své domněnky odůvodňoval tím, že vysoká polymorfie semen umožňuje semenné bance klíčit postupně, čímž se zvyšuje pravděpodobnost, že část semen vyklíčí do podmínek, které pro ně budou vhodné.

U kruštíku širolistého bych se ráda v budoucnu dále věnovala studiu vlivu ošetření roztokem chlorového vápna na klíčivost semen. Ráda bych vyzkoušela ještě delší doby desinfekce. Očekávám, že semena kruštíku širolistého přežijí výrazně delší desinfekci roztokem chlorového vápna než semena prstnatce májového, protože i po hodinové desinfekci semena kruštíku vykazovala jen velmi malou klíčivost. Domnívám se tedy, že je v případě použití chlorového vápna potřeba ještě delší chemická skarifikace, aby došlo k dostatečnému narušení osemení. Také je ale

možné, že v průběhu ošetření korozivním roztokem dochází k degradaci či vyplavování ABA, jejíž vysoká hladina klíčení inhibuje.

V této práci jsem zkusila nahradit roztok chlorového vápna roztokem chlornanu sodného v podobě přípravku SAVO, protože SAVO a jiné podoby roztoků obsahujících chlornan sodný jsou považovány za agresivnější a rychleji působící na semena orchidejí než roztoky obsahující chlornan vápenatý (Rasmussen, 1995 a citace uvnitř; Ponert *et al.*, 2011). Semena kruštíků, které jsem před kultivací ošetřila roztokem přípravku SAVO však překvapivě téměř neklíčila. V literatuře bývá doporučováno semena desinfikovat tak dlouho, aby získala zbarvení slonové kosti (např. Vejsadová, 2006). Tato doba v mém případě trvala 1 hodinu, a kromě této doby desinfekce jsem testovala kratší a delší časy, vždy stupňované po 15 minutách. I přesto byly výsledky kultivace semen v *in vitro* podmínkách po ošetření chlornanem sodným výrazně horší než po ošetření chlornanem vápenatým a nejvyšší klíčivost vykazovala semena po nejkratším ošetření. Vyšší klíčivost po ošetření chlornanem vápenatým v porovnání s ošetřením chlornanem sodným byla pozorována i při jiných kultivacích semen různých druhů orchidejí (Rasmussen, 1995; Vejsadová, 2006). V rámci některých experimentů byl však pozorován i opačný trend (Van Waes & Debergh, 1986a). V tomto směru jsou zajímavé výsledky mých experimentů s kruštíkem tmavočerveným, jehož semena sice prakticky neklíčila (neprotrhla osemení), ale embrya po ošetření roztokem prostředku SAVO výrazně zvětšila svůj objem. Na rozdíl od semen kruštíku široolistého, u kterých ke zvětšení embryí nedošlo. Lze předpokládat, že u semen kruštíku tmavočerveného došlo po ošetření roztokem SAVO k dostatečnému narušení osemení, avšak nebyl splněn nějaký další faktor potřebný pro klíčení. Příčinou mohlo být nevhodné kultivační médium, podmínky při kultivaci, další typ dormance, nebo požadavek na přítomnosti houby. Pro účely této práce jsem tedy od dalšího testování druhu kruštík tmavočervený upustila a věnovala se pouze kruštíku široolistému a prstnatci májovému. Pokud bych scházející faktory dokázala v budoucnu identifikovat, mohla bych získat výrazně vyšší klíčivost u semen kruštíku tmavočerveného, než jaké bylo dosud dosaženo.

Další látkou, která byla použita pro indukci klíčení některých obtížně klíčících druhů orchidejí, je kyselina sírová, která se používá před roztokem chlornanu (Malmgren 1993; Ponert *et al.*, 2013). V této práci jsem testovala různé délky ošetření 2% H_2SO_4 a semena vyklíčila pouze po nejkratším ošetření (10 min). Delší doba inkubace pravděpodobně poškodila semena natolik, že nebyla životaschopná. I po nejkratším ošetření H_2SO_4 byla klíčivost výrazně nižší než po klasickém ošetření EtOH a roztokem chlorového vápna. Kyselina sírová má tedy v provedeném experimentálním uspořádání jednoznačně negativní efekt na klíčivost kruštíku široolistého.

Není známo, jak dochází k penetraci osemení v přirozených podmínkách. Často se uvažuje o roli mykorrhizních hub, které zřejmě mají enzymatický aparát schopný rozrušovat buněčné stěny rostlin (Hatakka, 1994; Chi *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2021). Možnou úlohu hub podporuje také zjištění, že ošetření semen vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) lakázou zvýšilo klíčivost (Pierce *et al.*, 2018). Já jsem v této práci zkusila ošetřit semena tekutým médiem, ve kterém byla dříve kultivována kultura symbiotických hub, a to ze dvou důvodů: 1) lze předpokládat, že enzymy budou působit extracelulárně (a mohly by být sekretované), 2) na základě školitelova pozorování, kdy semena ošetřená tekutým médiem, ve kterém byly dříve kultivovány houby, přes noc klesla ke dnu nádoby, narozdíl od semen ošetřených samotným médiem. Ošetření houbovými exudáty bylo cílené hlavně na semena kruštíku širolistého, jehož semena po ošetření chlorovým vápnem vykazují malou klíčivost. Před ošetřením houbovými exudáty jsem provedla krátké ošetření semen EtOH a roztokem chlorového vápna, abych zajistila dostatečnou povrchovou desinfekci materiálu. Zároveň jsem z předchozích výsledků věděla, že zvolené ošetření EtOH a 10 min chlorovým vápnem není dostatečně dlouhé, aby došlo k porušení dormance. Zatím jsou známy pouze průběžné výsledky, ale již teď je zřejmé, že hodnoty klíčivosti jsou u prstnatce májového výrazně nižší než po ošetření chlorovým vápnem. Příčinou je pravděpodobně skutečnost, že semena již byla stará, a tedy velká část již nebyla životaschopná. Omezená životaschopnost semen byla již v literatuře několikrát popsána (Rasmussen, 1995 a citace uvnitř). Velice nízké dosažené klíčivosti semen jsou také pravděpodobně důvodem, proč mezi rozdíly v klíčivosti mezi variantami nebyly statisticky průkazné. Přesto jsem po ošetření houbovými exudáty pozorovala některé zajímavé rozdíly, které krátce představím. Nejnápadnější rozdíl byly mezi dvěma použitými kultivačními médii. Semena kruštíku širolistého i prstnatce májového klíčila po máčení v médiu MMN, které neobsahovalo houbové exudáty, takřka žádná semena však neklíčila po máčení v tekutém Czapkově médiu (přehledy grafů 7, 8). Z toho vyvozují, že vliv na semena má i samotné tekuté médium. Obě zmíněná média se od sebe výrazně liší (složení v tabulkách 2 a 3). Jedním z mnoha rozdílů je přítomnost vápníku (respektive Ca^{2+}) v médiu MMN. To by mohlo podporovat předpoklad jiných autorů, kteří na základě studia osemení střevíčníku pantoflíčku (*Cypripedium calceolus*) předpokládají, že akumulace CaCO_3 v osemení může podporovat klíčení semen (Barsberg *et al.*, 2013). Vliv samotných hub (respektive jejich exudátů) je oproti tomu mizivý. U semen obou zkoumaných druhů se nepatrně snížila klíčivost po ošetření semen tekutým médiem MMN s houbovými exudáty v porovnání s klíčivostí po ošetření pouze MMN (přehled grafů 7, graf F). Po ošetření Czapkovým médiem s houbovými exudáty byly rozdíly u obou druhů malé. Výrazný stimulační efekt hub tedy nebyl pozorován. Je možné, že houby žádné enzymy do média neuvolňují nebo že se enzymy degradují. Není příliš pravděpodobné, že by žádná ze

zvolených hub nedisponovala enzymy schopnými působit na semena (např. Hatakka, 1994; Chi *et al.*, 2007; Pierce *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2021). Nejpravděpodobnější vysvětlení tedy je, že většina semen prstnatce májového již nebyla životaschopná. Mohlo tomu tak být i v případě semen kruštíku širolistého, ale příliš se k této myšlence nepřikláním. Pravděpodobnější vysvětlení je, že u něj nebyla porušena fyzikální dormance semen, nebo semena vyklíčí později v průběhu kultivace.

7.2. Struktura osemení

Mým cílem nebylo jen získat data o klíčivosti semen po různých ošetřeních, ale chtěla jsem také zjistit, k jakým změnám v semenech v důsledku různých ošetření dochází. Mnoho času jsem strávila s optimalizací metodiky pro testování propustnosti osemení a histochemické analýzy osemení. To je hlavním důvodem, proč jsou kapitoly věnující se propustnosti semen a histochemické detekci provedené pouze na malé části testovaných ošetření. Převážně jsem se zaměřila na ošetření roztokem chlorového vápna, neboť se jedná o rychlou, snadno dostupnou a ekonomicky nenáročnou metodu, která se z průběžných dat klíčivosti semen ukazovala jako nejefektivnější. Kromě široké škály histochemických barviv jsem testovala i různé mikroskopické techniky, ve snaze získat detailnější snímky osemení. V současné chvíli snad již můžu říci, že jsem vyselektovala vhodné vizualizační techniky a v budoucnu je mám v plánu aplikovat na všechna ošetření, jejichž efekt jsem testovala výsevem semen v aseptických podmínkách.

Při detekci ligninu jsem zjistila, že analýza výsledků barvení floroglucinolem je značně komplikovaná, neboť vznikající červené zbarvení v případě přítomnosti ligninu je špatně odlišitelné od přirozeného hnědého zbarvení osemení. Další komplikací při analýze výsledků je odbarvování osemení s narůstající dobou ošetření semen v roztoku chlorového vápna, neboť se pak obtížně porovnává míra histochemického zbarvení u semen ošetřených různou dobu. Z tohoto důvodu také nebyla kvantifikovatelná intenzita zbarvení. Výrazně snadněji pozorovatelné je barvení fluorescenčním berberinem v kombinaci s dobarvením genciánovou violetí. Dobarvení umožňuje potlačit méně specifické barvení nemodifikovaných buněčných stěn a specificky vizualizovat buněčné stěny, které jsou lignifikované. Barvení se shoduje s již dřívějšími pozorováními, že ve vnějším osemení se vyskytuje lignin (Chen *et al.*, 2012; Barsberg *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2014; Yang & Lee, 2014). V budoucnu by bylo zajímavé zjistit, jaká forma ligninu se u prstnatce májového a kruštíku širolistého vyskytuje. U některých jiných druhů orchidejí byl totiž kromě obvyklého typu ligninu označovaného „G/S-lignin“ identifikován také méně obvyklý typ ligninu označovaný „C lignin“ (Chen *et al.*, 2012; Barsberg *et al.*, 2018). Je zajímavé, že to bylo pozorováno u zástupců třech evolučně starobylejších podčeledí orchidejí (rody *Cypripedium*,

Neuwiedia a *Vanilla*), zatímco u zástupce evolučně odvozenější podčeledi *Epidendroideae* (rod *Phalaenopsis*) byl pozorován pouze obvyklý „G/S-lignin“ (Chen *et al.*, 2012; Barsberg *et al.*, 2018). Poslední jmenovaný zástupce se však od ostatních zkoumaných druhů výrazně odlišuje také ekologickými nároky a řadou dalších parametrů, takže nelze říct, zda se jedná o vlastnost specifickou pro určité podčeledi orchidejí. Studium dalších druhů by tedy bylo velice zajímavé. V této práci jsem však detekovala pouze celkový lignin bez ohledu na jeho typ. Pozorovala jsem, že v reakci na ošetření chlorovým vápnem dochází k úbytku detekovatelného ligninu. U prstnatce májového po delším ošetření roztokem chlorového vápna nebyl detekovatelný žádný lignin (obrázky 14, 15), v případě kruštíku širolistého došlo k úbytku ligninu v jednotlivých oblastech, stále však bylo možno ve zbylých oblastech celého vnějšího osemení lignin detekovat. Tato zjištění se shodují s dříve provedenými pozorováními, kdy v důsledku ošetření $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ docházelo k úbytku ligninu ve vnějším osemení střevíčníku pantoflíčku (*Cypripedium calceolus*) (Barsberg *et al.*, 2013). Shodně jako autoři této práce se i já domnívám, že právě úbytek ligninu by mohl být jedním z procesů, díky kterému dochází ke zvýšení propustnosti osemení a tím pádem k vyklíčení semen. Výsledky dlouhodobých kultivací naznačují, že mezi délkou ošetření chlorovým vápnem, množstvím ligninu ve vnějším osemení a mírou klíčivosti je pozitivní korelace. Vliv chemické skarifikace byl výraznější než vliv dlouhodobého máčení semen v destilované vodě, kterým jsem se snažila simulovat přirozený proces, ke kterému by mohlo docházet v přírodě. Po 30 dnech máčení semen kruštíku širolistého v destilované vodě byl lignin barvením berberinem a genciánovou violetí detekován v podobném množství, jako po 14 dnech máčení. K zajímavým změnám v depozici ligninu ve vnějším osemení došlo v průběhu máčení semen prstnatce májového. Po 30 dnech máčení byl pozorován výrazný úbytek ligninu na obou koncích vnějšího osemení, zatímco ve středové části, pod kterou se nachází embryo, se množství ligninu nezměnilo (obrázky 16, 17 *Dactylorhiza majalis* 30 dní). To by mohlo znamenat, že ke vstupu vody do semene dochází směrovaně z konců semene. U obou druhů jsem však také pozorovala, že v průběhu 30 dní máčení v destilované vodě došlo na semenech k nárůstu houbového mycelia (obrázek 16), které mohlo narůst například ze spor na povrchu semen, neboť semena nebyla povrchově sterilizována. Pozorovaný efekt dlouhodobého máčení tedy nemusí být pouze výsledkem přímého působení vody na semena, ale také výsledkem působení hub. Je známo, že mnohé houby jsou schopné produkovat enzymy štěpící lignin (např. Hatakka, 1994; Chi *et al.*, 2007), a tak by mohla být houbou ovlivněna i propustnost semen (Yoder *et al.*, 2000). Zajímavé také je, že u jiného druhu orchideje byla popsána zvýšená klíčivost semen po ošetření lakázou (Pierce *et al.*, 2018), což opět naznačuje význam degradace ligninu pro klíčení semen.

Další složkou, která již v minulosti byla opakovaně ve vnějším osemení detekována, je celulóza (Carlson, 1940; Barsberg *et al.*, 2013). Já jsem se na tuto složku při histochemické analýze osemení nezaměřila, předpokládám však, že pokud by detekce celulózy ve vnějším osemení byla provedena, pak bych její přítomnost potvrdila u obou sledovaných druhů. Těžko si lze představit, aby buněčné stěny osemení celulózu neobsahovaly. Je však otevřená otázka, jak se může množství či struktura celulózy měnit při ošetření semen roztokem chlorového vápna. U několika druhů orchidejí mírného pásma bylo pozorováno zvýšené klíčení semen po jejich ošetření kombinací celulózy a maceroenzymu (Lindén, 1992). To může naznačovat, že nejen degradace ligninu, ale také degradace samotné celulózy může přispívat k rozrušení osemení. V budoucnu by tedy mohlo být zajímavé analyzovat také množství celulózy.

V minulosti byla u některých druhů detekována také přítomnost kutinu ve vnějším osemení (např. Rasmussen, 1995; Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005, 2007) a sice pomocí nilské červeně. Já jsem nilskou červeně nepoužívala, lipidický materiál jsem detekovala pomocí sudanové červeně 7B a Fluorol Yellow 088. Ani jedno z těchto barviv však přítomnost kutinu ve vnějším osemení nenaznačovalo. Domnívám se tedy, že u prstnatce májového ani kruštíku širolistého kutin ve vnějším osemení spíše deponován není. Taktéž ve vnějším osemení střešníku pantoflíčku (*Cypripedium calceolus*) kutin nebyl detekován (Barsberg *et al.*, 2013). Sami autoři však navrhuji, že jimi zvolená detekční metoda ATR-FTIR mohla přinést falešně negativní výsledek. I v našem případě existuje možnost, že zvolené histochemické metody nebyly dostatečně citlivé, protože snímky z TEM u prstnatce májového naznačují přítomnost vrstvy na povrchu vnějšího osemení, která vzhledem odpovídá kutikule (obrázek 26, *Dactylorhiza majalis* detaily 1 a 2). Na snímcích kruštíku širolistého obdobná vrstva patrná není. Plánuji se proto v dalších pozorováních více zaměřit na vnější osemení, provést u něj detekci kutinu pomocí dalších histochemických barvení – např. auraminem O nebo nilskou červení. Případně se pokusit stanovit přítomnost lipidického materiálu analytickými metodami, nebo detekovat změny, ke kterým v osemení dojde po aplikaci kutinázy či lakázy.

V rámci histochemické analýzy vnitřního osemení jsem nedetekovala žádný lignin, a to ani jako výsledek barvení floroglucinolem ani fluorescenčním berberinem s genciánovou violetí. To se neshoduje s některými pozorováními v literatuře, kdy byl u dvou druhů (okrotice *Cephalanthera falcata* a *Paphiopedilum delenatii*) lignin detekován (Lee *et al.*, 2006; Yamazaki & Miyoshi, 2006). U těchto druhů byly detekovatelné dvě vrstvy vnitřního osemení, přičemž se lignin vyskytoval ve vnější vrstvě vnitřního osemení. Existují však i práce, např. na stromobytcí vznešeném (*Dendrobium nobile*), kdy lignin ve vnitřním osemení detekován nebyl (Vasudevan & van Staden, 2010). Je tedy možné, že se lignin ve vnitřním osemení nevyskytuje ani u kruštíku širolistého ani

u prstnatce májového, nebo se u těchto druhů nevyskytuje v míře detekovatelné zvolenými histochemickými metodami. Je ale zvláštní, že rod okrotice je poměrně blízký příbuzný kruštíku a oba rody mají také podobné ekologické nároky, takže by se dalo předpokládat, že stavba jejich semen nebude výrazně odlišná.

Výsledek barvení sudanovou červení 7B i Fluorol Yellow 088 pro detekci lipidických složek vnitřního osemení (kutin, suberin) byl nejednoznačný. Na mnoha místech výsledek barvení naznačoval, že mohla být obarvena tenká linka na povrchu embrya, která by značila přítomnost lipidických látek (kutin, suberin). Tyto částečně pozitivní výsledky byly častější u kruštíku širolistého, což pravděpodobně souvisí se skutečností, že kruštík širolistý má mohutnější osemení než prstnatec májový. Oba druhy mají také na povrchu embrya vrstvu autofluorescenčního materiálu, což by mohlo odpovídat přítomnosti fenolických látek. Ty jsou komponenty ligninu, ale tvoří i součást kutinu a suberinu (např. Philippe *et al.*, 2020). Přítomnost kutinu ve vnitřním osemení již byla opakovaně pozorována. Například u okrotice (*Cephalanthera falcata*) (Yamazaki & Miyoshi, 2006) a střevíčníku *Paphiopedilum delenatii* (Lee *et al.*, 2006) bylo popsáno, že vnitřní osemení je tvořeno dvěma vrstvami a vnitřní vrstva vnitřního osemení byla u obou druhů identifikována pomocí histochemických barviv jako kutinizovaná (Lee *et al.*, 2006; Yamazaki & Miyoshi, 2006). U vanilky (*Vanilla planifolia*) byly pomocí nilské červeně identifikovány dvě vrstvy, které vykazovaly fluorescenci po tomto barvení (Yeh *et al.*, 2021). Linky byly pozorovány v nejvnitřnější vrstvě vnitřního osemení a v buněčných stěnách tvořících povrch globulárního embrya (Yeh *et al.*, 2021). Vrstva odpovídající kutikule byla přímo na povrchu embrya pozorována také u některých dalších druhů (Yeung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2005, 2006). Je však možné, že v buněčných stěnách se nevyskytoval kutin, ale lignin. Oba polymery mohou obsahovat fenolickou skupinu (Philippe *et al.*, 2020), což u rostlinných pletiv může vést k záměně ligninu a kutinu či suberinu po detekci nilskou červení, neboť detekuje přítomnost právě fenolické skupiny (Brundrett *et al.*, 1991). Já jsem obou druhů pozorovala s pomocí transmisního elektronového mikroskopu přítomnost dvou vrstev, které vzhledem odpovídají kutikule: na povrchu embrya a na vnějším povrchu vnitřního semení. Je tedy zvláštní, že kutin nebyl spolehlivě histochemicky detekován sudanovou červení 7B ani Fluorol Yellow 088. Nelze vyloučit, že tyto metody nebyly dostatečně citlivé pro identifikaci tenkých vrstev kutikuly. Pro jednoznačnou identifikaci těchto vrstev bude mimo jiné potřeba také dalšího pozorování na TEM, neboť ultratenké řezy semeny byly často potrhány a embrya na řezech vylomená. Důvodem bylo obtížné pronikání montovacího média do embrya především u neošetřených semen a špatné prosycení řezů. V budoucnu se plánuji na problematiku zalití semen do pryskyřice a následnou tvorbu ultratenkých řezů zaměřit,

zvolit pozvolnější přístup a delší časy jednotlivých kroků při zalévání semen do pryskyřice, abych získala řezy, kde budou embrya zachována a bylo možné lépe pozorovat vnitřní osemení.

Výrazným rozdílem mezi druhy byla celková mohutnost vnitřního osemení, která byla větší u kruštíku širolistého. Mohutnější vnitřní osemení by mohlo mít souvislost s fyzikální dormancí semen, v jejímž důsledku semena špatně klíčí v umělých podmínkách. S obdobnými hypotézami jsem se setkala i v literatuře (Veyret, 1969; Yamazaki & Miyoshi, 2006). Změny, k jakým došlo ve vnitřním osemení v důsledku máčení v destilované vodě, nebyly zkoumány. Bylo by zajímavé se na to v budoucnu podívat. Domnívám se však, že vzhledem k malým změnám ve vnějším osemení, budou změny ve vnitřním osemení ještě hůře detekovatelné, ne-li žádné.

7.3. Propustnost semen a fyzikální složka dormance

V této části budu diskutovat výsledky z různých částí práce, a proto chci nejprve připomenout, že všechny metody testující změny v osemení, ke kterým dochází v důsledku ošetření semen, jsem aplikovala na semena ošetřená roztokem chlorového vápna po různě dlouhou dobu a suchá neošetřená semena. To ale neplatí pro *in vitro* výsevy, protože tam by v případě použití suchých neošetřených semen došlo k silné kontaminaci. Proto jsem v tomto případě na místo suchých neošetřených semen pracovala se semeny velmi krátce (4 min) ošetřenými roztokem chlorového vápna. Výsledky z dlouhodobé kultivace semen (sledováno 10 měsíců u kruštíku širolistého, respektive 6 měsíců v případě prstnatce májového) v *in vitro* podmínkách u obou druhů ukázaly, že s narůstající dobou ošetření a také s narůstající dobou kultivace na médiu *in vitro* výrazně narůstá klíčivost semen. Jak již bylo diskutováno v kapitole 7.1 Výsev, obecně se předpokládá, že by taková reakce semen mohla mimo jiné souviset s předpokládanou zvýšenou propustností osemení po ošetření (např. Rasmussen, 1995, Pierce *et al.*, 2018). Tento předpoklad jsem se pokusila testovat analýzou propustnosti semen po různých ošetřeních. Díky testování propustnosti osemení jsem zjistila, že je u kruštíku širolistého i prstnatce májového pro zpropustnění vnějšího osemení (testováno roztokem PTS) dostačující i krátké (4 min) ošetření roztokem chlorového vápna. U kruštíku širolistého nebyla všechna semena po tomto ošetření propustná ihned, ale po 30 min inkubace v roztoku PTS došlo k proniknutí barvicího roztoku pod vnější osemení u 100 % sledovaných semen. To však neznamená, že vnější osemení netvoří žádnou bariéru pro vodu. Pro zajištění vstupu vody pod vnější osemení u suchých neošetřených semen bylo nutné semena odvzdušnit pod vakuovou vývěvou, aby se voda společně s barvicím roztokem pod vnější osemení dostala. Klíčivosti semen však byly výrazně nižší, než podíl semen s propustným vnějším osemením, takže se v regulaci klíčení musí uplatňovat nějaký další mechanismus. Samotná propustnost vnějšího osemení také nemůže vysvětlit výrazně nižší

klíčivost semen kruštíku širolistého oproti prstnatci májovému po dlouhém ošetření roztokem chlorového vápna, při kterém již bylo vnější osemení propustné u všech semen.

Pozorování, že i krátké ošetření chlornanem je dostačující pro zpropustnění vnějšího osemení neplatí pro vnitřní osemení (testováno roztokem berberin hemisulfátu). I u vnitřního osemení byl sledován celkový trend ukazující, že s narůstající dobou ošetření semen roztokem chlorového vápna dochází k nárůstu množství semen, která mají propustné vnitřní osemení. Podíl propustných semen však narůstal pomaleji a dosahoval nižších hodnot, než v případě propustnosti vnějšího osemení. U kruštíku širolistého i po hodině v roztoku chlorového vápna měla skoro polovina semen nepropustné vnitřní osemení. U prstnatce májového nedošlo ke zpropustnění 15 % vnitřních osemení. Tyto rozdíly již lépe odpovídají rozdílům v klíčivostech semen *in vitro* a velmi pravděpodobně mohou mít souvislost s tím, jak mohutné mají jednotlivé druhy vnitřní osemení. Myšlenka, že právě rozdíly v mohutnosti vnitřního osemení by mohly být tím, co činní mezidruhové rozdíly v ochotě semen v umělých podmínkách vyklíčit, se v literatuře objevila již v roce 1969 na základě porovnání různých druhů orchidejí (Veyret, 1969).

Zjištění o rozdílné propustnosti vnitřního a vnějšího osemení jsou pravděpodobně zajímavou novinkou. Testování propustnosti osemení pro vodu totiž není v literatuře příliš časté. Patrně první, kdo tuto problematiku experimentálně zkoumal, byl Joachim Prutsch (2000) u tropického druhu *Sobralia dichotoma*. Semena tohoto druhu sice mají neobvykle protáhlé vnější osemení a velice specifickou stavbu, nicméně i tak jsou zajímavá pro porovnání se zde zkoumanými druhy. Okolí pupku, ale i další povrchové části semene tohoto druhu jsou údajně pokryté vosky, což brání vstupu kapalné vody i vodní páry do embrya. Ke vstupu vody do semen druhu *Sobralia dichotoma* nedochází ani po několika hodinách po namočení semen do vody (Prutsch *et al.*, 2000). V této práci jsem pozorovala, že ani u neošetřených semen prstnatce májového a kruštíku širolistého nedochází k průniku vody pod vnější osemení. Pokud k semenům *Sobralia dichotoma* byl přidán detergent, pak voda do semene vstoupila do několika sekund (Prutsch *et al.*, 2000). Já jsem suchá neošetřená semena vystavila krátkému působení vody s detergentem Tween20 a posléze u nich testovala propustnost vnějšího osemení pomocí PTS (nepublikovaná data). Došlo k přímému kontaktu barvicího roztoku s vnějším povrchem vnějšího osemení, ale do prostoru pod vnějším osemením roztok stále nepronikl. Propustnost semen byla zkoumána také u vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) a sice v závislosti na ošetření semen chlornanem (Pierce *et al.*, 2018). V této práci však nebyla odlišována ani studována osemení a propustnost byla hodnocena u celých semen pomocí sodné soli fluoresceinu (*fluorescein sodium salt*) (Pierce *et al.*, 2018), takže tyto výsledky nelze diskutovat ve vztahu k úloze jednotlivých osemení.

Lze tedy shrnout, že obě osemení mohou představovat odlišné bariéry pro vstup vody do semen orchidejí. I když je první překážka překonána a voda se dostane pod vnější osemení, tak ještě nemusí dojít ke klíčení, neboť vnitřní osemení může být ještě výraznější bariérou pro vodu, která je pravděpodobně schopna zamezovat vstupu vody do embrya po dlouhou dobu. Jak dlouho nejspíš závisí na mohutnosti vnitřního osemení, ale u semen s mohutným vnitřním osemením se v přirozených podmínkách může jednat o velmi dlouhou dobu. Nepropustnost osemení pro vodu je zpravidla definována jako fyzikální dormance či fyzikální složka kombinované dormance (Baskin & Baskin, 1998, 2004). Domnívám se tedy, že u některých prachových semen můžeme hovořit o fyzikální dormanci či alespoň o fyzikální složce dormance.

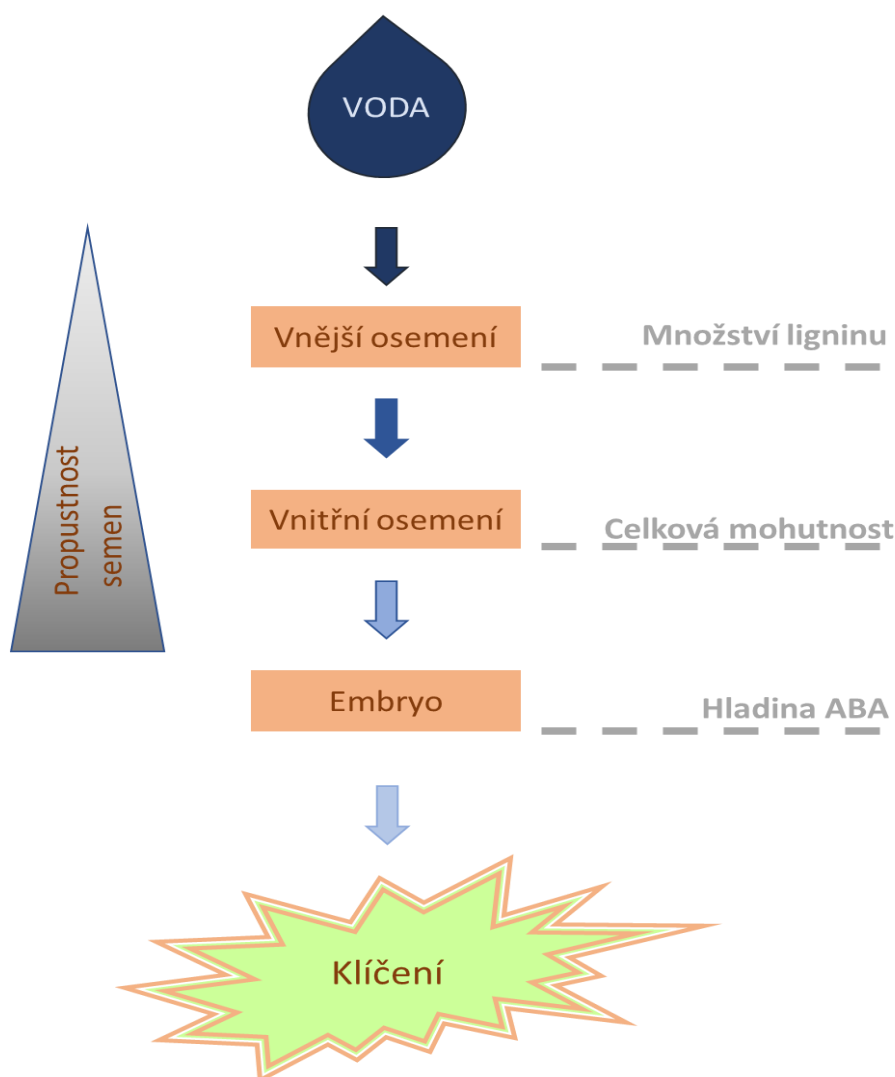
Zůstává otázkou, jaké změny v osemení mohou stát za zpropustněním semen před klíčením. Při umělém ošetření semen roztoky chlornanů je pravděpodobné, že dojde k degradaci řady složek buněčných stěn. U vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) a střevíčníku pantoflíčku (*Cypripedium calceolus*) bylo zdokumentováno, že při ošetření semen roztokem chlornanu dochází k degradaci ligninu (Barsberg *et al.*, 2013; Pierce *et al.*, 2018). Obdobný úbytek detekovatelného ligninu s narůstající dobou ošetření jsem pozorovala pomocí histochemické analýzy ve vnějším osemení zkoumaných druhů. To může znamenat, že množství ligninu v osemení, propustnost semen a klíčivost semen spolu u orchidejí úzce souvisí. Podobný předpoklad je obecně přijímán v případě semen jiných rostlin (Bewley & Black, 1994). V případě orchidejí je úloha ligninu dále podporována několika různými zjištěními. Jednak nezralá semena mnohdy v *in vitro* podmínkách klíčí ochotněji než zralá semena. V průběhu dozrávání semen dochází k ukládání ligninu do osemení, což můžeme pozorovat jako tmavnutí semen (Yeh *et al.*, 2021) a to je také období, kdy dochází k poklesu klíčivosti semen (např. Yamazaki & Miyoshi, 2006; Lee *et al.*, 2007, 2015). Jednak bylo klíčení semen vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) podpořeno ošetřením lakázou (Pierce *et al.*, 2018). Jednak se v literatuře občas doporučuje desinfekce tak dlouhá, dokud nedojde k odbarvení semen (např. Vejsadová, 2006), což velmi pravděpodobně odráží degradaci ligninu. Samotná degradace ligninu však nevysvětluje vše. Jak již bylo diskutováno výše v této kapitole, tak významnou bariérou v přístupu vody k embryu může být vnitřní osemení a v tom zřejmě nemusí být lignin přítomen. Ve vnitřním osemení nebo na povrchu embrya ale bývá vytvořená vrstva kutikuly a ta by mohla představovat bariéru, která by mohla být odpovědná za obtížné klíčení některých druhů. Moje pozorování z TEM ukazují, že ošetření semen roztokem chlorového vápna má na ultrastrukturu vrstvy odpovídající kutikule velice malý vliv. V další práci by tedy bylo zajímavé se na tuto vrstvu a její možné narušování zaměřit.

Další otázkou je, jaké faktory mohou umožnit klíčení semen orchidejí s nepropustnými osemeními v přirozených podmínkách. Teoreticky může docházet k několika jevům. Jednou

z nejčastěji diskutovaných možností je, že symbiotická houba svými enzymy degraduje lignin (Hatakka, 1994; Chi *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2021) v osemení prachového semene, čímž dojde ke zpropustnění osemení (Pierce *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2021). Na příkladu gastrodie vyvýšené (*Gastrodia elata*) a její symbiotické houby rodu *Mycena* bylo pozorováno, že v symbiotické kultuře je oproti axenické kultuře houby vyšší míra exprese genů pro syntézu peroxidáz třídy II a lakázy, což jsou lignolytické enzymy (Ren *et al.*, 2021). To s největší pravděpodobností umožní hyfě proniknout skrz osemení (Ren *et al.*, 2021) a při tom může dojít ke zvýšení jeho propustnosti. Jedná se však o ojedinělé pozorování, a tak je otázkou, zda a jak významně se symbiotické houby podílí na iniciaci klíčení jiných druhů orchidejí. Ve svých experimentech jsem nepozorovala stimulaci klíčení po ošetření exudáty symbiotických hub, což může naznačovat, že je nutný přímý kontakt houby se semeny. Semena však v tomto experimentu dosahovala velice nízkých klíčivostí, a tak je tyto výsledky nutné považovat za předběžné.

Další možnost, ke které může v přirozených podmínkách docházet, byla popsána u *Sobralia dichotoma* (Prutsch *et al.*, 2000). Jedná se o tropickou terestrickou orchidej, jejíž semena jsou nezvykle dlouhá, protáhlá. U těchto semen byly popsány speciální buňky, které v mokru nabobtnají a díky tomu dojde k otevření jednoho konce vnějšího osemení, který je v suchu zatočený a uzavřený (Prutsch *et al.*, 2000). Tento fyzikální mechanismus otvírání však nemůže být všeobecně platný, protože ostatní terestrické orchideje vytváří zpravidla krátká semena bez zmíněných speciálních buněk. Já jsem u kruštíku širolistého ani prstnatce májového nepozorovala více typů buněk, a navíc je vnější osemení na první pohled na jednom konci viditelně otevřené i u suchých semen. Mou domněnku o nepřítomnosti buněk, které v mokru otvírají vnější osemení, podporují pozorování máčených semen v destilované vodě, u nichž jsem po 14 a 30 dnech máčení testovala propustnost vnějšího osemení pro vodu. Žádné ze semen kruštíku širolistého nebylo ani po 30 dnech máčení v destilované vodě propustné pro vodu. A to i přes to, že jsem u semen pozorovala narostlé mycelium (obrázek 16), které pravděpodobně vyrostlo ze spor na povrchu semen. Semena prstnatce májového nebyla propustná pro vodu po 14 dnech máčení v destilované vodě. Po 30 dnech několik semen mělo vnější osemení propustné pro vodu (tabulka 18 a obrázek 12). To mohlo být způsobeno myceliem (obrázek 16), které u semen narostlo a u těchto jednotlivých semen mohlo výrazně narušit vnější osemení, nebo se jednalo o semena, jejichž vnější osemení bylo poškozeno při manipulaci se semeny. Detekce ligninu berberinem a genciánovou violetí ukázala výrazný úbytek detekovatelného ligninu na obou stranách vnějšího osemení (obrázek 17 *Dactylorhiza majalis* 30 dní). Další možností je, že je nutná delší doba máčení než 30 dní, aby došlo ke zpropustnění vnějšího osemení. Hypoteticky lze spekulovat také o endozoochorii drobných semen orchidejí drobnými půdními živočichy, což by mohlo vést

k narušení osemení. Endozoochorie byla pozorována u řady orchidejí (např. rod vanilka *Vanilla*, *Apostasia nipponica*, *Yoania japonica*) (Suetsugu, 2018; Suetsugu, 2020; Pansarin, 2021; Pansarin & Suetsugu, 2022), nicméně semena endozoochorně šířených druhů se odlišují strukturou vnějšího osemení od zde zkoumaných druhů a většiny dalších orchidejí. Je tedy pravděpodobné, že semena kruštíku i prstnatce se šíří anemochorně (Arditti & Ghani, 2000). Další hypotetická možnost spočívá v působení chemických látek přítomných v půdním prostředí. V případě semen střevíčníku pantoflíčku (*Cypripedium calceolus*) bylo pozorováno, že po několika letech v půdě dochází k inkorporaci CaCO_3 v osemení, což by mohlo mít souvislost se zvýšením propustnosti osemení (Barsberg *et al.*, 2013). Zde je zajímavé zmínit, že jsem v této práci pozorovala vyšší klíčivost semen máčených před výsevem v kultivačním médiu MMN, které obsahuje vápenaté ionty, oproti semenům máčeným v Czapkovu médiu, které neobsahuje vápenaté ionty. Rozdíly ale byly neprůkazné a jiná pozorování v tomto směru nebyla provedena.



Obrázek 30 Zjednodušené schéma zobrazující komplexitu zkoumaných vztahů; šedivě jsou uvedeny faktory ovlivňující části semen uvedené v příslušném rámečku; hladina ABA nesouvisí s fyzikální dormancí a nebyla tedy zkoumána.

Ve své další práci plánuji založit symbiotickou kultivaci a prozkoumat anatomické změny, ke kterým dochází v místě vstupu hyfy do semene, případně do samotného embrya. Dále plánuji semena ošetřit izolovanými enzymy, které by mohly degradovat různé složky buněčných stěn a u kterých lze předpokládat, že jsou houbami přirozeně produkovány. Dalším experimentem, který bych ráda založila, je kultivace semen, která budou povrchově sterilizována plynným chlorem a různě dlouhou dobu před výsevem máčena ve sterilní vodě. Pokud by byla desinfekce semen za sucha úspěšná, pak by mi tato kultivace umožnila se co nejvíce přiblížit přirozeným podmínkám.

8. ZÁVĚR

Prostupování vody do semen orchidejí je poměrně komplexní proces. Suchá semena orchidejí mají hydrofobní povrch, takže do nich nemůže vstupovat voda. Pokud semena ošetříme obvyklým postupem pomocí EtOH a roztoku chlorového vápna, pak s prodlužující se dobou ošetření dochází k navyšování propustnosti semen pro vodu. Nejprve je porušena nepropustnost vnějšího osemení a později je překonáno i osemení vnitřní. Celý tento proces končí vstupem vody do embrya, které začne bobtnat a postupem času vyklíčí. Postupný nárůst propustnosti semen pro vodu není u všech druhů stejně rychlý. Semena kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) jsou výrazně resistantnější než semena prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) a je u nich potřeba delší doba ošetření, aby se osemení stala propustnými pro vodu. Odolnost vnějšího osemení se u těchto druhů liší jen málo, i když v případě kruštíku je potřeba delší doba, aby voda vstoupila pod vnější osemení. Výrazně větší bariérou na cestě k embryu je vnitřní osemení. U semen kruštíku širolistého je vnitřní osemení výrazně mohutnější a k chemické skarifikaci odolnější než u prstnatce májového.

Osemení nejsou homogenní strukturou a lze u nich odlišit různé vrstvy, které mohou pravděpodobně různě ovlivňovat propustnost pro vodu. Při ošetření chlorovým vápnem dochází k rozvolnění některých vrstev osemení, pravděpodobně především těch, ve kterých je nejvíce zastoupena celulóza. Další důležitou změnou je úbytek množství detekovatelného ligninu deponovaného ve vnějším osemení. Lipidické složky osemení (patrně kutin) pravděpodobně nejsou ošetřením roztokem chlorového vápna příliš ovlivněny.

V důsledku výrazného zvýšení propustnosti semen pro vodu, úbytku ligninu v osemení a rozpadu některých vrstev v osemení dochází ke vstupu vody do embrya a klíčení semen. U obou druhů bylo prokázáno, že s narůstající dobou ošetření roztokem chlorového vápna dochází k nárůstu klíčivosti. U kruštíku širolistého bylo dosaženo klíčivosti až 6 % a u prstnatce májového 70 % po půl roce kultivace. Výrazný rozdíl v klíčivosti semen těchto druhů může souviset s odlišnou odolností či propustností jejich osemení. Nejvýraznějším rozdílem je mohutnost vnitřního osemení. Je tedy pravděpodobné, že právě vnitřní osemení je odpovědné za nízkou klíčivost semen kruštíku.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- Arditti J. 1967a.** Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review* **33**: 1–97.
- Arditti J. 1967b.** Factors affecting the germination of orchid seeds. *The botanical Review* **33**: 1–97.
- Arditti J, Clements MA, Fast G, Hadley G, Nishimura G, Ernst R. 1982.** Orchid seed germination and seedling culture. In: *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Ithaca, NY, USA: Cornell University Press, 243±370.
- Arditti J, Ghani AKA. 2000.** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* **145**: 367–421.
- Ballard W. 1967.** Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds. *American Orchid Society Bulletin* **56**: 935–946.
- Barsberg ST, Lee YI, Rasmussen HN. 2018.** Development of C-lignin with G/S-lignin and lipids in orchid seed coats - An unexpected diversity exposed by ATR-FT-IR spectroscopy. *Seed Science Research* **28**: 41–51.
- Barsberg S, Rasmussen HN, Kodah 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.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998.** Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. *Journal of Chemical Information and Modeling* **53**: 1689–1699.
- Baskin JM, Baskin CC. 2004.** A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* **14**: 1–16.
- Baskin JM, Baskin CC. 2021.** The great diversity in kinds of seed dormancy: A revision of the Nikolaeva-Baskin classification system for primary seed dormancy. *Seed Science Research* **31**: 249–277.
- Bateman RM, Farrington OS. 1989.** Morphometric comparison of populations of *Orchis simia* Lam. (Orchidaceae) from Oxfordshire and Kent. *Botanical Journal of the Linnean Society* **100**: 205–218.
- Benzing DH, Clements MA. 1991.** Dispersal of the orchid *Dendrobium insigne* by the ant *Iridomyrmex cordatus* in Papua New Guinea. *Biotropica* **23**: 604–607.
- Bewley JD, Black M. 1994.** *Seeds: physiology of development and germination*. New York: Plenum Press.
- Botha CEJ, Aoki N, Scofield GN, Liu L, Furbank RT, White RG. 2008.** A xylem sap retrieval pathway in rice leaf blades: Evidence of a role for endocytosis? *Journal of Experimental Botany* **59**: 2945–2954.
- Brundrett MC, Enstone DE, Peterson CA. 1988.** A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma* **146**: 133–142.
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7b or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111–116.
- *Burgeff H. 1936.** *Samenkeimung der Orchideen*. Jena: Gustav Fischer. - citováno z **Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycothophic plant*. Cambridge University Press.
- *Burgeff H. 1954.** *Samenkeimung und Kultur Europäischer Erdorchideen*. Stuttgart: Gustav Fischer. - citováno **Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycothophic plant*. Cambridge University Press.
- *Butcher D, Marlow SA. 1989.** Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. In *Modern methods in orchid conservation*, ed. Pritchard HW, , pp 31-38. Cambridge: Cambridge University Press. - citováno z **Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycothophic plant*. Cambridge University Press.
- Buyun L, Lavrentyeva A, Kovalska L, Ivannikov R. 2004.** In vitro germination of seeds of some rare tropical orchids. *Acta Universitatis Latviensis* **676**: 159–162.

- Cardoso JA, Robles AB, Zaitogui M. 2008.** Relationship between seed survival and seed characteristics of nine Mediterranean legumes after ingestion by sheep. *Options Méditerranéennes, Series A* **288**: 285–288.
- Carlson MC. 1940.** Formation of the seed of *Cypripedium parviflorum*. *Botanical Gazette* **102**: 295–301.
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein J V, Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, Schuiteman A. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 151–174.
- Chen F, Tobimatsu Y, Havkin-Frenkel D, Dixon RA, Ralph J. 2012.** A polymer of caffeoyl alcohol in plant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 1772–1777.
- Chen W, Zhang C, Song L, Sommerfeld M, Hu Q. 2009.** A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods* **77**: 41–47.
- Chi Y, Hatakka A, Maijala P. 2007.** Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? *International Biodeterioration and Biodegradation* **59**: 32–39.
- Christenhusz MJM, Byng JW. 2016.** The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* **261**: 201–217.
- Clements M. 1995.** Reproductive biology in relation to phylogeny of the Orchidaceae especially in the tribe Diuridae.
- Clifford MN. 1974.** Specificity of acidic phloroglucinol reagents. *Journal of Chromatography A* **94**: 321–324.
- Curtis J. 1936.** The germination of native orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* **5**: 42–47.
- Curtiss CC. 1893.** An examination of the seeds of some native orchids. *Torrey Botanical Society* **20**: 183–192.
- Czapek F. 1903.** Der Stickstoff im Stot wechsel der Pflanze. *Ergebnisse der Physiologie* **2**: 639–669.
- D'Hondt B, Hoffmann M. 2011.** A reassessment of the role of simple seed traits in mortality following herbivore ingestion. *Plant Biology* **13**: 118–124.
- Dox AW. 1909.** The intracellular enzymes of lower fungi, especially those of *Penicillium camemberti*. *Journal of Biological Chemistry* **6**: 461–467.
- *Eiberg H. 1970.** Asymbiotisk frøspiring og kulturforsøg hos nogle europæiske jordorkideer. University of Copenhagen. - citováno z **Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycothophilic plant*. Cambridge University Press.
- Eilhard K. 1980.** Einige Beobachtungen bei der asymbiotischen Aussat von Orchideensamen. *Die Orchidee* **31**: 183–185, 260.
- Enstone DE, Peterson CA. 1992.** The apoplastic permeability of root apices. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1502–1512.
- Eriksson O, Kainulainen K. 2011.** The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **13**: 73–87.
- Figura T, Tylová E, Jersáková J, Vohník M, Ponert J. 2021.** Fungal symbionts may modulate nitrate inhibitory effect on orchid seed germination. *Mycorrhiza* **31**: 231–241.
- Fredrikson M. 1992.** The development of the female gametophyte of *Epipactis* (Orchidaceae) and its inference for reproductive ecology. *American Journal of Botany* **79**: 63–68.
- Gandawijaja D, Arditti J. 1983.** The orchids of Krakatau: Evidence for a mode of transport. *Annals of Botany* **52**: 127–130.
- *Garay LA., 1964.** Evolutionary significance of geographical distribution of orchids. Proceedings of the 4th World Orchid Conference, Singapore. citiváno z **Gandawijaja D, Arditti J. 1983.** The orchids of Krakatau: Evidence for a mode of transport. *Annals of Botany* **52**: 127–130.
- Gardener CJ, McIvor JG, Jansen A. 1993.** Survival of seeds of tropical grassland species subjected to bovine digestion. *Journal of Applied Ecology* **30**: 75–85.

- Hanson PJ, Sucoff EI, Markhart AH. 1985.** Quantifying apoplastic flux through red pine root systems using trisodium, 3-hydroxy-5,8,10-pyrenetrisulfonate. *Plant Physiology* **77**: 21–24.
- Harvais G. 1974.** Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts. *Canadian Journal of Botany* **52**: 451–460.
- Harvais G. 1980.** Scientific notes on a *Cypripedium reginae* of Northwestern Ontario, Canada. *American Orchid Society Bulletin* **49**: 237–244.
- Harvais G, Hadley G. 1967.** The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist* **66**: 217–230.
- Hatakka A. 1994.** Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **13**: 125–135.
- Healey PL, Michaud JD, Arditti J. 1980.** Morphometry of orchid seeds. III. Native California and related species of *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera* and *Spiranthes*. *American Journal of Botany* **67**: 508–518.
- Hedrén M, Olofsson SN, Paun O. 2018.** Orchid colonization: multiple parallel dispersal events and mosaic genetic structure in *Dactylorhiza majalis* ssp. *lapponica* on the Baltic island of Gotland. *Annals of botany* **122**: 1019–1032.
- Jarman P. 1987.** Damage to *Acacia tortilis* seeds eaten by impala. *African Journal of Ecology* **14**: 223–225.
- Jones KH, Senft JA. 1985.** An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **33**: 77–79.
- Kauth PJ, Dutra D, Johnson TR, Stewart SL, Kane ME, Vendrame WA. 2008.** Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*: 375–391.
- Kawashima T, Goldberg RB. 2010.** The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends in Plant Science* **15**: 23–30.
- Kendon JP, Rajaovelona L, Sandford H, Fang R, Bell J, Sarasan V. 2017.** Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: ‘in vitro collecting’ as a case study. *Botanical Studies* **58**.
- van der Kinderen G. 1987.** Absciscic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. *Lindleyana* **2**: 84–87.
- Kramer CY. 1956.** Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics* **12**: 307–310.
- Kruskal WH, Wallis AW. 1953.** Errata: Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* **48**: 907–911.
- Kurzweil H. 1994.** The unusual seeds of the *Disa uniflora* group with notes on their dispersal. In: Pridgeon AM, ed. *Proceedings of the 14th World Orchid Conference, Glasgow 1993*. London, UK: HMSO, 397±399.
- Leake J. 1994.** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**: 171–216.
- Lee YI, Chung MC, Yeung EC, Lee N. 2015.** Dynamic distribution and the role of abscisic acid during seed development of a lady's slipper orchid, *Cypripedium formosanum*. *Annals of Botany* **116**: 403–411.
- Lee YI, Lee N, Yeung EC, Chung MC. 2005.** Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **130**: 747–753.
- Lee YI, Lu CF, Chung MC, Yeung EC, Lee N. 2007.** Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**: 246–252.
- Lee YI, Yeung EC, Lee N, Chung MC. 2006.** Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. *Annals of Botany* **98**: 1311–1319.

- Lee YI, Yeung EC, Lee N, Chung MC. 2008.** Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: Embryo development. *Botanical Studies* **49**: 139–146.
- de Lehaie JH. 1910.** Observations pour servir à l'étude de la dissémination des Orchidées indigènes en Belgique. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* **1**: 45–52.
- Li YY, Chen XM, Guo SX, Lee YI. 2016.** Embryology of two mycoheterotrophic orchid species, *Gastrodia elata* and *Gastrodia nantoensis*: Ovule and embryo development. *Botanical Studies* **57**.
- Liddell R. 1943.** Germinating native orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* **12**: 344–345.
- Lindén B. 1980.** Aseptic germination of seeds of Northern Terrestrial orchids. *Annales Botanici Fennici* **17**: 174–182.
- Lindén B. 1992.** Two new methods for pretreatment of seeds of Northern orchids to improve germination in axenic culture. *Annales Botanici Fennici* **29**: 305–313.
- Maas P, Maas-van de Kamer H, van Benthem J, Snelders H, Rübsamen T. 1986.** Burmanniaceae. *New York Botanical Garden Press* **40/42**: 1–189.
- *Malmgren S. 1993.** Asymbiotisk fröföroknig i stor skala av *Anacamptis*, *Ophrys*, *Orchis* och andra orkideer med runda rotknölar. *Svensk Botanisk Tidskrift*, **87**, 221 - 234. - citováno z
- Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycothophic plant*. Cambridge University Press.
- Manning J, van Staden J. 1987.** The development and mobilisation of seed reserves in some African Orchids. *Australian Journal of Botany* **35**: 343–353.
- Mei-Sheng T, Fu-Xing W, Nan-Fen Q, An-Ci S. 1985.** In vitro seed germination and developmental morphology of seedling in *Cymbidium ensifolium*. *Acta Botanica Sinica* **27**: 455–459.
- Merckx V. 2013.** Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi. *Choice Reviews Online* **51**.
- Merckx V, Freudenstein J V. 2010.** Evolution of mycoheterotrophy in plants: A phylogenetic perspective. *New Phytologist* **185**: 605–609.
- Meyer CJ, Seago JL, Peterson CA. 2009.** Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of Botany* **103**: 687–702.
- Michl J. 1988.** Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny II. *Živa* **3**: 89–91.
- Miyoshi K, Mii M. 1988.** Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae* **35**: 127–130.
- Miyoshi K, Mii M. 1998.** Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro. *Physiologia Plantarum* **102**: 481–486.
- Moon G, Clough B, Peterson C, Allaway W. 1986.** Apoplastic and symplastic pathways in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. roots revealed by fluorescent tracer dyes. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 637–648.
- Morales-Linares J, García-Franco JG, Flores-Palacios A, Valenzuela-González JE, Mata-Rosas M, Díaz-Castelazo C. 2018.** Orchid seed removal by ants in Neotropical ant-gardens. *Plant Biology* **20**: 525–530.
- Nikolaeva MG. 1977.** Factors controlling the seed dormancy pattern. In: **Khan AA**, ed. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam, North-Holland.
- Olson AR. 1980.** Seed morphology of *Monotropa uniflora* L. (Ericaceae). *American Journal of Botany* **67**: 968–974.
- Pansarin ER. 2021.** Unravelling the enigma of seed dispersal in *Vanilla*. *Plant Biology* **23**: 974–980.
- Pansarin ER, Suetsugu K. 2022.** Mammal-mediated seed dispersal in *Vanilla*: Its rewards and clues to the evolution of fleshy fruits in orchids. *Ecology*: 1–6.
- Pauw MA De, Remphrey WR. 1993.** In vitro germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment. *Canadian Journal of Botany* **71**: 879–885.
- Pearse AG. 1985.** *Histochemistry (theoretical and applied)*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Pecková E, Tylová E, Soukup A. 2016.** Tracing root permeability: comparison of tracer methods. *Biologia Plantarum* **60**: 695–705.

- Peterson CA, Edgington LV. 1975.** Uptake of the systemic fungicide methyl 2-benzimidazolecarbamate and the fluorescent dye PTS [trisodium, 3-hydroxy-5, 8, 10-pyrenetrisulfonate] by onion roots. *Phytopathology* **65**: 1254–1259.
- Philippe G, Sørensen I, Jiao C, Sun X, Fei Z, Domozych DS, Rose JK. 2020.** Cutin and suberin: assembly and origins of specialized lipidic cell wall scaffolds. *Current Opinion in Plant Biology* **55**: 11–20.
- Pierce S, Spada A, Caporali E, Ceriani RM, Buffa G. 2018.** Enzymatic scarification of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) seed facilitates lignin degradation, water uptake and germination. *Plant Biology* **21**: 409–414.
- Pomar F, Merino F, Barceló AR. 2002.** O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* **220**: 17–28.
- Ponert J, Šoch J, Vosolsobě S, Čiháková K, Lipavská H. 2021.** Integrative study supports the role of trehalose in carbon transfer from fungi to mycotrophic orchid. *Frontiers in Plant Science* **12**: 1–14.
- Ponert J, Vosolsobě S, Kmecová K, Lipavská H. 2011.** European orchid cultivation – From seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* **1**: 95–107.
- Pridgeon A, Cribb P, Chase M, Rasmussen F. 1999.** *Genera Orchidacearum. Volume 1. General introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. Oxford University Press on Demand.
- Prutsch J, Schardt A, Schill R. 2000.** Adaptations of an orchid seed to water uptake and storage. *Plant Systematics and Evolution* **220**: 69–75.
- Pyykkö M. 1968.** Embryological and anatomical studies on Finnish species of the Pyrolaceae. *Annales Botanici Fennici* **5**: 153–165.
- R CORE TEAM. 2019.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. Retrieved 19 April 2021.
- Rao X, Krom N, Tang Y, Widiez T, Havkin-Frenkel D, Belanger FC, Dixon RA, Chen F. 2014.** A deep transcriptomic analysis of pod development in the vanilla orchid (*Vanilla planifolia*). *BMC Genomics* **15**: 1–12.
- Rasmussen HN. 1990.** Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro. *New Phytologist* **116**: 137–147.
- Rasmussen HN. 1992.** Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum* **86**: 161–167.
- Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.
- Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2009.** Orchid mycorrhiza: Implications of a mycophagous life style. *Oikos* **118**: 334–345.
- Razanamandranto S, Tigabu M, Neya S, Odén PC. 2004.** Effects of gut treatment on recovery and germinability of bovine and ovine ingested seeds of four woody species from the Sudanian savanna in West Africa. *Flora* **199**: 389–397.
- Ren LY, Zhao H, Liu XL, Zong TK, Qiao M, Liu SY, Liu XY. 2021.** Transcriptome reveals roles of lignin-modifying enzymes and abscisic acid in the symbiosis of *Mycena* and *Gastrodia elata*. *International Journal of Molecular Sciences* **22**.
- Ridley HN. 1905.** On the dispersal of seeds by wind. *Annals of Botany* **19**: 351–363.
- Ridley HN. 1930.** *The Dispersal Of Plants Throughout The World*. Ashford: Kent: Reeve&Co.
- Robles B, Castro J, Ramos ME. 2005.** Effects of ruminal incubation and goats' ingestion on seed germination of two legume shrubs: *Adenocarpus decorticans* Boiss. and *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. *Ciheapm*: 111–115.
- Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, Winship LJ. 2011.** Propidium iodide competes with Ca²⁺ to label pectin in pollen tubes and arabidopsis root hairs. *Plant Physiology* **157**: 175–187.
- Rudnicki R. 1969.** Studies on abscisic acid in apple seeds. *Planta* **86**: 63–68.
- Seeman G. 1953.** Über eine neue Wässerungsmethode für schwerkeimende Orchideensamen. *Die Orchidee* **4**: 56.

- Selosse MA, Cameron DD. 2010.** Introduction to a virtual special issue on mycoheterotrophy: 'New Phytologist' sheds light on non-green plants. *New Phytologist* **185**: 591–593.
- Shin YK, Baque MA, Lee EJ, Paek KY. 2011.** Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pre-treatments on in vitro germination and protocorm formation of *Calanthe* hybrids. *Australian Journal of Crop Science* **5**: 582–588.
- Shun-xing G, Jin-tang X. 1990.** Studies on the changes of cell ultrastructure in the course of seed germination of *Bletilla striata* under fungus infection conditions. *Acta Botanica Sinica* **32**: 594–598.
- Smith RA. 1982.** Nutritional study of *Pisolithus tinctorius*. *Mycologia* **74**: 54–58.
- Šoch J. 2017.** Utilizace trehalózy u orchidejí: evoluce genů trehalázy.
- Soukup A. 2014.** Selected simple methods of plant cell wall histochemistry and staining for light microscopy. *Methods in molecular biology* **1080**: 25–40.
- van Staden J, Webb DP, Wareing PF. 1972.** The effect of stratification on endogenous cytokinin levels in seeds of *Acer saccharum*. *Planta* **104**: 110–114.
- *Stoutamire WP. 1974.** Terrestrial orchid seedlings. In *The orchids. Scientific studies*, ed. **Withner, CL**, pp. 101–128. New York: Wiley. - citováno z **Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycoheterotrophic plant*. Cambridge University Press.
- Suetsugu K. 2018.** Seed dispersal in the mycoheterotrophic orchid *Yoania japonica*: Further evidence for endozoochory by camel crickets. *Plant Biology* **20**: 707–712.
- Suetsugu K. 2020.** A novel seed dispersal mode of *Apostasia nipponica* could provide some clues to the early evolution of the seed dispersal system in Orchidaceae. *Evolution Letters* **4**: 457–464.
- Suetsugu K, Kawakita A, Kato M. 2015.** Avian seed dispersal in a mycoheterotrophic orchid *Cyrtosia septentrionalis*. *Nature Plants* **1**: 1–2.
- Swamy BGL. 1945.** Embryo sac and fertilization in *Cypripedium spectabile*. *Botanical Gazette* **107**: 291–295.
- Swamy BGL. 1949.** Embryological studies in the Orchidaceae. I. Gametophytes. *The American Midland Naturalist* **41**: 184–201.
- Těšitelová T, Těšitel J, Jersáková J, Říhová G, Selosse MA. 2012.** Symbiotic germination capability of four epipactis species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *American Journal of Botany* **99**: 1020–1032.
- Tomita M, Tomita M. 1997.** Plant regeneration from immature seed-derived callus of *Cypripedium macranthos* Swartz var. *taiwanianum* (Masamune) F. Maekawa. *Breeding Science* **47**: 279–281.
- Tournay R. 1960.** Orchidaceae africanae III : Le nombre de graines d ' une capsule d ' *Eulophia Horsfallii* (Batem.). *Botanic Garden Meise* **30**: 407–410.
- Vasudevan R, van Staden J. 2010.** In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae* **123**: 496–504.
- Vejsadová H. 2006.** Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **48**: 109–113.
- Veyret Y. 1969.** La structure des semences des Orchidaceae et leur aptitude à la germination in vitro en cultures pures. *Botanique*: 89–98.
- Van Waes JM. 1984.** In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideeën. Thesis, Rijksuniversiteit Gent, Ghent, Belgium.
- Van Waes JM, Debergh PC. 1986a.** In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* **67**: 253–261.
- Van Waes JM, Debergh PC. 1986b.** Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* **66**: 435–442.
- Waite S, Farrell L. 1998.** Population biology of the rare military orchid (*Orchis militaris* L.) at an established site in Suffolk, England. *Botanical Journal of the Linnean Society* **126**: 109–121.

- Xu X, Fang L, Li L, Ma G, Wu K, Zeng S. 2020.** Absciscic acid inhibits asymbiotic germination of immature seeds of *Paphiopedilum armeniacum*. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1–13.
- *Yam TW, Yeung EC, Ye X-L, Zee S-Y, Arditti J. 2002.** Embryology-seeds. In: ed. **Arditti J, Kull T.** Orchid biology: reviews and perspectives VIII. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- 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.
- Yang CK, Lee YI. 2014.** The seed development of a mycoheterotrophic orchid, *Cyrtosia javanica* Blume. *Botanical Studies* **55**: 1–7.
- Yeh CH, Chen KY, Lee YI. 2021.** Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Botanical Studies* **62**: 1–12.
- Yeung EC. 2017.** A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies* **58**: 1–14.
- Yeung EC, Law SK. 1992.** Embryology of *Calypso bulbosa*. II. Embryo development. *Canadian Journal of Botany* **70**: 461–468.
- Yeung EC, Zee SY, Ye XL. 1996.** Embryology of *Cymbidium sinense*: Embryo development. *Annals of Botany* **78**: 105–110.
- Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL. 2000.** Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings , and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* **156**: 145–150.
- Zhang Y, Lee YI, Deng L, Zhao S. 2013.** Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae* **164**: 130–136.
- Zhang Y, Li YY, Wang M, Liu J, Luo F, Lee YI. 2021.** Seed dispersal in *Neuwiedia singaporeana*: novel evidence for avian endozoochory in the earliest diverging clade in Orchidaceae. *Botanical Studies* **62**.
- *Ziegler H. 1981.** Mikromorphologie der Orchideensämen unter Berücksichtigung taxonomischer Aspekte – Ph.D. thesis, Ruprecht Karls Universität, Heidelberg. citováno z **Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: From seed to mycoheterotrophic plant*. Cambridge University Press.