

UNIVERZITA KARLOVA PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra fyziologie rostlin



**RANÉ FÁZE VÝVOJE SEMENÁČKŮ
TERESTRICKÝCH ORCHIDĚJÍ:
VLIV SACHARIDŮ A FYTOHORMONŮ**

(EARLY STAGES OF DEVELOPMENT OF TERRESTRIAL ORCHIDS:
THE EFFECT OF SACCHARIDES AND PHYTOHORMONES)

diplomová práce

Bc. Jan Ponert

Praha 2009

Školitelka diplomové práce:
Doc. RNDr. Helena Lipavská, PhD.

Konzultanti diplomové práce:
RNDr. Lukáš Fischer , Ph.D.
RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma
Rané fáze vývoje semenáčků terestrických orchidejí: vliv sacharidů a fytohormonů

Vypracoval samostatně na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v roce 2009 za použití citované literatury. Souhlasím s případným zapůjčením diplomové práce pro studijní účely.

Jan Ponert

Poděkování

Poděkování náleží především mé školitelce Doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D.. Svou ochotou a laskavým přístupem vytvořila kvalitní zázemí a umožnila výzkum této problematiky. Svými cennými radami a nadlidskou trpělivostí pak významně přispěla k úrovni celé práce.

Za rozličnou pomoc při výzkumu orchidejí chci dále poděkovat následujícím lidem:

Anna Ponertová

Anna-Marie Ponertová

Jan Ponert

RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Bc. Klára Čiháková

Bc. Berneška Říhová

Bc. Stanislav Vosolsobě, Bo.

RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Doc. RNDr. Fatima Cvrčková, Dr.rer.nat.

Elena Kozlová

Ζήσης Αντωνόπουλος

Dr. Hanne N. Rasmussen

RNDr. Jaroslav Mácha

RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Dr. Jiří Friml

Olga Činglová

Halka Hrabáková

RNDr. Jana Jersáková, Ph.D.

Mgr. Petra Vojvodová

Doc. RNDr. Libuše Pavlová, CSc.

RNDr. Lenka Dvořáková

RNDr. Lenka Havelková

Mgr. Ivan Kulich

Bc. Petr Kohout

RNDr. Martin Vohník, Ph.D.

Bc. Zdeněk Janovský

Bc. Cellie Korrrittová

Bc. Hanka Ševčíková

PhDr. Jarmila Čiháková

RNDr. Lubomír Daněk

Mgr. Erica Bellinvia, Ph.D.

Ing. Jindřich Šmiták

RNDr. Milan Baláž, Ph.D.

neznámému jihoitalskému pastevcí v sedle mezi Monte Mótola a Monte Cerasulo.

Hanka Pazderová

RNDr. Eva Smržová

Roman Kotelenský

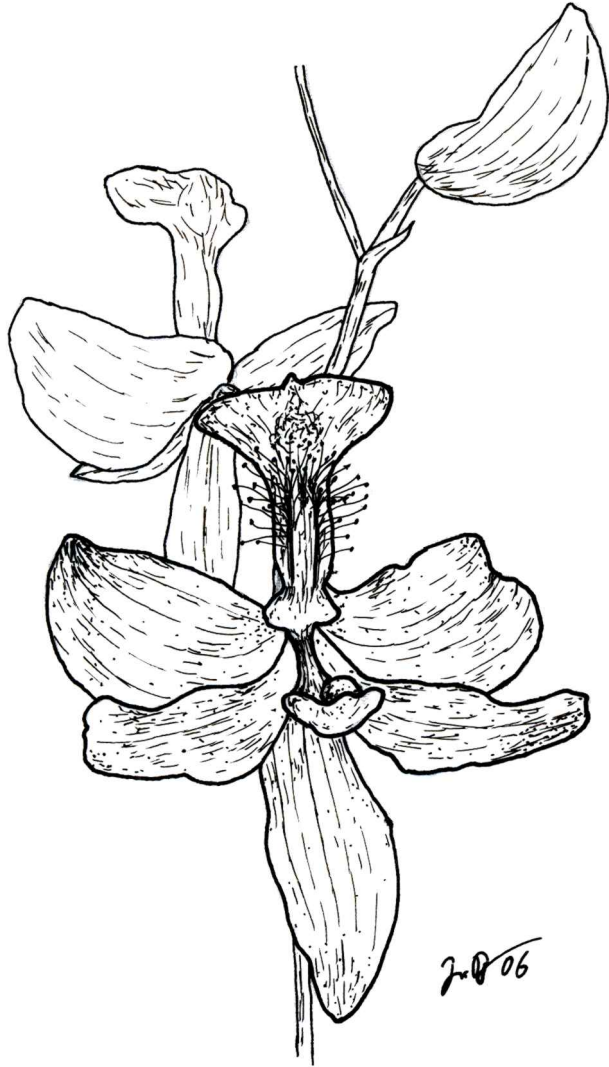
Miroslav Pazdera

Zvláštní poděkování pak náleží institucím, které výzkum různou měrou podpořily:

Carabinieri Comando Compagnia Di Sala Consilina

Unii pro transport a signalizaci rostlin (UTSR)

Botanické zahradě Hlavního města Prahy



Calopogon tuberosus

Seznam zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenofyocetová kyselina
35S::GFP	konstrukt s genem pro GFP pod kontrolou promotoru 35S
ABA	kyselina abscisová
Aux/IAA	inhibitory signalizace auxinu
BAP	benzylaminopurin
CaMV 35S	konstitutivní promotor viru tabákové mozaiky
ČA	médium pro kultivaci hub
DR5rev	auxinem indukovatelný promotor
DR5rev::GFP	konstrukt s genem pro GFP pod kontrolou promotoru DR5rev
F+G	fruktóza + glukóza
FM	médium pro kultivaci rostlin
FRU	fruktóza
GA ₃	kyselina giberelová (GA ₃)
GA ₄	kyselina giberelová (GA ₄)
GAL	galaktóza
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GLU	glukóza
Gnom	mutant s porušenou lokalizací PIN (gnom = skřítek)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	indolyl octová kyselina
IBA	kyselina indolyl máselná
Iet	Indolyethanol
iP	N ⁶ -(2-isopentenyl)adenin
iPa	N ⁶ -(2-isopentenyl)adenosin
LAK	laktóza
LB	médium pro kultivaci bakterií
MAL	maltóza
MAN	manitol
Michl	médium pro kultivaci rostlin
Mo2	médium pro kultivaci rostlin
NAA	kyselina naftyloctová
NIC	kontrolní varianta bez sacharidů
PAA	fenyloctová kyselina
PCIB	kyselina p-chlorisomáselná
PCP60	binární vektor
PIN	vtokový přenašeč auxinu
PLBs	útvary podobné protokormům (protocorm like bodies)

pNOS::NPTII	konstrukt s genem pro neomycinfosfotransferázu pod kontrolou konstitutivního promotoru
PVP	polyvinylpyrolidon
RAF	rafinóza
RT-PCR	reverzní transkripce následování kvantitativní PCR
SM	médium pro kultivaci rostlin
SOR	sorbitol
Stemon	médium pro kultivaci hub
SU2	médium pro kultivaci rostlin
SU4	médium pro kultivaci rostlin
SUC	sacharóza
TIBA	kyselina trijodbenzoová
TRE	trehalóza
UTSR	Unie pro transport a signalizaci rostlin
YEB	médium pro kultivaci bakterií
YEB recovery	médium pro kultivaci bakterií
YEB+MgSO ₄	médium pro kultivaci bakterií

Abstract

Orchids have very small seeds with only limited contents of reserves. Therefore, in early stages of their development most of them fully depend on nutrition provided by mycorrhizal fungi. Nearly all orchids remain partial mycotrophs during whole life, even after a start of their own photosynthesis. These characteristics make orchids an ideal model for studies of mycorrhizal associations and bring us good opportunity to study different feeding strategies in the single species. This work targets on early developmental stages of orchids and by studying carbohydrate status of both plant and fungus and their sensitivity to different types of phytohormones estimates potential of these signalling compounds to control plant-fungus coordination. Firstly, the capability of selected orchids to utilize different carbohydrates have been tested. Results confirmed their ability to metabolize sucrose, fructose, maltose, raffinose and trehalose. Only low level of utilization have been shown for lactose and mannitol. For the first time it has been shown, that some orchids are able to utilize sorbitol. In contrast, fructose has clear inhibition effect on germination or early developmental stages of *Ophrys* protocorms, while not fructose but glucose inhibits germination and subsequent development of *Dactylorhiza*. The effect of phytohormones on orchid mycorrhizal fungi is also presented. It is shown, that auxins stimulate branching of selected mycorrhizal fungi hyphae. Auxins as a possible means of mutual communication between fungi and orchids in mycorrhizal associations is discussed. Further, developmental effects of selected phytohormones on early developmental stages of orchid protocorms differentiation were studied. Based on the achieved results an attempt have been made to propose a model of auxin-cytokinin directed developmental regulation of early development in orchids. Auxins stimulate growing of basal parts of protocorms, while cytokinins stimulate growing of apical parts and differentiation of shoot meristem. It is proposed, that auxins are in early protocorm transported to basal parts, where they stimulate development of mycotrophic tissue. As a result of this auxin distribution polarization cytokinin effect can overbalance in apical part, where lead to meristem differentiation. To support the conclusion a transgene plants carrying GFP under control of auxin inducible promoter DR5 have been prepared to visualise endogenous auxin levels in orchids.

Úvod

Mykorhiza je rozšířená u více než 90 % vyšších rostlin. Pro její studium však nelze využít klasický modelový organismus *Arabidopsis thaliana*, který mykorhizu nevytváří. Studium mykorhizních asociací tak dnes probíhá na různých organismech a modelový druh dosud zvolen nebyl.

Jednou z rostlinných skupin, které by mohly být pro výzkum mykorhizních asociací velice vhodné, jsou orchideje (čeleď vstavačovitě - *Orchidaceae*). Prakticky všechny druhy jsou ve svých raných vývojových fázích obligátně závislé na mykorhize. Semena obsahují jen velmi málo zásobních látek, a výživu mladých semenáčků tak musí zajistit mykorhizní houba. V pozdějších fázích vývoje většina orchidejí počíná fyto-syntetizovat, mění svůj způsob výživy na částečnou mykotrofii a některé druhy mohou být v dospělosti zcela nezávislé na mykorhize. Jiné druhy však schopnost fotosyntézy ztratily a celý svůj vývojový cyklus se vyživují výhradně mykotrofií. Orchideje tak nabízejí možnost srovnání různých strategií mezi blízkými příbuznými druhy, ale také mezi různými vývojovými fázemi jediného druhu.

Pro pochopení vzájemných regulací chování houby a rostliny je podstatný především signální význam některých látek přenášených v mykorhizních asociacích. Dosavadní práce naznačují na možnou úlohu fytohormonů. Další přenášené látky s pravděpodobnou signální úlohou jsou sacharidy. Jejich signalizační potenciál byl vůči fytohormonům objeven teprve nedávno, ale u řady rostlin se ukazují významné v regulaci mnoha procesů.

Tato práce se zaměřila na účinek sacharidů a fytohormonů v orchideoidní mykorhizní symbióze. Jelikož je dosud k dispozici velmi málo informací, byly zvoleny jako modelový materiál rané vývojové fáze semenáčků závislé na mykorhize. Semena orchidejí obsahují pouze malá nediferencovaná embrya bez základů orgánů a k veškeré organogenezi tu dochází až po vyklíčení. Mohou být tedy vhodným materiálem také pro studium vývojových regulací. Jelikož je porozumění těmto regulacím v rámci rostliny podmínkou pro porozumění vzájemné koordinaci dějů mezi houbou a rostlinou, byla mu v této práci věnována značná pozornost. Protože terestrické druhy orchidejí jsou na mykorhize obecně více závislé, zaměřila se práce na jejich studium.

Cíle práce

Cílem této práce je přispět k porozumění regulacím mykorhizních asociací v raných fázích vývoje semenáčků orchidejí, a to především studiem účinku sacharidů a fytohormonů.

Dílčí cíle:

- Testovat schopnost vybraných sacharidů sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro semenáčky vybraných druhů orchidejí.
- Pomocí analýzy spekter sacharidů mykorhizních hub vytipovat možné sacharidy poskytované orchidejím houbou v raných fázích vývoje.
- Ověřit, zda mohou být rozpustné sacharidy obsaženy v semenech orchidejí (a být tedy zdrojem uhlíku a energie při klíčení).
- Charakterizovat účinek fytohormonů na rané fáze vývoje semenáčků vybraných orchidejí.
- Charakterizovat účinek fytohormonů na vývoj mykorhizních hub.
- Vypracovat účinnou metodu transformace vybraných orchidejí a připravit transgenní rostliny umožňující vizualizaci endogenních hladin auxinu.

Obsah

1. Literární úvod	4
1.1. Systematika orchidejí.....	4
1.2. Kultivace orchidejí.....	5
1.3. Časné fáze ontogeneze orchidejí.....	5
1.3.1. Embryogeneze	5
1.3.2. Semena.....	6
1.3.2.1. Osemení	8
1.3.2.2. Embryo.....	10
1.3.3. Výživa raných fází semenáčků	12
1.3.3.1. Zásoby v semenech.....	13
1.3.3.2. Výživa během klíčení	13
1.3.3.3. Výživa semenáčků sacharidy.....	15
1.4. Mykorrhiza.....	17
1.4.1. Orchideoidní mykorrhiza	19
1.4.1.1. Morfologie orchideoidní mykorrhizní symbiózy	20
1.4.1.2. Regulace vývoje orchideoidních mykorrhiz	21
1.4.1.3. Tok látek v orchideoidní mykorrhizní symbióze	22
1.4.1.4. Látky přenášené v orchideoidní mykorrhizní symbióze	24
1.4.1.5. Přenosy sacharidů v orchideoidních mykorrhizních symbiózách.....	25
1.4.1.6. Role fytohormonů v mykorrhizních symbiózách.....	25
1.4.1.7. Obecná role fytohormonů v mykorrhizách	26
1.4.1.8. Role fytohormonů v orchideoidních mykorrhizách	29
1.5. Vliv fytohormonů na růst a vývoj orchidejí.....	30
1.5.1. Vliv fytohormonů na klíčení orchidejí.....	30
1.5.1.1. Auxiny	30
1.5.1.2. Cytokininy	31
1.5.1.3. Gibereliny	31
1.5.1.4. ABA	31
1.5.2. Vliv fytohormonů na další fáze vývoje orchidejí	31
1.5.2.1. Auxiny	32
1.5.2.2. Cytokininy	33
1.5.2.3. Gibereliny	35
2. Materiál a metody	37
2.1. Kultivační prostory	37
2.2. Kultivační média.....	37
2.2.1. Příprava médií.....	38
2.3. Desinfekce nástrojů a materiálu.....	39
2.4. Hodnocení materiálu.....	39
2.4.1. Záznam dat.....	39
2.4.2. Zpracování dat	40
2.5. Analýza obsahu rozpustných sacharidů.....	40
2.5.1. Odběr vzorků	40
2.5.2. Extrakce sacharidů.....	40
2.5.3. Stanovení obsahu a spektra sacharidů	41
2.6. Práce s rostlinným materiálem.....	41
2.6.1. Kultivace rostlinného materiálu.....	42
2.6.2. Příprava a skladování semen.....	42

2.6.3. Desinfekce semen:	42
2.7. Práce s bakteriemi	44
2.7.1. Bakteriální kmeny	44
2.7.2. Kultivační podmínky	44
2.7.3. Příprava kompetentních buněk <i>A. tumefaciens</i>	45
2.8. Práce s houbami	45
2.8.1. Kultivační podmínky:	45
2.8.2. Izolace hub z kořenů orchidejí	46
2.8.3. Použité houby	46
2.9. Práce s DNA	47
2.9.1. Použité vektory	47
2.9.2. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i>	47
2.9.3. Příprava nábojů pro Helios Gene Gun System	49
2.9.3.1. Příprava vektoru	49
2.9.3.2. Příprava mikroprojektilů	50
2.9.3.3. Vlastní příprava nábojů	51
2.9.4. Transientní transformace rostlin	51
2.9.5. Stabilní transformace <i>Dactylorhiza fuchsii</i>	52
2.9.5.1. Příprava rostlin	52
2.9.5.2. Příprava <i>A. tumefaciens</i> s příslušným vektorem	52
2.10. Analýza endogenních sacharidů hub	53
3. Experimentální část	55
3.1. Vliv sacharidů na vývoj orchidejí	55
3.1.1. Vývoj raných fází semenáčků na médiích s vybranými sacharidy	55
3.1.1.1. Vývoj semenáčků <i>Ophrys eleonora</i> v raných fázích na vybraných sacharidech	56
3.1.1.2. Vývoj semenáčků <i>Oeceoclades decaryana</i> v raných fázích na vybraných sacharidech	61
3.1.1.3. Vývoj semenáčků <i>Dactylorhiza majalis</i> v raných fázích na vybraných sacharidech	63
3.1.2. Vývoj semenáčků v pozdějších fázích na vybraných sacharidech	64
3.1.3. Využití trehalózy	67
3.2. Obsah endogenních sacharidů v semenech orchidejí	70
3.3. Obsah endogenních sacharidů v mykorrhizních houbách	72
3.4. Vliv fytohormonů na vývoj orchidejí	73
3.4.1. Účinek vybraných fytohormonů na rané fáze vývoje semenáčků	73
3.4.1.1. Vliv auxinů na semenáčky v rané fáze vývoje	74
3.4.1.2. Vliv cytokininů na semenáčky v raných fázích vývoje	79
3.4.1.3. Vliv kombinace NAA a BAP na semenáčky v rané fázi vývoje	86
3.4.1.4. Vliv ABA a GA ₃ na semenáčky v rané fázi vývoje	90
3.4.1.5. Účinek vybraných fytohormonů na semenáčky v pozdější fázích vývoje	94
3.4.1.6. Efekt auxinů v tekutém médiu	96
3.5. Účinek vybraných fytohormonů na mykorrhizní houby	98
3.6. Stabilní transformace <i>Dactylorhiza fuchsii</i>	108
3.6.1. Transientní exprese 35S::GFP	108
3.6.2. Transientní exprese DR5rev::GFP	109
3.6.3. Vlastní transformace <i>Dactylorhiza fuchsii</i>	110
4. Diskuse	112
4.1. Sacharidy	112

4.1.1. Využití sacharidů orchidejemi	112
4.1.2. Souvislost využití sacharidů s mykorhizou	115
4.2. Účinek fytohormonů na růst a vývoj orchidejí	117
4.2.1. Účinek auxinů a cytokininů	118
4.2.1.1. Souvislosti s embryogenezí ostatních rostlin	120
4.2.1.2. Možné souvislosti s evolucí obligátní mykotrofie	121
4.2.1.3. Účinek kombinace NAA a BAP	122
4.2.2. Účinek ABA a GA ₃	122
4.3. Účinek fytohormonů na houby	123
5. Závěry	125
Příloha 1 - použité chemikálie	127
Příloha 2 – kultivační média	129
Příloha 3 – výsevy rostlin	138
6. Seznam použité literatury	139

1. Literární úvod

1.1. Systematika orchidejí

Taxonomie a systematika orchidejí je již dlouhou dobu poměrně komplikovanou otázkou. Velký počet druhů, jejich variabilita, specifická biologie a v neposlední řadě též relativní vzácnost vedly k různým a často dosti odlišným názorům. Jelikož dodnes je mnoho aspektů nedořešených, dovolím si nejprve stručně uvést systematické členění použité v této práci.

Orchideje se zpravidla hodnotí jako samostatná čeleď vstavačovité (*Orchidaceae*), spadající na bázi řádu *Asparagales*. V rámci této čeledi je rozlišováno pět hlavních skupin – podčeledi *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Epidendroideae*, *Orchidoideae* a *Vanilloideae* (Pridgeon et al., 1999). Význam oddělování těchto skupin byl různými autory hodnocen odlišně. Například Szlachetko (1995) slučoval *Epidendroideae*, *Orchidoideae* a *Vanilloideae* do jediné skupiny postavené na stejnou úroveň vůči *Apostasioideae* a *Cypripedioideae*.

Orchideje jen výjimečně nejsou hodnoceny jako jediná čeleď. Zpravidla se různě pojaté výše uvedené podčeledi hodnotí na úrovni samostatných čeledí (např. Szlachetko, 1995 uvádí tři čeledi – *Apostasioideae*, *Cypripedioideae* a *Orchidoideae*). Z pohledu dnešní systematiky je však takové členění neopodstatněné. V případě zájmu o tuto problematiku pro základní orientaci doporučuji první díl monografie *Genera Orchidacearum* (Pridgeon et al., 1999).

Členění na nižší taxonomické jednotky – triby a subtriby – doznalo v průběhu let výrazných změn. Pro účely této práce není zcela nezbytná orientace v historických pojetích klasifikace orchidejí, a nebudu se zde tímto problémem zabývat. V práci bude použito členění dle nejnovější souborné práce zabývající se systematikou celé čeledi *Orchidaceae* s.l. – *Genera Orchidacearum* (Pridgeon et al., 1999; 2001; 2003; 2005; in prep.) – místy upravené dle novějších, v textu citovaných prací, zabývajících se blíže jednotlivými skupinami. Dosud často používané členění dle Dresslera (1993) či Szlachetka (1995) je již překonané a nebude zde dále uváděno.

Pro tuto práci nejpodstatnější orchideje Evropy byly hodnoceny dle posledního vydání Delforgeova klíče (Delforge, 2006). Systematika rodu *Ophrys* byla upravena dle Deveye et al. (2008), s poznámkou o hodnocení dle Pedersena et Faurholdta (2007). Rody *Aceras*, *Anacamptis*, *Orchis* a *Neotinea* byly uvedeny dle Batemana et al. (2003)

a Kretschmar et al. (2007). *Coeloglossum viride* byl dle Cribba et Chase (2001) hodnocen jako druh rodu *Dactylorhiza*.

1.2. Kultivace orchidejí

Pro pochopení dalšího textu je nutno vysvětlit dva termíny související s kultivací orchidejí *in vitro* – symbiotické a asymbiotické kultury. Tyto termíny se v literatuře zaměřené na orchideje běžně používají, avšak u jiných skupin rostlin příliš často používány nejsou.

Orchideje vytvářejí v přirozených podmínkách mykorhizu a jsou do jisté míry závislé na přísunu látek od houby. V symbiotických kulturách *in vitro* je na živném médiu pěstována houba a teprve na ní orchideje. Výživu orchidejí zde zprostředkovává příslušná mykorhizní houba. Naopak v asymbiotických kulturách *in vitro* houba není. Orchideje jsou kultivovány přímo na živném médiu, které je výhradním zdrojem živin. V dalším textu bude o těchto způsobech kultivace psáno zkráceně jako o kulturách symbiotických a asymbiotických, jak je běžné v literatuře zabývající se orchidejemi.

1.3. Časně fáze ontogeneze orchidejí

Cílem této práce je charakterizace vlivu fytohormonů v raných fázích vývoje semenáčků orchidejí, proto budou tyto fáze ontogeneze nejprve stručně popsány.

1.3.1. Embryogeneze

Jelikož je u orchidejí embryo ve zralém semeni vzhledem k ostatním rostlinám málo vyvinuté, je pro pochopení dějů při klíčení potřebný úvod i do předcházející embryogeneze. Patrně nejčastěji zmiňovaný specifický znak embryogeneze orchidejí je absence endospermu. Mnohdy bývá uváděna jako základní charakteristika všech orchidejí, nicméně situace není zcela jasná. V literatuře lze nalézt jak zprávy o pozorování endospermu, tak dvojitém oplození (př. Swamy, 1943; Swamy, 1947). Jedná se však o starší práce založené na jednoduchých mikroskopických pozorováních, jejichž interpretace nemusí být správná.

Novější důkladná studie (Albert, 1990) dokládá absenci dvojitého oplození a zánik endospermu u *Cypripedium cordigerum*. Podobně dokládá absenci dvojitého oplození rozsáhlá studie Clementse (1995). Jádra centrální buňky zárodečného vaku jsou vyvíjejícím se embryem zpravidla zatlačeny směrem k chaláze, aniž by docházelo

k jejich dalšímu dělení. Pokud se u některých druhů rozdělí, tak jen jednou až dvakrát, a pak mohou v raných fázích obklopovat embryo. Ke splývání jader centrální buňky zárodečného vaku s jádry z pylu však nedochází.

Po vzniku zygoty dochází k jejímu dělení. U některých orchidejí vzniká zjevná asymetrie až při 2. buněčném dělení a vůbec nedochází ke vzniku suspensoru. Častější je však klasičtější případ, kdy k tvorbě zpravidla malého suspensoru dochází. Zralé semeno pak obsahuje kulaté, někdy mírně protáhlé, embryo bez jakýchkoliv diferencovaných základů orgánů (s výjimkou zmíněného suspensoru).

Veškeré další fáze vývoje embryí probíhají zcela nezávisle na mateřské rostlině po vyklíčení. Standardně se tedy nehodnotí jako embryogeneze, ale ontogeneze semenáčků. Embrya jsou od vyklíčení nazývána protokormy. Tohoto členění je též použito v této práci a dalšímu vývoji mladých orchidejí budou věnovány následující kapitoly. (Johansen, 1950; Pridgeon et al., 1999).

Ranné studie embryogeneze orchidejí se zabývaly popisem vznikajících struktur a jejich klasifikací. První soubornější popisnou práci ilustrující vývoj embryí u několika vybraných orchidejí publikoval Treub (1879). Prvním pokusem o soubornější klasifikaci na základě mikroskopických pozorování je pak studie Swamyho (1949), členící embrya orchidejí do šesti základních typů. Množství zkoumaných taxonů orchidejí však nebylo dostačující a byly nacházeny další druhy neodpovídající navrženému členění.

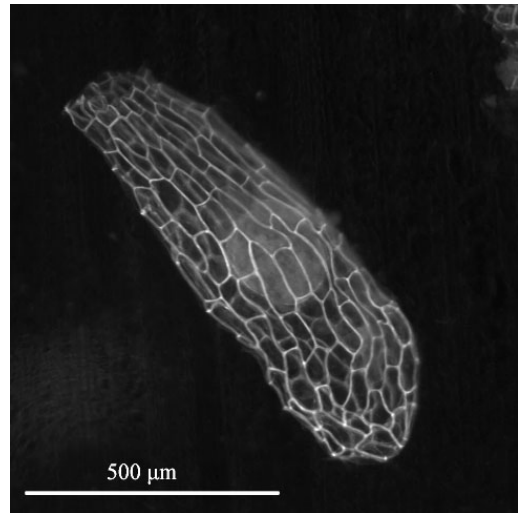
Podrobnější klasifikaci založenou na větším zkoumaném vzorku taxonů navrhl Johansen (1950), jež rozlišil 13 základních typů embryí. Patrně nejnovější je členění uvedené v monografii *Genera Orchidacearum* (Pridgeon et al., 1999) vycházející z práce Clementse (1995). Zajímavé shrnutí se nachází také v díle Veyreta (1974). Pro účely této práce však není typizace embryí příliš podstatná. Nebudu se jí tedy více zabývat a zájemce odkážuji na výše citované práce, především Pridgeona et al. (1999) a Johansena (1950).

1.3.2. Semena

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, obsahují semena orchidejí pouze malý zárodek (obr. 1.1.). Ten je ve zralých semenech jediným živým pletivem. Obklopuje ho jen osemení (testa) tvořené zpravidla jedinou vrstvou odumřelých buněk vzniklou z vnějšího integumentu vajíčka (Clements, 1995; Ziegler, 1981). Takováto semena obsahují minimum zásobních látek a v přirozených podmínkách nemohou vyrůst bez

dodávky externích živin mykorhizou. Drobná semena bez zásobních látek jsou zřejmě obecným jevem vzniklým nezávisle u většiny mykoheterotrofních rostlin, a právě semena orchidejí patří spolu se semeny rodu *Voyria* (*Gentianaceae*) k nejmenším dosud známým semenům rostlin (Leake, 1994).

Tvorba malých semen s minimem zásobních látek a nediferencovaným meristémem se může jevit jako nevýhodná, ale zřejmě tomu tak není. Většinu orchidejí bychom v populační ekologii zařadili mezi S-stratégy. Vázány na příslušné mykorhizní houby a zpravidla na specifické podmínky biotopu, mohou osídlit pouze některé plochy. Ty v krajině zpravidla nejsou spojitě (pokud jsou, tak jen dočasně – př. mediteránní pastviny v době meziledové), což nejspíše přispívá k prudké speciaci (např. Devey et al., 2008;



obrázek 1.1. – semeno *Dactylorhiza majalis*. Autofluorescence excitovaná UV světlem. Foto autor.

Pillon et al., 2007). K osídlení podobných ploch je třeba vytvářet velká množství dobře se šířících semen. Výživa semenáčků mykorhizou umožňuje vytvářet menší semena bez zásobních látek (a tedy za stejnou cenu více takových semen), ale zpětně zvyšuje tlak na tvorbu velkého množství semen, protože semeno na vhodném stanovišti musí navíc ve správný čas navázat mykorhizu se správnou houbou, což ještě více fragmentuje distribuci vhodných stanovišť v krajině.

Rané fáze vývoje semenáčků většiny orchidejí jsou na výživě mykorhizou zcela závislé a bez nadsázky lze tento vztah označit za parazitismus rostliny na houbě. Mnohé orchideje v pozdějších fázích začínají fotosyntetizovat a mykorhizní vztah již není jednostraným parazitismem. Některé schopnost fotosyntetizovat ztratily a po celý životní cyklus na houbách parazitují. Tento fenomén vznikl v čeledi vstavačovitě mnohokrát nezávisle a existuje nespočet přechodných forem od obligátních mykotrofů až po druhy, které mohou celý svůj životní cyklus prodělat bez navázání mykorhizy (př. *Disa*, sect. *Disa*; Wodrich, 1997). U fotosyntetizujících, ale na mykorhize přesto závislých druhů jsou dokonce známy případy nezelených mutantů kvetoucích v přirozených populacích normálních rostlin (př. některé kruštíky – *Epipactis*) (Gryndler et al., 2004; Pridgeon et al., 1999).

1.3.2.1. Osemení

Buňky osemení jsou ve zralých semenech orchidejí tvořeny pouze buněčnými stěnami bez vnitřního obsahu. Jeho ztráta je zřejmě jedním z posledních kroků při dozrávání semen (Ziegler, 1981). Buněčné stěny bývají sekundárně vyztuženy.

První soubornou práci zabývající se strukturou osemení publikoval Beer (1863) a jeho kresby jsou dodnes přetiskovány do nejrůznějších publikací. V poslední době bylo věnováno jisté úsilí charakterizaci struktur osemení spolu s využitím těchto poznatků ke klasifikaci orchidejí (Chase et Hills, 1992; Chase et Phippen, 1988; Molvray et Kores, 1995; Ziegler, 1981; zajímavé shrnutí v práci Dresslera, 1993). Význam osemení pro semena spočívá v jejich uchování a klíčení. Hlavní předpokládanou rolí je ochrana vlastního embrya. Bariéra z vyztužených odumřelých buněčných stěn by mohla být efektivní ochranou. Velké, vzduchem vyplněné osemení dále umožňuje jemným semenům šíření vzduchem (Arditti et Ghani, 2000; Burgeff, 1936; Karasawa et Saito, 1982; Murren et Ellison, 1998) a vytváří vzduchový polštář umožňující semenu transport vodou (Arditti et Ghani, 2000; Carey, 1998; Murren et Ellison, 1998). Spíše výjimečná se jeví ochrana proti trávení při endozoochorii (Nakamura et Hamada, 1978; diskutováno v Arditti et Ghani, 2000).

Osemení je zpravidla obtížně prostupné pro vodu, a může zamezením jejího přístupu k embryu bránit předčasnému klíčení semen v nepříznivých podmínkách.

V přirozených podmínkách by k narušení osemení mohly významně přispívat mykorhizní houby. Svými enzymy by mohly rozkládat buněčné stěny osemení a po navázání mykorhizy zárodek přímo zásobovat vodou (Baláž, 2001; Gryndler et al., 2004). Je sice pravděpodobné, že se uvedený mechanismus v některých případech uplatňuje, ale prokázat se jej dosud nepodařilo a u řady druhů zřejmě není nezbytný. Semena mnoha orchidejí klíčí v asymbiotických kulturách *in vitro* snadno bez hub a některé obtížně klíčící druhy lze přimět ke klíčení pouhou stratifikací semen. Semenům většiny druhů orchidejí je však třeba pro úspěšné klíčení narušit osemení. Zda k němu v přirozených podmínkách dochází vlivem mykorhizní houby, jiných organismů či abiotických vlivů (změny teploty, mrznutí vody, dlouhodobé smáčení) povětšinou není známo.

Většina informací o problematice narušení osemení byla získána asymbiotickými výsevy *in vitro*. Semena se pro tyto účely ošetřují různými desinfekčními roztoky. Ty mají vydesinfikovat materiál pro založení aseptických kultur a narušit semena

pro umožnění následného klíčení. Narušení semen se může odehrávat na dvou úrovních: umožněním přístupu vody k vlastnímu zárodku narušením osemení, a degradací látek inhibujících klíčení (shrnuto např. v Rasmussen, 1995). Nejspíše se v různé míře uplatňují oba mechanismy.

Hypotézu degradace inhibičních látek podporuje například zjištění vyššího obsahu kyseliny abscisové (ABA) v semenech obtížně klíčícího druhu *Epipactis helleborine* než snáze klíčícího *Dactylorhiza maculata* (Van der Kinderen, 1987). Pokud byla semena *Dactylorhiza maculata* vystavena dvouhodinovému působení chlornanu, endogenní hladina ABA poklesla pod detekovatelnou úroveň (Van Waes, 1984). Aplikace ABA navíc inhibovala klíčení těchto semen a mohla by tedy být alespoň částečně odpovědná za jejich dormanci (Van Waes, 1984).

Hypotézu narušení osemení podporuje například minimální účinek peroxidu vodíku a ethanolu na stimulaci klíčení v porovnání s chlornany. Působení jiné silné báze (NaOH) je však účinné (Eiberg, 1970). Zřejmě tu tedy není podstatný oxidativní účinek chlornanů, ale zásaditá reakce jejich roztoku (Rasmussen, 1995). Zajímavý je také vztah doby ošetření chlornanem k množství vyklíčených semen. Zatímco zprvu s prodlužující se dobou působení počet klíčících semen stoupá, po dosažení určitého maxima začne poměrně rychle klesat. Předpokládá se, že dochází k postupnému pronikání roztoku semenem a jeho následný přímý kontakt s embryem je letální (př. Lindén, 1980; Van Waes, 1984; Rasmussen, 1992). Steele (1996) však poukazuje na světlání embryí některých semen během desinfekce a domnívá se, že ke kontaktu roztoku s embryem dochází a škodlivý je až po delší době. Předpoklad narušení osemení dále podporuje zjištění, že semena některých orchidejí, která po standardním ošetření chlornanem neklíčí, klíčila po ošetření kyselinou sírovou (Malmgren, 1993). Určitého zvýšení počtu klíčících semen bylo také dosaženo jejich ošetřením enzymy degradujícími buněčné stěny (Lindén, 1992). Pozitivní vliv mělo dále úplné odstranění osemení (Butcher et Marlow, 1989), nebo jeho narušení ultrazvukem (Miyoshi et Mii, 1987). Zdá se tedy, že propustnost osemení má na regulaci klíčení semen orchidejí významný vliv.

Na jiný možný účinek osemení poukazuje pozorování semen terestrických orchidejí rodu *Sobralia* (Prutsch et al., 2000). V osemení má tento rod kromě běžných buněk také část tvořenou zvláštními tracheoidálními buňkami. Jejich buněčné stěny reagují na vodu, což vede ke změně tvaru celé této části osemení. V suchu jsou tracheoidální buňky semknuty a celá oblast zkroucená, takže znemožňuje průnik vody dovnitř semene k vlastnímu zárodku. Po určité době máčení ve vodě se tracheoidální buňky napřímí,

příslušná část osemení se narovná a vznikne trubička propouštějící vodu k zárodku. Význam tohoto mechanismu může spočívat v omezení ztrát vody ze zárodku v suchém prostředí a zabránění klíčení semene vlivem slabého a krátkého navlhnutí (Prutsch et al., 2000).

Podobné buňky byly pozorovány také u epifytické orchideje *Chiloschista lunifera*. Po namočení se rychle rozmotají a zřejmě tím přispívají k lepšímu uchycení semene na kůru (Barthlott et Ziegler, 1980). Podle literárních údajů u dalších orchidejí podobné mechanismy nejsou známy a bývají prezentovány jako zvláštnost. Podobně organizované tracheoidální buňky se mi však podařilo identifikovat též v semenech několika dalších nepříbuzných druhů orchidejí a nelze tak vyloučit obecnější rozšíření tohoto mechanismu (Ponert, nepublikováno).

1.3.2.2. Embryo

V embryu zralých semen lze mnohdy odlišit různé typy buněk, především epidermis (*de facto* protoderm), a vnitřní buňky (*de facto* centrální meristém) (Burgeff, 1936; Manning et Van Staden, 1987; Ramsbottom, 1929; Rasmussen, 1990). Embryo v semeni tedy má ustavenou polaritu. U některých druhů se buňky pólu suspenzoru mírně liší velikostí od buněk pólu chalázy (Ramsbottom, 1929; Rasmussen, 1990). U mnohých druhů lze navíc pozorovat rozdíly v uložení zásobních látek a struktuře epidermálních buněk i vnitřních buněk protokormu (Harrison, 1977; Manning et Van Staden, 1987; Rasmussen 1990).

Při klíčení semen dochází nejprve ke zvětšování embrya. Nejprve jde pouze o zvětšování buněk a teprve později nastává též buněčné dělení, jak ukázala Rasmussenová (1990) na *Dactylorhiza majalis*. Více informací však chybí a nelze tedy říci, zda je tomu tak i u ostatních orchidejí.

Posléze zvětšující se embryo protrhne osemení. V této fázi je buněčné dělení již zjevné a u mnohých druhů záhy počíná rostoucí protokorm diferencovat základy orgánů. Nejprve se vytvářejí vlásky – struktury svou stavbou odpovídající vláskům kořenovým, rostoucí přímo z protokormu (útvary vzniklého dělením zygoty bez jakékoliv výrazné diference). Jakým českým termínem označovat tyto struktury není jasné, v anglicky psané literatuře se běžně používá označení „rhizoids“. Zde bude použito označení vlásky.

Dále se na protokormu diferencuje pól menších, dělicích se buněk, které dávají vznik meristému. Z něj následně vyrůstá prýt, tvoří zpravidla nejprve nadzemní orgány – listy,

a druhotně na bázi též adventivní kořeny a u hlíznatých druhů stolon s první hlízou. Tento meristemický pól se vzhledem k proximodistální ose určené v embryu v semeni zřejmě zakládá distálně vůči pólu suspensoru, jak ukázali Raghavan a Goh (1994) u *Spathoglottis plicata*, má orientační pozorování *Dactylorhiza majalis* (Ponert, nepublikováno) a rozsáhlejší pozorování Burgeffa (1936). Pól suspensoru zřejmě dává vznik mykotrofnímu pletivu (viz kapitola 1.4.) a pól chalázy meristému (Burgeff 1936; Rasmussen, 1990). Houba vrůstá do embrya směrovaně od pólu suspensoru (Williamson et Hadley, 1970). Pozorování je však málo a na velmi malém vzorku druhů a nelze je tedy zobecnit pro všechny orchideje.

Uvedené schéma může mít různé odlišnosti. Tropické druhy podčeledi *Epidendroideae* často tvoří jakési shluky protokormů a snadno tvoří na protokormech další „protokormy“ – v literatuře označované jako „*protocorm-like bodies*“, PLBs. Stejně se označují totožné útvary vzniklé somatickou embryogenezí z nejrůznějších rostlinných pletiv. Český název těmto útvarům dosud přisouzen nebyl. V dalším textu tedy budu k jejich označení používat mezinárodní zkratku PLBs.

Jiné taxony, opět především podčeledi *Epidendroideae*, diferencují adventivní kořeny přímo z pletiva protokormu, který již dříve na jiném místě založil prýt (Burgeff, 1911). Odlišný vývoj orgánů z protokormu vykazují také mnohé oddenkaté druhy. Oddenek vytvářejí buď přímo volným pokračováním z nejprve se jen výrazněji prodlužujícího protokormu, nebo jako útvar zjevně oddělený od protokormu, zakládající se podobně jako hlíza.

Jednou z prvních histologických změn embrya, k nimž při klíčení dochází, je příprava na mykorhizu. Vnitřní buňky pólu suspensoru zvětšují objem vakuol a prochází několika endoreduplikačními cykly aniž by nastalo vlastní buněčné dělení (Alvarez, 1968; Nagl, 1972; Rasmussen, 1990; Williamson et Hadley, 1969). Podobné změny jsou zřejmě obecnou vlastností pletiv určených pro následnou kolonizaci mykorhizní houbou (Rasmussen, 1995). K infekci klíčících semen mykorhizní houbou může docházet dříve než dojde k jakémukoliv buněčnému dělení (*Dactylorhiza majalis*; Rasmussen, 1990) a příprava na mykorhizu je zřejmě skutečně prvním potřebným krokem při klíčení alespoň tohoto druhu. K endoreduplikaci dochází také v epidermálních buňkách, které se stanou vlásky protokormů (Rasmussen, 1990). Vlázky však mohou být místem průniku mykorhizní houby do rostliny a je možné, že se nějakým způsobem aktivně účastní její atrakce. K endoreduplikaci vnitřních buněk

protokormů dochází též v absenci mykorhizní houby v asymbiotických kulturách *in vitro* (Alvarez, 1968; Nagl, 1972), nicméně může být zpětně ovlivněna skutečným vznikem mykorhizy. Míra ploidie, které buňky klíčících protokormů *Dactylorhiza purpurella* dosáhly v symbiotických kulturách, byla vyšší, než v kulturách asymbiotických. Zatímco nemykorhizní semenáčky dosahovaly hodnot 16C ve vláskách a 64C v kortikálních buňkách, mykorhizní až 32C ve vláskách a 128C v kortikálních buňkách (Williamson et Hadley, 1969). Ve stejné studii však jiný druh, *Dactylorhiza majalis*, dosahoval v symbiotických kulturách pouze 64C. Konkrétní hodnoty jsou závislé na jednotlivých druzích a ani celý proces endoreduplikace nelze vzhledem k malému zkoumanému vzorku zcela zobecnit.

1.3.3. Výživa raných fází semenáčků

Semenáčky většiny orchidejí jsou alespoň ve svých raných fázích závislé na externím zdroji energie. Na médiích bez přidaných cukrů nejsou schopny vyrůst v rostliny s diferencovanými orgány a zůstávají v raných stádiích po vyklíčení (Knudson, 1921; Knudson, 1924; LaGarde, 1929; Leroux et al., 1995). I mladé semenáčky tropických *Epipedendroideae*, které jsou od raných fází zelené, nejspíše vyžadují v nejranějších fázích svého vývoje zásobování živinami, jak ukázali u *Cattleya aurantiaca* Harrison et Arditti (1978). Na médiu bez přidané sacharózy byly semenáčky schopny růst pouze v případě, kdy byly předpěstovány na médiu se sacharózou po dobu minimálně 21 – 30 dnů. Fotosyntetická aktivita navíc nesouvisela s obsahem chlorofylu, který byl v protokormech přítomen již výrazně dříve (Harrison et Arditti, 1978).

Neschopnost růstu protokormů různých orchidejí bez dodání sacharidů i na světle, kdy tyto zelenají, uvádí též Knudson (1924) a předpokládá, že protokormy orchidejí jsou závislé na dodávce externích sacharidů až do vytvoření listu. Existují však druhy, schopné vyrůst v dospělé rostliny při klasickém výsevu semen na povrch stále vlhké rašeliny (*Disa*, sect. *Disa*; př. Wodrich, 1997) nebo výsevniho substrátu či vaty (*Bletilla striata*; Ponert, nepublikováno), kde zřejmě nedojde k navázání mykorhizy. V rámci orchidejí jsou spíše výjimkou.

Pokud u druhů závislých na externím zdroji sacharidů tento není dostupný, mohou přežít i poměrně dlouhou dobu bez růstu, jak ukázala například pozorování semenáčků *Godyera pubescens*. Semenáčky, které nezapočaly růst, hynuly až 36 týdnů po výsevu (Rasmussen et Whigham, 1993).

Pro pochopení této problematiky se v následujících kapitolách zaměřím na zásobní látky v semenech, výživu semenáčků při klíčení a nakonec využitelnost různých sacharidů semenáčky. Sacharidy jsou z látek dodávaných mykorrhizou nejlépe prostudované a zaslouží si samostatné pojednání.

1.3.3.1. Zásoby v semenech

Hlavními zásobními látkami v embryích semen jsou zřejmě proteiny a lipidy (Rasmussen, 1990). U většiny druhů lze pozorovat proteinová tělíska v buňkách embryí. Kromě těchto látek detekovatelných snadno histologicky byly v semenech vybraných jihoafrických orchidejí zjištěny rozpustné sacharidy, především sacharóza a manóza (Manning et Van Staden, 1987). Naproti tomu naprostá většina orchidejí nemá v semenech zásoby škrobu (Carlson, 1940; Harrison, 1977; Harvais, 1974; Knudson, 1929; Manning et Van Staden, 1987; Nakamura, 1964; Rasmussen, 1990 a Richardson et al., 1992). Spíše výjimečné se jeví taxony vytvářející zásoby škrobu – *Bletilla striata* (Shun-xing et Jin-tang, 1990) a *Cymbidium ensifolium* (Mei-Sheng et al., 1985). Pro *Calypso bulbosa* je škrob spolu s lipidy dokonce hlavními zásobními látkami v semenech (Yeung et Law, 1992).

1.3.3.2. Výživa během klíčení

Při klíčení zřejmě nastává nejprve hydrolýza proteinových tělísek pozorovatelná již během imbibice semen (Harrison, 1977; Manning et Van Staden, 1987; Rasmussen, 1990). U *Dactylorhiza majalis* je pozorovatelná již po deseti dnech kultivace. Počíná v buňkách pólu suspensoru a následně pokračuje během jednoho až dvou dnů k pólu chalázy (Rasmussen, 1990). Následně přichází na řadu mobilizace lipidických zásob. Zatímco k hydrolýze proteinů je zřejmě potřebné pouze navlhčení semen (imbibice), ke štěpení lipidických zásob je třeba větší aktivita buněk a dochází k ní až v souvislosti s dalšími fázemi klíčení (Manning et Van Staden, 1987). Na počátku klíčení v semenech nejsou zjevné glyoxysómy (Harrison, 1977; Manning et Van Staden, 1987). Objevují se až v závislosti na dodávce externích zdrojů energie, sacharidů. Přidání sacharózy může být pro jejich vznik klíčové, jak ukázali Manning et Van Staden (1987), kdy jimi zkoumaná semena tvořila glyoxysómy zhruba čtyři dny po dodání sacharózy. Bez přidání sacharózy k tvorbě glyoxysomů nedocházelo, lipidové kapénky pouze koagulovaly. Přidání sacharózy u jiných druhů nemusí být zcela klíčové, jak ukázal Harrison (1977; *Cattleya aurantiaca*), kdy lipolýza probíhala i bez sacharózy, pouze

pomaleji oproti variantě se sacharózou. Bez sacharózy docházelo ke spotřebě lipidických zásob během 65 dnů, se sacharózou během pouhých 27 dnů. Také nebyly pozorovatelné glyoxysómy, nicméně lipidická tělíska nápadně obalovala mitochondrie, což může naznačovat přímou respiraci produktů lipolýzy.

Plynulou spotřebu lipidických zásob u neklíčících semen po imbibici pozoroval též Harvais (1974; *Goodyera oblongifolia*). Zde se ukázalo zásadní ukládání škrobu během probíhající lipolýzy – docházelo k němu u klíčících semen, zatímco u neklíčících se škrobové zásoby netvořily. Ukládání škrobu u klíčících protokormů orchidejí by mohlo souviset s předpokládaným navázáním mykorhizy a případným zásobením cukry v asymbiotických kulturách (Rasmussen, 1995). Tuto hypotézu může podporovat pozorování Purves et Hadley (1976; *Goodyera repens*), kdy zjistili rozdíl v akumulaci škrobu u symbiotických a asymbiotických semenáčků. Asymbiotické semenáčky (na médiu se sacharózou) škrobu akumulovaly více a také rychleji rostly.

Zajímavé závěry uvádí Burgeff (1936). Uvádí, že druhy závislejší na mykorhize vyžadují externí zdroj energie pro mobilizaci vlastních zásob, zatímco méně specializované druhy mohou postupně využívat své rezervy bez externí dodávky sacharózy a produkovat i malé množství škrobu. Jak dalece byl jím zkoumaný vzorek taxonů reprezentativní, zůstává otázkou, nicméně dosud neznáme pozorování, jež by s tímto předpokladem bylo výrazně v rozporu.

Informace o schopnostech semenáčků orchidejí syntetizovat další organické látky prakticky chybí. Patrně část jejich metabolických drah není funkční. Naznačují to pozorování mnoha autorů, kdy média obsahující pouze minerální soli spolu s primárními produkty fotosyntézy nepostačují ke zdárnému vývoji semenáčků. Zpravidla je zřejmý požadavek na dodávání aminokyselin (Harvais et Raitsakas, 1975). Často jsou vyžadovány různé vitamíny a u některých druhů též nedefinované složky médií (shrnuto např. v Rasmussen, 1995). Co vše musí být jednotlivým druhům dodáváno zpravidla není známo. Na úvahy o funkcích jednotlivých metabolických drah semenáčků tedy ještě musíme počkat.

Lze uzavřít, že alespoň časné vývojové fáze semenáčků většiny orchidejí jsou závislé na externích zdrojích energie, v přírodních podmínkách nejspíše mykorhize. Potvrzuje to též skutečnost, že nebyly pozorovány nemykorhizní semenáčky v příslušných fázích jinde než mimo asymbiotické laboratorní kultury (Rasmussen, 1995).

1.3.3.3. Výživa semenáčků sacharidy

Bylo zmíněno, že semenáčky orchidejí nejsou schopny vyrůst bez dodávky externích sacharidů. Nyní se zaměřím na známé informace o využitelnosti jednotlivých sacharidů orchidejemi.

Obecně se uvádí, že orchideje jsou schopny využívat glukózu, fruktózu a jejich oligosacharidy (maltózu a sacharózu) (Ernst et al., 1971; Knudson, 1924; LaGarde, 1929). Orchideje by dle Knudsona (1924) neměly být schopné využívat laktózu, disacharid galaktózy a laktózy. Galaktóza samotná nejenže není využívána, ale může být dokonce toxická (Ernst, 1967; Ernst, 1971; Quednow, 1930; Wynd, 1933; tropické epifytické *Epidendroideae*).

Manitol, sacharid rostlinami obecně nevyužitelný, většina orchidejí také nevyužívá a může vykazovat i mírně toxický účinek (Purves et Hadley, 1976; Rasmussen, 1995; Smith, 1973; Van Waes, 1984).

Existují zajímavé výjimky, jak ukázal Nakamura (1982) u *Galeola septentrionalis*, nezelené orchideje závislé celý život na heterotrofní výživě mykorhizou, jejíž semenáčky manitol využívat umí. Transportéry polyolů schopné manitol transportovat orchideje neschopné jeho utilizace mít mohou. Ukazuje to pozorování, kdy listové řízky *Bletilla hyacinthina* (patrně dnešní *B. striata* – viz. př. Wu et al., 2009) aktivně přijímaly manitol a navíc ho akumulovaly ve vyšších koncentracích než v okolním roztoku (Smith et Smith, 1973). Obecně není známo, že by orchideje za fyziologických podmínek manitol obsahovaly. Lze pouze poukázat na výskyt manitolu v různých parazitických a symbiotických asociacích (Lewis et Smith, 1967; Smith et al., 1969).

Zajímavá je schopnost orchidejí využívat ke svému růstu trehalózu, jak ukázal Smith (1973) u semenáčků *Bletilla hyacinthina* (patrně dnešní *B. striata*) a *Dactylorhiza purpurella*; Ernst et al. (1971) u semenáčků hybridních *Phalaenopsis*, Purves et Hadley (1976) u semenáčků *Goodyera repens*, Jheng et al. (2006) u kalusů *Oncidium* a Liu et al. (2006) u PLBs *Phalaenopsis* a *Doritaenopsis*. V organogenních experimentech se trehalóza ukázala dokonce vhodnější než sacharóza (Jheng et al., 2006; Liu et al., 2006). Výsledky jsou podpořeny také experimentem s listovými řízkami *Bletilla hyacinthina* (patrně dnešní *B. striata*), kdy tyto metabolizovaly pouze glukózu i trehalózu, ale nikoliv mannitol (Smith et Smith, 1973). Na význam trehalózy pro výživu orchidejí poukazují také výsledky Watkinsona a Welbauma (2003) u *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens*. Jeden ze dvou genů, jehož exprese byla

výrazně ovlivněna vznikem mykorhizy kódoval trehalóza-6-fosfát syntázu. Jeho exprese (RT-PCR) byla výrazně snížena mykorhizní houbou i trehalózou.

Detailní studie byly učiněny u hybridů rodu *Phalaenopsis*. Ve studii Ernsta et al. (1971) byly na experimentální varianty médií přesazovány již vytvořené protokormy. Z testovaných monosacharidů dokázaly využívat glukózu i fruktózu, zatímco galaktóza byla zcela toxická. Z disacharidů úspěšně rostly na sacharóze, maltóze, celobióze, trehalóze, částečně využívaly i melibiózu a s velkými obtížemi laktózu. Pomaleji rostly na oligosacharidech rafinóze, melezitóze a stachyóze.

Zdá se, že oligosacharidy tvořené pouze glukózovými a fruktózovými zbytky jsou těmito orchidejemi dobře využitelné, zatímco disacharidy obsahující galaktózu nejsou optimální. Na melibióze i laktóze značná část protokormů vůbec nediferencovala další orgány a na laktóze dokonce vykazovaly zvýšenou mortalitu (15 %). Problémy s diferenciací pak vykazovaly též protokormy na rafinóze a stachyóze. Byla zjevná negativní závislost mezi podílem galaktózy a hmotnosti semenáček (růstu) či jejich schopnosti diferenciaci. Dle obsahů sacharidů v médiích autoři vyvozují, že sacharidy jsou štěpeny extracelulární invertázou (či sacharózasyntázou a případně dalšími systémy štěpicími vazbu α -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranosid). Tato vazba byla zřejmě štěpena i u melezitózy, protože médium obsahovalo turanózu a glukózu. V médiu s přidanou sacharózou byla detekovatelná glukóza i fruktóza v poměru 1,0:0,83. Nejspíše je po štěpení invertázou přednostně přijímána fruktóza. Také v této studii rostly protokormy lépe na médiu s fruktózou než na médiu s glukózou. Lepší růst některých orchidejí na fruktóze oproti glukóze byl u tropických *Epidendroideae* ostatně ukázán již v dřívějších pracích (Arditti, 1967; Burgeff, 1936; Ernst, 1967).

Zajímavá je dále analýza média s trehalózou. V přítomnosti semenáček obsahovalo navíc malé množství glukózy a semenáčky by tedy mohly být schopné trehalózu extracelulárně štěpit. Detekované množství bylo však dosti malé (vzhledem k hodnotám na médiu se sacharózou), zatímco vývoj semenáček byl dobrý. Autoři spekulují, že detekované množství glukózy nestačí pro růst semenáček a tyty tedy nejspíše přednostně přijímají přímo trehalózu (Ernst et al., 1971). V přirozených podmínkách budou závislé na příjmu sacharidů mykorhizou, protože uvedené metabolizovatelné sacharidy se v přirozených podmínkách okolo semenáček orchidejí nevyskytují a semenáčky nejsou schopny využívat extracelulárně polysacharidy jako škrob a celulózu. Zkoumané semenáčky *Phalaenopsis* nebyly schopné štěpit v médiu odpovídající vazby

disacharidů maltózy (1→4- α -D-glukosidická vazba jako v amylose) a celobiózy (1→4- β -D-glukosidická vazba jako v celulóze; Ernst et al., 1971).

Kromě rozpustných sacharidů, jež mohou být přenášeny z mykorrhizních hub, by orchideje mohly využívat také produkty trávení houbových hyf při degeneraci pelotonů (viz. kapitola 2.4.1.1.). Degenerace houbových hyf je standardní závěrečnou fází orchideoidní endomykorrhizy ve stravovacích buňkách, kde posléze zůstane jen malý kompartment obsahující zřejmě nestravitelné zbytky hub. Orchideje by tedy mohly být schopné hydrolýzy buněčných stěn hub a využití vzniklých produktů. V případě basidiomycet lze předpokládat vznik především tří produktů: manózy, glukózy a N-acetylglukosaminu (Rasmussen, 1995). Manózu i glukózu orchideje zřejmě využívají mohou (*Phalaenopsis* hybr.; Ernst et al., 1970 a *Cymbidium* sp.; Fannesbech, 1972b), zatímco N-acetylglukosamin ne (Harvais et Raitsakas, 1975).

1.4. Mykorrhiza

Mykorrhiza je patrně nejrozšířenějším typem symbiomy vyšších rostlin a jiných organismů. Častá je též symbiomy mezi kořeny rostlin a bakteriemi, dle současných znalostí je však mykorrhiza častější. Mykorrhizy se účastní asi 90 % druhů vyšších rostlin (Selosse et Le Tacon, 1998). Relativně podobné jsou asociace řas s houbami – formou lišejníků a méně známou mykofykobiózou. Mykofykobiózy jsou specifické soužití některých makroskopických řas přílivových zón s houbami třídy *Ascomycetes*. Vyskytuje se u různých taxonů těchto řas a vzniká nejspíše opakovaně jako přizpůsobení k osychání v přílivových zónách (př. Garbay et London, 1995; Garbay et MacDonald, 1995; Selosse et Le Tacon, 1998). Tento příklad bývá diskutován v souvislosti s možným významem symbiomy mezi rostlinami a houbami pro prvotní kolonizaci souše živými organismy. Je možné, že kolonizace souše byla umožněna až mykorrhizním rostlinám, které sekundárně tuto schopnost soužití s houbami ztratily (Gryndler, 1992; Simon et al., 1993).

V rámci skupiny recentních vyšších rostlin rozeznáváme několik typů mykorrhiz. Lze je rozdělit na ektomykorrhizy, kde je výskyt houbových hyf omezen na intercelulární prostory rostlinných pletiv; a endomykorrhizy, kde hyfy pronikají přímo do vnitřního prostoru rostlinných buněk. Endomykorrhizy se dle své struktury člení na tři základní typy: arbuskulární mykorrhizní symbiomy, erikoidní mykorrhizní symbiomy a orchideoidní

mykorhizní symbiózu. Členění na endomykorhizní a ektomykorhizní typy je umělé a houbové hyfy v některých případech pronikají pouze do buněk kořenové pokožky či kůry.

Rozeznáváme tedy další tři další typy mykorhiz, jež v rámci tohoto členění stojí na pomezí: arbutoidní mykorhizní symbiózu, monotropoidní mykorhizní symbiózu a obecně pojatou ektendomykorhizní symbiózu. Některými autory jsou však i tyto typy hodnoceny jako endomykorhizy (Gryndler et al., 2004).

Orchideje vytvářejí jako jediné známé rostliny orchideoidní mykorhizní symbiózu. V rámci ostatních typů mykorhiz má tato zvláštní postavení, způsobené výraznou závislostí zúčastněných rostlin na houbách. Raná vývojová stadia takřka všech orchidejí jsou na této mykorhize zcela závislá a některé orchideje zůstávají obligátně mykotrofní po celý svůj život (asi 160 druhů; Leake, 1994). Zajímavým extrémem je australská *Rhizanthella gardneri* prodávající celý svůj životní cyklus pod zemí (Bougoure et al., 2008). Takto silnou závislost vyšších rostlin na houbách známe dále v několika případech u čeledi dvouděložných rostlin *Burmanniaceae*, *Corsiaceae*, *Ericaceae* (*Monotropoideae*, *Pyroloideae*), *Gentianaceae*, *Polygalaceae* a řádů jednoděložných *Orchidales* a *Triuridales* (Leake, 1994). Z uvedených případů je lépe prozkoumaná pouze monotropoidní mykorhiza specifická pro rostliny podčeledi *Monotropoideae* (v dnešním pojetí v rámci čeledi *Ericaceae*) často specificky vázané na konkrétní druhy hub (Bidartondo et Bruns, 2001; Bidartondo et Bruns 2002; Bidartondo et Bruns, 2005). Orchideje v současnosti dosáhly mnohem většího rozšíření než tyto rostliny. Zatímco všichni známí zástupci podčeledi *Monotropoideae* jsou rostliny terestrické, vázané na lesní ekosystémy, orchideje mohou být kromě terestritů také epifyty či litofyty a rostou na nejrůznějších stanovištích. Také spektrum využívaných hub se zdá být větší a specifita mnohých druhů orchidejí výrazně menší. Orchideoidní mykorhiza skýtá širší spektrum různých situací, jež mohou usnadnit pochopení vztahů mezi houbou a rostlinou.

Studium orchideoidní mykorhizy může být zajímavé i z dalšího hlediska. Míra závislosti orchidejí na mykorhize je různá. U většiny druhů se mění během ontogeneze – často z obligátní mykotrofie raných stadií po jen částečnou (a nikoli nezbytnou) mykotrofii dospělých rostlin. Navíc se liší míra závislosti na mykorhize i u příbuzných druhů. Například obligátně mykotrofní rod *Neottia* (hlísník) se ukázal být společný rodu *Listera* (bradáček), jehož někteří zástupci jsou v dospělosti minimálně (a možná i vůbec – př. Procházka et Velíšek, 1983; diskutováno v Gryndler et al., 2004, str. 82)

závislí na mykorhize (viz Delforge, 2006). Pozorování takovýchto případů skýtá u jiných rostlin nevídanou možnost srovnání různých strategií dle různé míry mykorhizní symbiózy.

Pro účely této práce se spokojím s tímto stručným úvodem do světa mykorhizních symbióz. Zájemce o lepší orientaci v problematice bych odkázal na bohatou literaturu, například zdařilou publikaci Gryndlera et al. (2004).

1.4.1. Orchideoidní mykorhiza

Orchideoidní mykorhiza je specifická pro jedinou čeleď rostlin a může se tedy vůči jiným typům mykorhizních asociací jevit jako okrajová. Pokud však vezmeme v potaz množství druhů, zjistíme, že je tento typ vlastní desetině vyšších rostlin světa (Rasmussen et Rasmussen, 2009). Uvážíme-li navíc rozšíření orchidejí, staneme před typem mykorhizy rozšířeným takřka po celém povrchu souše, kde je možný růst vyšších rostlin.

Přesto zůstává řada otázek orchideoidní mykorhizní symbiózy dodnes nezodpovězena. Není jasné, zda se v přirozených podmínkách mohou vyskytovat orchideje bez mykorhizy. Často bývá uváděna schopnost některých druhů růst v umělé kultuře v dospělosti bez mykorhizy a výjimečně bez ní dokonce i vyrůst ze semen. Alespoň druhá možnost se však jeví coby okrajová. Otázka mykotrofie dospělých rostlin však zůstává.

Z kultivací dospělých rostlin je evidentní, že mnohé orchideje mohou růst na minerálních substrátech zcela bez mykorhizní houby, často i ošetřované nejrůznějšími systémovými fungicidy. Dobře známá je tato praxe u mnoha tropických epifytů a v poslední době také u řady geofytních terestritů mírných pásů. Zda jsou však v těchto podmínkách rostliny skutečně bez mykorhiz není potvrzeno. Naopak pozorování mnoha orchidejí v kultuře i přírodě ukazují na přítomnost mykorhizních hub v kořenech (př. Baláž, 2001, Bermudes et Benzing, 1989; Hadley et Williamson, 1972; Pereira et al., 2003; Rasmussen et Whigham, 2002; Wahrlich 1886). Aplikace fungicidů byla využita též s cílem přípravy nemykorhizních rostlin pro experimentální účely (Alexander et al., 1984; Alexander et Hadley, 1984; Alexander et Hadley, 1985). Aplikace thiabendazolu sice houbu *Rhizoctonia goodyerae-repentis* u orchideje *Goodyera repens* výrazně omezila, ale nevedla k její úplné eliminaci. Podobně v rozsáhlých experimentech laboratoře Dr. Milana Baláže s aplikací různých fungicidů na terestrické orchideje se ukázalo prakticky nemožné získat z dospělých mykorhizních

orchidejí zcela nemykorhizní rostliny, ale jen rostliny s potlačenou mykorhizou, tzv. semimykorhizní (Baláž, pers. com.; Trojanová, 2008). Úplné eliminace mykorhizních hub se aplikací fungicidů zřejmě nepodařilo dosáhnout ani u málo mykorhizní lithofytické orchideje *Lepanthes rupestris* (Bayman et al., 2002).

Možnost existence orchidejí bez mykorhiz v přirozených podmínkách tak nadále zůstává zahalena tajemstvím.

1.4.1.1. Morfologie orchideoidní mykorhizní symbiózy

Byly popsány dva odlišné typy orchideoidní mykorhizní symbiózy – tolypofágní a ptyofágní. Naprostá většina zkoumaných orchidejí vytváří tolypofágní formu a jen malá část ptyofágní.

Ptyofágní forma byla odlišena na základě pozorování mykorhiz rodu *Gastrodia* (Burgeff, 1932; Burgeff, 1936; Kusano, 1911). V blízkosti kořene vznikají svazky houbových hyf, tzv. rhizomorfy, z nichž poté jednotlivé hyfy pronikají do buněk primární kůry, kde jsou tráveny. Povrchovými vrstvami buněk zpravidla pouze prorůstají a tráveny jsou až v hlouběji uložených parenchymatických buňkách. Hyfa tu svým růstem vchlipuje plazmatickou membránu. Rostlinná membrána se v tomto případě nazývá perifungální, a prostor mezi ní a hyfou prostorem mezilehlým. Následuje zjevná exocytóza rostlinných váčků do mezilehlého prostoru. Po natrávení hyfy se z perifungální membrány odškrucují měchýřky putující do nitra rostlinné buňky. Nestrávené zbytky hyf v buňkách zůstávají v podobě shluků váčků (Burgeff, 1932; Burgeff 1936; Wang et al., 1997).

Tolypofágní forma je klasickou formou orchideoidní mykorhizy rozšířenou u naprosté většiny orchidejí. Hyfy vrůstají do kořene skrze pokožkové buňky nebo vlásky (Peterson et Farquahar, 1994). Jejich trávení opět nastává v parenchymatických buňkách primární kůry. Nejblíže povrchu lze mnohdy odlišit vrstvy průchozích buněk, kterými houbové hyfy pouze prorůstají. Hlouběji se nachází buňky hostitelské, v nichž hyfy vytvářejí specifické smotky, a buňky stravovací, v nichž dochází k vlastnímu trávení hyf. Nejnižší leží buňky zásobní, do nichž již houba neprorůstá. Obsahují škrobová zrna a nejspíše jsou zodpovědné za metabolismus látek získaných mykorhizou. Dle dosavadních pozorování houba nikdy neprorůstá do endodermis (viz. Gryndler et al., 2004).

Ve stravovacích buňkách vytvářejí houbové hyfy smotky zvané též klubíčka či pelotony. Jedná se o nahloučené houbové hyfy obalené perifungální membránou.

Nejprve se v buňce houbové hyfy počínají větvit a vytvářet klubička. Po maximálním rozvoji tato klubička počínají degenerovat. Hyfy se zplošťují, shlukují a následně celý smotek ztrácí strukturu. Ve stravovacích buňkách po něm zůstane jen malý shluk hmoty obalený rostlinnou membránou. Předpokládá se, že obsahuje nestravitelné zbytky houbových buněčných stěn. I v této formě orchideoidní mykorhizy se zřejmě uplatňuje transport váčky (Barroso et Pais, 1987). K diferenciaci rostlinného pletiva na periferní hostitelské buňky, kde nedochází k vlastnímu stravování hyf, a centrálněji umístěnou vrstvu stravovacích buněk, kde probíhá vlastní degenerace houbových hyf, dochází již u protokormů (Burgeff, 1936; Hadley, 1975).

Prorůstání hyf bývá označováno za symplastické (př. Gryndler et al., 2004), nicméně i zde jsou tyto ohraničeny perifungální membránou původem v membráně plazmatické (Hadley et al., 1971; Nieuwdorp 1972; Peterson et al., 1998).

Domnívám se, že v kontextu současného pojetí apoplastu a symplastu není tato klasifikace vycházející z jednoduchých mikroskopických pozorování správná a jedná se o prostor svojí povahou apoplastický. Diskutabilní je také uvažované prorůstání hyf plazmodezmy založené na mikroskopických pozorováních ukazujících zaškrcení houbové hyfy v místě průchodu rostlinnou stěnou (viz Gryndler et al., 2004).

V dalším textu se bude pod pojmem orchideoidní mykorhizní symbióza mluvit o tolypofágní mykorhizní symbióze, neboť orchideje vytvářející ptyofágní formu jsou z dnešního pohledu spíše výjimkou a nejsou předmětem této práce.

1.4.1.2. Regulace vývoje orchideoidních mykorhiz

Dodnes bývá uváděna možnost, že degenerace pelotonů není způsobena aktivitou rostlinných buněk, nýbrž je pouhým důsledkem autolýzy hyf samotných. Tuto možnost sice zcela vyloučit nelze, nicméně již starší experimenty s extrakty z různých částí orchidejí (především hlíz, jež bývají prosty hub) ukazují, že orchideje mají látky účinně houby omezující. Extrakty přidané ke kulturám orchideoidních mykorhizních hub inhibovaly jejich růst a vedly až ke scvrkávání a zřejmě plazmolýze jejich obsahu (Bernard, 1911; Burges, 1939; Magrou, 1924). Řada fungicidních látek byla z různých orchidejí také izolována. K nejznámějším patří hydroxyderiváty 9,10-dihydrofenanthrenu nazvané hircinol a orchinol izolované ze dvou rodů (*Himantoglossum*, *Orchis*) orchidejí podčeledi *Orchidoideae* (Gäumann et al., 1960; Gäumann et Kern, 1959; Fish et al., 1973; Fritzeimer et Kindl, 1983). Po vystavení

příslušných orchidejí houbám produkce těchto látek výrazně stoupá (Gehlert et Kindl, 1991; Reinecke et Kindl, 1994).

Druhou významnou skupinou fungicidních látek orchidejí jsou manosa-vážíci proteiny (lektiny) izolované nejvíce z nezelené orchideje *Gastrodia elata* (Hu et al., 1988; Wang et al., 2001; Xu et al., 1998) ale také některých dalších druhů podčeledi *Epidendroideae* tvořících klasické tolypofágní mykorhizy (Sudmoon et al., 2008; Van Damme et al., 1994). Jejich exprese je také ovlivněna přítomností hub (Sa et al., 2003) a nejspíše se skutečně uplatňují v omezování houbové infekce rostlinou (Hu et Huang, 1994). Exprese genů těchto proteinů v jiných rostlinách výrazně zvyšuje jejich odolnost k mnoha i zcela nepříbuzným patogenům, jak ukázaly studie transgenního tabáku *Nicotiana tabacum* (Cox et al., 2006) a švestky *Prunus domestica* (Nagel et al., 2008).

S výskytem fungicidních látek by mohlo souviset využití zmíněných orchidejí v tradiční medicíně. Hlízy rodů *Orchis* i *Himantoglossum* byly (a v některých částech světa dodnes jsou - Sezik, 2005) sbírány především jako surovina pro tvorbu salepu (Birger, 1907; Horáková, 1950). *Gastrodia elata* je pak pod jménem Tian Ma hojně využívána v tradiční čínské medicíně (př.: Xu et al., 1998). Výskyt fungicidních látek v orchidejích by mohl částečně vysvětlit účinky jim přisuzované.

Na schopnost orchidejí účinně kontrolovat rozvoj hub ve svých pletivech poukazuje také fakt, že některé houby tvořící klasické orchideoidní mykorhizy jsou pro ostatní rostliny patogenní (Downie, 1957; Hadley, 1963; Harvais et Hadley, 1967; Williamson et Hadley, 1970).

Na druhou stranu zřejmě degenerace pelotonů není jedinou fází jejich vývoje, kdy dochází k přenosu látek z houby do orchideje. Studie mykorhizní kolonizace při klíčení *Dactylorhiza purpurella* ukázala, že ke stimulaci růstu protokormů mykorhizní houbou došlo ještě před degenerací prvních pelotonů (Hadley et Williamson, 1971). Vzhledem k malému množství zásob v semenech se předpokládá, že k přenosu látek dochází již ve fázi aktivně rostoucích pelotonů. Degenerace pelotonů by nemusela být projevem vlastního trávení hub, ale nutnou obranou proti agresivním mykorhizním houbám.

1.4.1.3. Tok látek v orchideoidní mykorhizní symbióze

O přenosu látek v orchideoidní mykorhizní symbióze máme stále neúplné informace. Předpokládá se, že tok látek mezi houbou a rostlinou může být v různé míře oboustranný. Od extrému, kdy orchidej parazituje na houbě až po opačnou situaci houby parazitující na orchideji (př. Gryndler et al., 2004). Pro ryzí parazitismus

mykorhizních hub na orchidejích prostřednictvím funkčních orchideoidních mykorhiz chybí důkazy. Nepovažujeme-li za něj případy, kdy se růst mykorhizní houby vymkne kontrole a orchidej zahubí, lze ho nejvýše předpokládat.

Zatímco orchideoidní mykorhizní houby mohou zdárně růst i bez orchidejí, orchideje jsou alespoň ve svých raných stádiích na houbách závislé. Stěžejní se tedy zdá tok látek z houby do orchideje.

První otázkou je získávání potřebných látek houbou. Mykorhizní houby jednak produkují lytické enzymy s jejichž pomocí mohou rozkládat různé organické látky v půdě a přijímat je ve formě rozpustných látek (Hadley, 1969; Hadley et Perombelon, 1963; Marchisio et al., 1985; Midgley et al., 2006; Smith 1966). Z půdního roztoku dále přijímají minerální látky. Je také možné, že rozkladem organických látek mohou získávat vodu ze suchého substrátu. Houby mohou vytvářet asociace s dalšími organismy a část látek získávat od nich. Známé je napojení některých orchideoidních mykorhizních hub na okolní dřeviny formou ektomykorhiz (Girlanda et al., 2006; McKendrick et al., 2000a; Ogura-Tsujita et Yukawa, 2008; Selosse et al., 2002; Taylor et Bruns, 1997; Taylor et Bruns, 1999; Warcup, 1985; Warcup, 1988; Zelmer et Currah, 1995). Možným se jeví přenos látek z asimilujících dřevin do orchidejí prostřednictvím hub (tzn. epiparazitismus orchidejí). Tento tok uhlíkatých látek byl skutečně prokázán u *Corallorhiza trifida* (McKendrick et al., 2000b) a je obecně prisuzován řadě nezelených orchidejí. U lesních terestrických orchidejí se zřejmě jedná o obecněji rozšířený fenomén, jak naznačuje pozorování Bidartonda et al. (2004), ukazující tento přenos látek i u vybraných lesních fotosyntetizujících druhů orchidejí z rodů *Cephalanthera* a *Epipactis*. Podobnou závislost ukazuje studie australské orchideje *Microtis rara*. Její nezelené semenáčky se vyvíjely v přítomnosti příslušné mykorhizní houby a dřeviny *Melaleuca uncinata*, zatímco pouze s houbou bez této dřeviny uhynuly (Warcup, 1988). Nicméně některé nezelené orchideje mohou zřejmě parazitovat pouze na saprotrofních houbách netvořících ektomykorhizy, jak bylo ukázáno u *Gastrodia confusa* (Ogura-Tsujita et al., 2009).

Na základě převážně starších prací (Burgeff, 1932; Montfort et Küsters, 1940) se předpokládá, že bezlisté terestrické orchideje nefotosyntetizují, což alespoň pro některé zřejmě skutečně platí (Hudák et al., 1997). Nemusí to platit vždy, jak ukázala studie korálice *Corallorhiza trifida*. Tato mírně nazelenalá orchidej se zakrnělými šupinovitými listy vytvářející nadzemní části pouze v době květu (po předchozích

několika letech obligátní mykotrofie pod povrchem půdy; Procházka et Velíšek, 1983) ve svých nadzemních částech obsahuje menší množství chlorofylu a skutečně fotosyntetizuje (Cameron et al., 2009; Zimmer et al., 2008). První odhad, že získává mykorhizou pouze $77 \pm 10\%$ uhlíku (Zimmer et al., 2008) je zjevně nadhodnocený. Autoři vycházejí ze zastoupení stabilních izotopů uhlíku ^{13}C a dusíku ^{15}N v pletivech korálice avšak neuvažují možné obohacení těchto látek asimiláty transportovanými přímo z ektomykorhizních dřevin. Na nižší míru fotosyntézy tohoto druhu poukazuje novější studie zohledňující více sledovaných parametrů (Cameron et al., 2009).

Slabá míra fotosyntézy byla dříve objevena i u jiné bezlisté orchideje vytvářející nad zemí pouze květní stvoly (a občas v nepříznivých podmínkách kvetoucí dokonce pod zemí) hnědence *Limodorum abortivum*. Ani zde však zdaleka nedostačuje k pokrytí respirace dospělých rostlin (Girlanda et al., 2006).

1.4.1.4. Látky přenášené v orchideoidní mykorhizní symbióze

První nahlédnutí do této problematiky skýtají práce zabývající se studiem látek v mezilehlém prostoru. U pelotonů na počátku degenerace byly detekovány látky pravděpodobně rostlinného původu – pektiny, celulóza a β -1,3-glukany (Nieuwdorp, 1972; Peterson et al., 1996; Peterson et al., 1998). Zajímavé je, že v aktivně rostoucích pelotonech tyto látky nebyly detekovány vůbec (Peterson et al., 1996) či jen ve velmi malých množstvích (Nieuwdorp, 1972). V rostoucích pelotonech jsou tyto látky bezprostředně využívány houbou, čemuž je v degenerujícím pelotonu bráněno. Pro přenos látek ve směru z orchideje do houby další důkazy nemáme a zůstává tedy nadále diskutabilní. Naproti tomu existuje řada prací popisujících přenos látek v opačném směru z houby do orchideje. Jedná se především o uhlíkaté látky (Alexander et Hadley, 1985; Cameron et al., 2009; Hadley, 1984; McKendrick et al., 2000b; Smith, 1966; Smith, 1967), fosfátové ionty (Alexander et al., 1984; Alexander et Hadley, 1984; Smith, 1966), dusík (Alexander et Hadley, 1984) a vodu (Yoder et al., 2000). Nejspíše bude přenášena řada dalších látek, kterým dosud nebyla věnována patřičná pozornost.

Následující kapitoly se hlouběji zaměří na přenos sacharidů v orchideoidních mykorhizních symbiózách a možný význam fytohormonů v signalizaci mezi houbou a rostlinou v mykorhizách. Jsou to kromě výše zmíněných živin hlavní sledované látky v orchideoidních mykorhizách a tvoří také hlavní náplň této práce.

1.4.1.5. Přenosy sacharidů v orchideoidních mykorhizních symbiózách

Soudobé znalosti o přenosu sacharidů v orchideoidní mykorhizní symbióze vycházejí takřka výhradně z prací Smithe (1966; 1967) na *Dactylorchis purpurella* (dnešní *Dactylorhiza purpurella*; viz Kreutz, 2004).

V neinfikovaných částech rostlin byly z endogenních rozpustných sacharidů přítomné fruktóza, glukóza a sacharóza (Smith, 1967). Mycelium izolovaných mykorhizních hub obsahovalo glukózu, trehalózu a ve dvou případech ze tří také manitol (Smith, 1966). Po přidání aktivního izotopu uhlíku ^{14}C ve formě značené glukózy k myceliu byly analyzovány vzorky mykorhizních pletiv orchideje (tedy vlastně směs pletiv orchideje a houby).

Houba inkorporovala ^{14}C z přijímané glukózy do trehalózy. Ta pak byla v mykorhizních částech orchidejí prvním značeným sacharidem, a teprve posléze došlo k výraznému nárůstu značené sacharózy. Pravděpodobně tedy v mykorhize dochází k přebudování houbové trehalózy na rostlinnou sacharózu. Není zřejmé, jaký sacharid je přijímán rostlinnými buňkami, zda trehalóza, nebo po jejím extracelulárním štěpení trehalózou glukóza. Výsledky ukazují na význam trehalózy jako zdroje uhlíkatých látek v orchideoidní mykorhizní symbióze (Smith, 1967).

1.4.1.6. Role fytohormonů v mykorhizních symbiózách

O významu fytohormonů v mykorhizách existují útržkovité informace napříč spektrem různých organismů. Jelikož tyto práce naznačují jisté společné jevy pro různé typy mykorhiz a prací zabývajících se konkrétně orchideoidními mykorhizami je málo, uvedu tuto problematiku v pohledu mykorhizních symbióz obecně s důrazem na mykorhizní symbiózy orchideoidní.

Nejprve však stručné seznámení se světem fytohormonů v jiných organismech než vyšších rostlinách. Řada mikroorganismů je schopná produkce fytohormonů. Mnohé bakterie, sinice, řasy či houby jsou schopné produkce auxinů, cytokininů i gibberelinů (shrnuto v Tsavkelova et al., 2006). Stejně tak jsou produkce těchto fytohormonů schopné mnohé mykorhizní houby (Barker et Tagu, 2000; Tsavkelova et al., 2006). Studovaná je především produkce auxinů a jejich analogů, jež je kromě mykorhizních hub vlastní řadě fytopatogenních organismů a nejspíše slouží k regulaci chování hostitele ve prospěch patogena (Chung et al., 2003; Grunewald et al., 2009; Shimada et al., 2000; Yurekli et al., 2003).

Auxiny či jejich analogy se mohou uplatňovat také v signalizaci mezi mikroorganismy kdy například houbou produkovaný analog IAA indolyl-3-ethanol (IET) silně inhibuje růst jiných hub (Brown et Hamilton, 1992). Byly pozorovány různé vlivy auxinů na růst řas (Berliner, 1981; Nowak et al., 1988), bakterií (viz Tsavkelova et al., 2006) i kvasinek (Prusty et al., 2004) a vláknitých hub.

O vlivu fytohormonů na růst vláknitých hub svědčí dnes již prakticky zapomenuté práce ze sedmdesátých let minulého století. Byl studován vliv exogenně aplikovaných fytohormonů na růst vybraných hub i endogenní hladiny fytohormonů v myceliu (Rypáček et Sladký, 1973; Sladký et Tichý, 1974; Vinklárková et Sladký, 1978). Oproti rostlinnému materiálu jsou zde používány řádově vyšší koncentrace fytohormonů – nejčastěji 50 - 400 mg/l. U houby *Lentinus tigrinus* (Bull.)Fr. byly pozorovány vysoké hladiny endogenních cytokininů a giberelinů během časných fází vegetativního růstu mycelia. Zakládání primordií plodnic bylo provázeno výrazným snížením endogenních hladin těchto látek (Rypáček et Sladký 1972; Rypáček et Sladký, 1973). Naproti tomu bylo zakládání plodnic této houby stimulováno exogenní aplikací fytohormonů IAA (300 mg/l), GA₃ (300 mg/l) a kinetinu (400 mg/l; Sladký et Tichý, 1974). Na možnou roli fytohormonů v regulaci růstu hub poukazuje také ojedinělé pozorování, kdy TIBA inhibovala růst ektomykorhizní houby *Pisolithus tinctorius* (Pers.)Coker (Niemi et al., 2002). Zůstává otázkou, jak se tento inhibitor rostlinného transportu auxinu může uplatňovat v houbovém organismu.

1.4.1.7. Obecná role fytohormonů v mykorhizách

V mykorhizách bývá pozorováno zvýšené množství auxinu. Na jeho možnou úlohu v regulaci mykorhiz poukázala pozorování, kdy dodání auxinů či ethylenu (ethephon) vyvolávalo na kořenech *Pinus mugo* Turra var. *mugo* změny velice podobné mykorhizním kořenům. Pro tento účinek auxinů byla třeba funkční dráha signalizace ethylenu, a je tedy možné, že zde auxiny působí prostřednictvím ovlivnění jeho signalizace (Rupp et Mudge, 1985).

Tyto změny zřejmě nejsou způsobené pouhým zvýšením všech auxinů, ale především výraznou změnou v jejich poměrech. Například u *Tropaeolum majus* L. byly arbuskulární mykorhizou ovlivněny hladiny všech endogenních auxinů (Jentschel et al., 2007). V raných fázích kolonizace byl nejmarkantnější pokles volné IAA i IBA spolu s nárůstem PAA. Naopak v pozdějších fázích byl zjevný pokles hladiny PAA spolu s nárůstem IBA. Pomocí radioaktivně značených izotopů byla sledována syntéza IAA

a IBA. Syntéza IBA byla mírně posílena v mykorhizních kořenech, zatímco syntéza IAA nejevila výrazné rozdíly mezi mykorhizními a nemykorhizními částmi (Jentschel et al., 2007). Na změny v poměrech endogenních hladin volných auxinů i jejich konjugátů v mykorhize ukazuje také pozorování *Medicago truncatula* infikované arbuskulární mykorhizní houbou *Glomus intraradices*. V inokulovaných kořenech docházelo především ke zvýšení IBA, nikoli IAA (Campanella et al., 2008). Podobně byly pozorovány změny v obsahu různých auxinů u rostlin kukuřice *Zea mays* L. tvořících arbuskulární mykorhizy s houbou *Glomus intraradices*. Zvýšily se endogenní hladiny amidů IAA i IBA, ale nikoliv esterů IAA i IBA (Fitze et al., 2005). Jiná práce však ukázala, že endogenní hladiny IAA byly stejné v kořenech kukuřice inokulovaných vezikulárně-arbuskulárním izolátem houby rodu *Glomus* i neinokulovaných (Danneberg et al., 1993). Nejspíše tu tedy odezva závisí na konkrétním houbovém izolátu a dalších faktorech.

Na možnou roli IAA v regulaci zakládání mykorhiz ukazuje studie *Glycine max* L. cv. Bragg. Obsah IAA byl zvýšen v mykorhizách, ale naopak snížen u mutantu nts1007, který nevykazuje obvyklé potlačení další kolonizace kořenů v okolí již existujících symbióz (Meixner et al., 2005). IAA by mohla být odpovědná za inhibici další kolonizace v blízkosti existujících mykorhiz.

Ostatní práce ukazují spíše význam IAA jako stimulačního agens při formování mykorhiz. U *Quercus robur* L. s houbou *Piloderma croceum* J.Erikss.&Hjortst. působila přidaná IAA rychlejší tvorbu intenzivnějších mykorhiz (Herrmann et al., 2004). Obdobně IBA zvýšila množství vytvořených vezikulo-arbuskulárních mykorhiz u *Vigna unguiculata* (L.)Walp. (Gunze et Hennessy, 1980). Také ektomykorhizní houba *Pisolithus tinctorius* (Pers.)Coker s *Pinus sylvestris* L. při ošetření IBA tvořila více mykorhiz než neošetřená, a naopak při ošetření inhibitorem transportu auxinu TIBA bylo množství vytvářených mykorhiz nižší (Niemi et al., 2002). Obdobně mutant houby *Hebeloma cylindrosporum* se zvýšenou produkcí IAA vytvářel s *Pinus pinaster* (Ait.)Sol. více mykorhiz než netransformovaná kontrola (Gay et al., 1994), zatímco TIBA zcela inhibovala kolonizaci netransformovanou houbou *Hebeloma cylindrosporum* (Tranvan et al., 2000).

Zmíněný mutant houby *Hebeloma cylindrosporum* se zvýšenou produkcí IAA tvoří mykorhiz nejen více, ale i strukturně odlišných. Vzniká mohutnější hyfový plášť i Hartigova síť (Gay et Gea, 1994; Gea et al., 1994; Tranvan et al., 2000). Autoři na základě tohoto pozorovaného intenzivnějšího růstu houby spekulují o uplatnění IAA

při rozvolnění buněčných stěn a překonání rostlinných bariér (Gea et al., 1994). Dále bylo pozorováno, že tento mutant vytváří mykorhizy s ještě kratšími a širšími kořeny než netransformovaná kontrola (Laurans et al., 2001). Houbou produkovaná IAA se zřejmě uplatňuje také v regulaci morfologie rostlinných kořenů.

Tohoto možného účinku hub na rostliny bylo experimentálně využito k podpoře tvorby kořenů různými rostlinami. Mutanty ektomykorhizní houby *Hebeloma cylindrosporum* se zvýšenou produkcí IAA podporovaly zakořeňování mikrořízků *Prunus avium* ještě více než samotná aplikovaná IAA (Grange et al., 1997). Obdobně ektomykorhizní houby *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker a *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. produkovaly IAA a stimulovaly tvorbu kořenů z hypokotylů *Pinus sylvestris* L. *in vitro*. *P. involutus* stimulovala tvorbu kořenů více než *P. tinctorius*, přestože *P. tinctorius* produkovala více IAA než *P. involutus*. Nejspíše tedy v regulaci kořenů houbou hrají roli i další faktory (Niemi et al., 2002).

Jedním z možných dalších účinků je ovlivnění signalizace auxinů. U ektomykorhizní houby *Pisolithus tinctorius* Coker & Couch. byla odhalena produkce alkaloidu hypaphorinu. Ten snižuje aktivitu IAA v kořenech *Eucalyptus globosus* ssp. *bicostata* a nejspíše prostřednictvím reorganizace aktinového cytoskeletu ovlivňuje také elongaci kořenových vlásků (Ditengou et al., 2003). Nemusí se jednat pouze o ovlivnění rostliny houbou, jak ukazuje účinek jasmonátu a zeatinu na indukci akumulace hypaphorinu v hyfách ektomykorhizní houby *Pisolithus microcarpus*. Oba tyto fytohormony byly obsaženy v kořenových exudátech a nejspíše se uplatňují v indukci tvorby hypaphorinu rostlinou v mykorhizách (Jambois et Lapeyrie, 2005).

Na další rovinu modulace chování houby a rostliny v mykorhizách ukázala studie ektomykorhizní houby *Hebeloma crustuliniforme* a smrku *Picea abies* (L.) Karst (Salzer et Hager, 1993). Tato houba postrádá extracelulární invertázu i systém pro transport sacharózy do svých buněk. Případné využití rostlinné sacharózy touto houbou je závislé na rostlinné extracelulární invertáze. Produkcí auxinu houba v buňkách smrku vyvolává změny vedoucí ke snížení příjmu glukózy a zvýšené acidifikaci extracelulárního prostoru. Autoři se domnívají, že houba může prostřednictvím produkce auxinu posouvat hodnoty pH na nižší úroveň, jež je optimálnější pro funkci rostlinné invertázy a tím zvyšovat dostupnost monosacharidů rostlinného původu. Auxin tu navíc snižuje odezvu na houbový elicitor a může se tak významně uplatňovat v regulaci rostlinného chování houbou (Salzer et Hager, 1993).

Na významnou roli auxinů v dialogu mezi houbou a rostlinou ukazuje pozorování mykorhizních asociací *Cistus incanus* s houbou *Tefrezia boudieri*. Houba je s dřevinou schopná vytvářet ektomykorhizy i endomykorhizy. Izolát tvořící endomykorhizy produkoval méně auxinu, než izolát tvořící ektomykorhizy. Přídavek 2,4-D vedl ke tvorbě endomykorhiz i v podmínkách, kdy se tyto bez přídavku 2,4-D netvořily. Popsané chování vykazoval jediný kořenový izolát *Cistus incanus*. Oproti ostatním, tvořícím pouze ektomykorhizy, vykazoval vyšší senzitivitu k exogenně aplikovaným auxinům (IAA i 2,4-D) (Zaretsky et al., 2006). Pro tvorbu endomykorhiz namísto ektomykorhiz tu tedy byla třeba modifikace hladin či signalizace auxinů v houbě i rostlině. Auxiny se nejspíše významně uplatňují také v regulaci morfologie vytvářených mykorhiz.

Na roli auxinové signalizace v mykorhizách ukazují hladiny exprese některých genů. Například při kolonizaci a v mykorhizách *Pinus pinaster* s ektomykorhizní houbou *Hebeloma cylindrosporum* se výrazně zvyšuje exprese Pp-iaa88 patřící mezi Aux/IAA transkripční faktory (Charvet-Candela et al., 2002a). V další studii byla zvýšena exprese genu peroxidázy PpPrx75 v ektomykorhizách *Pinus pinaster* obdobně jako přímým účinkem přidaných auxinů (Charvet-Candela et al., 2002b). Obdobně byl při studiu genů, jejichž exprese se zvyšuje v závislosti na tvorbě mykorhiz *Eucalyptus globosus* s houbou *Pisolithus microcarpus*, identifikován EgHypar. Tento gen vykázal vysokou homologii s auxiny indukovanou glutathion-S-transferázou a produkovaný peptid odpovídající aktivitu *in vitro*. Expresi tohoto genu kromě ektomykorhiz zvyšovala také aplikace exogenních auxinů (Tagu et al., 2003).

Poslední gen, jehož exprese byla studována ve vztahu k auxinům a mykorhizám, je Pp-GH3.16 z borovice *Pinus pinaster*. Jeho exprese je indukovaná auxiny, avšak v mykorhizách s *Hebeloma cylindrosporum* vykazoval výrazný pokles exprese. Tento pokles byl ještě výraznější v mykorhizách s IAA-nadprodukujícím mutantem této houby. Exogenní auxiny zde na jeho expresi působí odlišně od jejich prosté aplikace, což na základě dosavadních poznatků nelze vysvětlit (Reddy et al., 2006).

1.4.1.8. Role fytohormonů v orchideoidních mykorhizách

První studie ukazující na možný účinek fytohormonů houbového původu v orchideoidní mykorhizní symbióze odhalila schopnost orchideoidní mykorhizní houby izolované z tojiče *Ophrys lutea* produkovat v čisté kultuře IAA a indolyethanol (IET; Barroso et al., 1986). Obě látky uvolňovala do kultivačního média. Titíž autoři v jiném článku

uvádějí možnost, že by tyto látky mohly být přijímány endocytózou a transportem váčky (Barroso et Pais, 1987), nicméně hypotéza není podložena konkrétními údaji. Produkce auxinů orchideoidními mykorhizními houbami se ukazuje být obecnějším jevem (Tsavkelova et al., 2003). Nejspíše jsou schopny též produkce giberelinů (Tsavkelova et al., 2008) a pravděpodobně také cytokininů či jejich analogů (Tsavkelova et al., 2006). Jeví se tudíž možné ovlivňování orchidejí fytohormony produkovanými mykorhizními houbami.

Popsané vztahy nemusí být obecně platné. Jinou roli auxinů v komunikaci mezi mikroorganismy a orchidejí ukázala studie australského *Pterostylis vittata* (Wilkinson et al., 1994), kdy mykorhizní houba izolovaná z tohoto druhu auxiny v kultuře neprodukovala, nicméně všech sedm izolátů bakterií asociovaných s kořeny této orchideje produkovalo IAA. Většina kmenů pak podobně jako čistá IAA podporovala klíčení (Wilkinson et al., 1994).

Auxiny se tedy mohou uplatňovat v signalizaci mezi různými půdními organismy a vytvářet komplexní signalizační síť přesahující entitu orchideje.

1.5. Vliv fytohormonů na růst a vývoj orchidejí

Není mnoho prací zabývajících se systematicky účinky fytohormonů na orchideje. Většinou se jedná o empiricky stanovené postupy vedoucí ke konkrétní odpovědi rostlinného materiálu *in vitro*. Jen minimum prací se zamýšlí nad možnou rolí a významem fytohormonů v regulaci vývoje orchidejí. Následující kapitoly se budou věnovat dostupným informacím o vlivu fytohormonů na klíčení (v klasickém pojetí, tedy i rané fázi vývoje semenáčků) a posléze na další růst a vývoj.

1.5.1. Vliv fytohormonů na klíčení orchidejí

1.5.1.1. Auxiny

U devíti druhů terestrických orchidejí nebyl pozorován významný rozdíl v klíčení po přidání IAA, IBA či NAA (Van Waes, 1984). Pouze v některých případech působily tyto auxiny mírné snížení klíčivosti. Naproti tomu jiní autoři pozorovali významné zvýšení klíčivosti *Orchis mascula* na substrátech s 2 mg/l NAA (Borris et Voigt, 1986) a IAA stimulovala klíčení v symbiotické kultuře *Pterostylis vittata* (Wilkinson et al., 1994).

Na roli auxinů při klíčení semen poukazuje experiment s inhibitorem auxinu TIBA, kdy tato silně inhibovala klíčení *Dactylorhiza maculata* již v koncentracích 2 ppm (Eiberg, 1970).

1.5.1.2. Cytokininy

Exogenní cytokininy mohou klíčení stimulovat i inhibovat. Stimulační účinek byl pozorován u mnohých střešníků rodu *Cypripedium* (Harvais, 1982; Steele, 1996; Van Waes et Debergh, 1986) a *Epipactis helleborine* (Van Waes et Debergh, 1986). Cytokininy nevykazovaly efekt na klíčení *Dactylorhiza maculata* a *Listera ovata* (Van Waes et Debergh, 1986). Vstavač *Orchis mascula* klíčil v asymbiotických kulturách lépe bez přídavku BAP (Borris et Voigt, 1986) a kinetin potlačoval klíčení *Pterostylis vittata* v symbiotické kultuře (Wilkinson et al., 1994). Zajímavé je, že společnou vlastností taxonů, jejichž klíčení cytokininy podporují, není fylogenetická příbuznost, ale požadavek chladové stratifikace semen. Cytokininy by mohly mít, podobně jako u jiných semen, antagonistický účinek k inhibici ABA (Rasmussen, 1995).

1.5.1.3. Gibereliny

Narozdíl od většiny ostatních rostlin gibereliny klíčení orchidejí zřejmě nepodporují. Vykazují buď inhibiční efekt na klíčení u taxonů *Dactylorhiza maculata* a *Listera ovata* (Van Waes et Debergh, 1986) a v symbiotických kulturách *Pterostylis vittata* (Wilkinson et al., 1994), nebo žádný vliv u taxonů *Orchis mascula* (Borris et Voigt, 1986); *Cypripedium calceolus* a *Epipactis helleborine* (Van Waes et Debergh, 1986).

1.5.1.4. ABA

Jediná studie ukázala silný inhibiční efekt ABA na klíčení *Dactylorhiza maculata*. Již koncentrace 10^{-7} M snížila klíčivost o polovinu a na koncentraci 10^{-6} M již semena neklíčila vůbec (Van Waes, 1984).

1.5.2. Vliv fytohormonů na další fáze vývoje orchidejí

Naše dosavadní znalosti účinku fytohormonů na orchideje vycházejí především z prací zabývajících se optimalizací určitých konkrétních procesů v kulturách *in vitro*. Většina těchto prací se týká tropických epifytických druhů podčeledi *Epidendroideae*. Ojedinělé jsou práce na terestrických druzích podčeledi *Orchidaceae* a jedinečná je úvaha o možné vývojové roli cytokininů u protokormů rodu *Cypripedium* (Harvais, 1972; viz níže).

Kromě těchto prací sledujících přímo účinky fytohormonů mohou být zdrojem informací také doporučovaná složení médií pro kultivace orchidejí *in vitro*. Lze z nich usuzovat na nižší optimální koncentrace fytohormonů pro následný růst semenáčků oproti klíčení (př. Fast, 1980).

1.5.2.1. Auxiny

Vliv exogenních auxinů na růst semenáčků orchidejí není jednoznačný. V jedné studii bylo pozorováno snížené přežívání semenáčků na médiích s auxinem (Van Waes, 1984), zatímco jiné studie ukázaly stimulační efekt auxinů na růst semenáčků. Auxiny urychlují vývoj prýtlů i kořenů řady tropických druhů podčeledi *Epidendroideae* (NAA: 0,1-1,8 mg·l⁻¹; Fomesbech, 1972a; Strauss et Reisinger, 1976; Ueda et Torikata, 1969a), a teprve při vyšších koncentracích dochází k inhibici růstu (*Cymbidium*; Ueda et Torikata, 1969a; Fomesbech 1972a). U několika druhů rodu *Dactylorhiza* podporovaly IBA a NAA růst kořenů a IBA v kombinaci s cytokininy podporovala také růst prýtlů (Vejsadová, 2006; Wotavová-Novotná et al., 2007).

Potlačení růstu prýtlů auxiny bylo pozorováno u *Cymbidium forrestii*, kde tyto stimulovaly růst i větvení oddenků (Paek et Yeung, 1991). Naopak u *Catasetum fimbriatum* inhibovala IAA i NAA růst kořenů a pouze IBA jej podporovala (Peres et al., 1999).

Auxiny se uplatňují v řadě dalších dějů. U různých tropických *Epidendroideae* podporují tvorbu kalusu (Colli et Kerbauy, 1993; Deb et Temjensangba, 2005; Khosravi et al., 2008). Následnou diferenciaci však nejspíše inhibují. Různé auxiny inhibovaly tvorbu PLBs *Catasetum fimbriatum* z kalusů (Colli et Kerbauy, 1993). Obdobně auxiny inhibovaly somatickou embryogenezi z listových explantátů rodu *Phalaenopsis* (Gow et al., 2008) a *Oncidium 'Gower Ramsey'* (Chen et Chang, 2004). Zajímavý byl účinek inhibitorů signalizace auxinu PCIB (2-(p-chlorofenoxy)-2-methylpropionová kyselina) a transportu auxinu TIBA (2,3,5-trijodobenzoová kyselina) a quercetinu. PCIB i quercetin kupodivu stejně jako auxiny samotné inhibovaly tvorbu PLBs. TIBA zprvu nevykazovala efekt u listových špiček, adaxiálních stran listů a řezných ploch explantátů. U části explantátů však TIBA vedla k jinak nepozorované tvorbě somatických embryí z abaxiálních stran listů a zároveň tyto explantáty netvořily embrya na řezných plochách. Po delší kultivaci pak TIBA obecně zvyšovala množství vytvořených embryí (Chen et Chang, 2004). Rozdílný účinek jednotlivých inhibitorů na základě dostupných informací nelze vysvětlit.

Na možnou roli auxinů v regulaci kvetení ukazuje jediná práce provedená s *Cymbidium niveo-marginatum in vitro*, kdy inhibitor transportu auxinu TIBA inhiboval kvetení a samotný auxin NAA kvetení neindukoval (Kostenyuk et al., 1999). Možná je správný transport auxinu potřebný k průběhu květní iniciace.

Kromě účinků exogenně dodaných auxinů je důležitá také jejich endogenní lokalizace. Mimo zmíněných experimentů s inhibitory transportu auxinu bylo jediné podstatné zjištění učiněno u tropických epifytických orchidejí rodů *Aranda* a *Vanda*, kdy jejich kořeny mohou být významnými producenty auxinu (Zhang et al., 1995). Toto pozorování se zdá být v porovnání s ostatními rostlinami zvláštní. Kořeny těchto orchidejí však obsahují v parenchymatických buňkách primární kůry chloroplasty a účastní se fotosyntézy. Taková role kořenů je mezi epifytickými orchiděmi široce rozšířená a existují dokonce orchideje rostoucí po celý život bez listů, nevyživující se však převážně mykorhizou, ale fotosyntézou v kořenech (např. rody *Microcoelia*, *Polyrrhiza*, *Solenangis*, Studnička, 1997). Produkce auxinů by mohla souviset s touto odlišnou rolí kořenů oproti roli u ostatních rostlin.

1.5.2.2. Cytokininy

Cytokininy jsou častou složkou médií pro kultivaci různých orchidejí *in vitro*, nejčastěji v koncentracích 0,2 – 5 mg·l⁻¹ (Rasmussen, 1995), někdy tedy poměrně vysokých. Lze usoudit, že cytokininy nejspíše podporují růst semenáčků řady orchidejí. Cytokininy však mohou způsobovat hnědnutí a mortalitu semenáčků, jak bylo pozorováno u semenáčků *Epipactis helleborine* pěstovaných na médiích s koncentrací 2,2 μM BAP a u *Listera ovata* již při koncentraci 0,44 μM (Van Waes, 1984).

Harvais (1972) uvádí předpoklad, že v asymbiotických kulturách orchidejí *in vitro* cytokininy stimulují vývoj prýtů a inhibují rozvoj kořenů. To se zdá v souladu s obecně přijímaným modelem auxin-cytokininové signalizace u rostlin.

Řada dalších výsledků ukazuje, že cytokininy u orchidejí podporují růst prýtů. U různých tropických orchidejí podčeledi *Epidendroideae* thidiazuron podporuje regeneraci a růst prýtů (Ernst, 1994; Chen et Piluek, 1995; Nayak et al., 1997; Chen et Chang 2000a). U rodu *Phalaenopsis* podporuje regeneraci prýtů BAP i thidiazuron (Chen et Piluek, 1995). BAP stimuloval tvorbu prýtů u *Cymbidium forrestii* (Paek et Yeung, 1991). U protokormů *Cymbidium* působily kinetin i BAP prorůstání mnoha malých prýtů (Fonnesbech, 1972a; Rücker, 1974). Abnormálně zvýšené větvení semenáčků pozoroval také Borris (1969). Podobně u *Cymbidium goeringii* působil

cytokinin diferenciaci prýtlů z protokormů a rhizomů (Ueda et Torikata, 1969b; Ueda et Torikata, 1970). U *Dendrobium* 'Serdang Beauty' působily cytokininy kinetin i BAP regeneraci kalusů v prýtlů (Khosravi et al., 2008). Tvorbu prýtlů tyto cytokininy podporovaly také u *Paphiopedilum* 'Alma Gavaert' (Hong et al., 2008). U rodu *Dactylorhiza* byla v odezvě na cytokininy pozorována tendence k proliferaci prýtlů (Fast, 1982). Cytokininy BAP a iP (N^6 -(2-isopentenyl)adenin) též podporovaly růst prýtlů několika druhů tohoto rodu (Vejsadová, 2006; Wotavová-Novotná et al., 2007).

V rozporu s předpokladem stimulačního účinku cytokininů na růst prýtlů stojí jediná práce zabývající se kultivací střešníků rodu *Paphiopedilum in vitro*. Samotný thidiazuron inhiboval proliferaci prýtlů i tvorbu kořenů (Huang et al., 2001). Inhibice růstu i větvení oddenků pak byla pozorována také při aplikaci BAP na *Cymbidium forrestii* (Paek et Yeung, 1991).

V souladu s modelem stimulačního účinku cytokininů na růst prýtlů a inhibičního na růst kořenů je pozorování transgenních rostlin *Dendrobium* Sonia. Rostliny se zvýšenou expresí vlastní cytokinin oxidázy DSCKX1 a následně sníženým obsahem endogenních cytokininů vykazovaly pomalý růst prýtlů a zvýšené zakládání i rychlejší růst kořenů. Rostliny se sníženou expresí tohoto genu vykazovaly vyšší obsah endogenních cytokininů, zvýšenou proliferaci prýtlů a pomalejší růst kořenů (Yang et al., 2003).

Cytokininy jsou u orchidejí významné také pro tvorbu kalusu. Mohou jí působit samotné či v kombinaci s auxiny. U vzdušných kořenů *Cleisostoma racimeferum* kultivovaných *in vitro* vedla aplikace kinetinu ke tvorbě kalusu (Deb et Temjensangba, 2005). Cytokininy BAP a thidiazuron podporovaly tvorbu kalusu *Dendrobium chrysotoxum* (Roy et al., 2007). Tvorbu kalusu po aplikaci kinetinu pozoroval také Borris (1969). Thidiazuron v kombinaci s 2,4-D pak vyvolává tvorbu kalusu u různých *Epidendroideae* (Chang et Chang, 1998; Chen et Chang, 2000a; 2000b; Chen et al., 2000) a také střešníků rodu *Paphiopedilum* (Lin et al., 2000).

Cytokininy se zjevně uplatňují v somatické embryogenezi. Různé cytokininy stimulovaly somatickou embryogenezi z listových explantátů rodu *Phalaenopsis* (Gow et al., 2008). BAP podporoval tvorbu PLBs u *Catasetum fimbriatum* (Colli et Kerbauy, 1993). BAP také podporoval tvorbu PLBs u *Dendrobium chrysotoxum*, ale thidiazuron ji naopak inhiboval (Roy et al., 2007).

Na možnou úlohu cytokininů v regulaci zakládání vlásků protokormů ukazují práce, kdy zeatin, kinetin i bramborový extrakt obsahující cytokininy vedly k redukcii počtu

vlásků na mladých semenáčkách několika terestrických orchidejí (Harvais, 1973; Harvais, 1974).

Harvais (1972) se na základě studia střevočniců rodu *Cypripedium* domnívá, že cytokininy jsou významné pro regulaci vývoje protokormů, konkrétně orientace kořen/prýt. Protokormy některých druhů mají spíše charakter prýtů a vysoký obsah endogenních cytokininů, zatímco jiné mají charakter kořenů. Jejich rané vývojové fáze semenáčků jsou pak necitlivé k nízkým koncentracím cytokininů, ale vysoké koncentrace je inhibují (Harvais, 1972). Další snahy o pochopení vývojových regulací dosud chybí.

Cytokininy mohou být u orchidejí významné také v regulaci kvetení. Zvýšení endogenní hladiny cytokininů, konkrétně iP a iPA bylo spojené s indukcí kvetení *Dendrobium* 'Madame Thong-In' a nejspíše je pro tento děj zásadní (Sim et al., 2008). Vyšší hladiny endogenních cytokininů, především iPA, u kvetoucích rostlin oproti nekvetoucím byly detekovány v kořenových špičkách rodu *Aranda* (Zhang et al., 1995). U *Cymbidium niveo-marginatum* v kultuře *in vitro* pak exogenní BAP indukoval kvetení (Kostenyuk et al., 1999). Nejspíše je tedy zvýšení obsahu endogenních cytokininů významné pro přechod ke kvetení alespoň u zkoumaných druhů podčeledi *Epidendroideae*.

Endogenní hladiny cytokininů v etiolovaných prýtech i kořenech *Catasetum fimbriatum* byly výrazně vyšší než hladiny auxinů i ABA (Suzuki et al., 2004) a stejná situace byla v izolovaných špičkách kořenů (Peres et al., 1999). Silné zvýšení hladiny endogenních cytokininů bylo u tohoto druhu pozorováno také po přenesení zelených explantátů *in vitro* do tmy a korelovalo s formováním etiolovaných stolonů (Suzuki et al., 2004). Možná je zvýšení endogenních hladin cytokininů obecnějším signálem v regulaci chování orchidejí.

1.5.2.3. Gibereliny

Pozorované účinky giberelinů na orchideje nejsou jednotné. Na médiích s koncentrací GA_3 $50\mu g \cdot l^{-1}$ byl pozorovaný stimulační účinek na růst, jenže semenáčky netvořily kořeny (Harbeck, 1963). U *Cypripedium calceolus* však GA_4 v koncentraci $5 mg \cdot l^{-1}$ podporoval diferenciaci prýtů i kořenů (Borris, 1969). U semenáčků rodu *Dactylorhiza* způsobily gibereliny prorůstání apikálního pupene a nahradily tak působení chladu (Borris et Albrecht, 1969; Gruenschneder, 1973). GA_3 v koncentraci nad $0,57 - 1,4 \mu M$

však již může působit hnědnutí semenáčků (Van Waes, 1984). GA₃ podporoval růst prýtlů *Catasetum fimbriatum*, zatímco inhibitor syntézy giberelinů paclobutrazol jejich růst silně inhiboval (Suzuki et al., 2004).

Možné vysvětlení těchto pozorování by mohlo být v obecnějším účinku giberelinů na stimulaci různých vývojových přechodů, jak se ukazuje u jiných rostlin. Nebude to však platné vždy, což ukazuje inhibiční vliv GA₃ na somatickou embryogenezi z listových explantátů rodu *Phalaenopsis* (Gow et al., 2008). GA₃ také může oddalovat kvetení *Cymbidium niveo-marginatum in vitro*, přičemž inhibitor giberelinů paclobutrazol dokonce zcela blokoval indukci kvetení (Kostenyuk et al., 1999).

2. Materiál a metody

Všechny experimenty probíhaly na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Kultury matečných rostlin (zdroj semen) probíhaly na dvou místech:

- venkovní kultivace: zahrada v Bílém Podolí (č.p. 39) ve středních Čechách
- skleníková kultivace: Botanická zahrada Hl. m. Prahy v Praze – Troji

Seznam použitých chemikálií s uvedením výrobce je v příloze 1.

2.1. Kultivační prostory

Bylo využito několik kultivačních prostor. Jejich seznam se specifikací jednotlivých charakteristik je uveden v tabulce 2.1. Jednotlivé prostory budou v dalším textu označovány písmennými kódy.

Tabulka 2.1. – kultivační prostory

kód	charakteristika kultivačního prostoru	teplota [°C]	osvětlení [lux]	fotoperioda [h]
A	kultivační místnost 013	25±1	3000	16
B	kultivační místnost Pod Genetikou	21-22	700	16
C	kultivační místnost S06	20-21	11000	16
D	klimabox přízemí	17±1	280	16
E	chladnička Calex 210 SL	10,4	tma	tma
F	chladová místnost	3,5-4	tma	tma

2.2. Kultivační média

Složení médií je uvedeno v příloze 2.

Tabulka 2.2. – přehled použitých médií

médium	kultivovaný materiál
1/4-2	rostliny
ČA	houby
FM	rostliny
LB	bakterie
Michl	rostliny
Mo2	rostliny
SM	rostliny
Stemon	houby
SU2	rostliny
SU3	rostliny
SU4	rostliny
YEB	bakterie
YEB+MgSO ₄	bakterie
YEB recovery	bakterie

2.2.1. Příprava médií

Není-li u příslušného roztoku uvedeno jinak, byly všechny zásobní roztoky přidávány před klávováním. V pořadí uvedeném v předpisu složení média (příloha 2) byly jednotlivé složky mimo agar a roztoků přidávaných po klávování přidávány za stálého míchání do cca polovičního objemu demineralizované vody. Zmražené roztoky byly před použitím zcela rozmrazeny. Po rozpuštění příslušných složek byl roztok doplněn demineralizovanou vodou na konečný objem média (měřeno odpovídajícím odměrným válcem). Médium bylo přelito do kádinky. Za průběžného míchání bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu pomocí 1M vodného roztoku NaOH a 1M vodného roztoku CH₃COOH. Následující postup se pak mírně lišil dle účelu média.

Tuhé médium

Z objemu média byla odlita přibližně polovina, přisypáno příslušné množství agaru, rozmícháno a za občasného promíchání rozvařeno v mikrovlnné troubě Eta 7199. Poté byl za stálého míchání přilít zbytek média. Po promíchání bylo médium rozléváno do kultivačních nádob (baněk), tyto přebaleny dvojitým alobalem a sterilizovány v autoklávu. Pokud bylo k médiu třeba přidat termosenzitivní složky po klávování, či jej rozlít do Petriho misek, bylo médium sterilizováno v 250 ml nebo 500 ml skleněných lahvích. Po částečném vychladnutí média bylo k celému objemu připipetováno příslušné množství sterilního zásobního roztoku, krouživým pohybem rozmícháno a rozléváno do sterilních kultivačních nádob.

Tekuté médium

Postup byl podobný jako u tuhého média s tím rozdílem, že k médiu nebyl přidáván agar. Vždy bylo sterilizováno v 250 ml nebo 500 ml skleněných lahvích a rozléváno do sterilních kultivačních nádob po klávování.

2.3. Desinfekce nástrojů a materiálu

Média, voda, glycerol, párátko a špičky pro automatické pipety byly desinfikovány v autoklávu Tuttnauer 2540EK-N po dobu 20 min při teplotě 121 °C a tlaku 144 kPa.

Roztoky termolabilních látek byly sterilizovány filtrací přes sterilizační filtry 0,22 µm (Rotilabo®-Spritzenfilter steril).

Prázdné kultivační nádoby, nástroje, Petriho misky a další materiál podobného charakteru byly desinfikovány v horkovzdušném sterilizátoru Binder po dobu 3 hodin při teplotě 150 °C. Baňky byly předem přebaleny dvojitou vrstvou alobalu, nástroje vloženy do skleněných tubusů a také přebaleny alobalem.

Během práce ve flow-boxu byly kovové nástroje před použitím namočeny v 96 % ethanolu a opáleny.

2.4. Hodnocení materiálu

2.4.1. Záznam dat

Většina dat byla zaznamenána pořízením fotografií kultur pomocí následujících přístrojů.

- 1) Mikroskop Olympus BX50 F4 (software: LuciaG5; kamera Nikon Digital Sight DS-U1) pro pozorování v procházejícím světle
- 2) Mikroskop Olympus Provis AX70 (software: NIS-Elements AR 2.30; fluorescenční lampa Olympus BH2-RFL-T3; CCD kamera COHU 4912-5100/0000) pro pozorování fluorescence.
- 3) Binokulární lupa Nikon (software: LuciaG5; Nikon Digital Camera DXM1200).
- 4) Fotoaparáty Canon EOS 300D a Canon EOS 40D s objektivy Canon EF-S 18-55mm, Canon EF 24-105mm 1:4 L IS USM, Canon Macro EF 100mm 1:2,8 USM, Canon Macro EF-S 60mm 1:2,8 USM.

Pro účely fotografování kultur v Petriho miskách byl fotoaparát Canon EOS 300D upevněn svisle do stativu Raiser RS1, což umožnilo focení misek shora v přirozené horizontální poloze.

Kultury *in vitro* v Petriho miskách byly pozorovány ve zmíněných mikroskopech neporušené v uzavřených Petriho miskách při zvětšení objektivu 4x.

2.4.2. Zpracování dat

Obrazový materiál byl zpracován v programu Adobe Photoshop 7.0 CE a Adobe Photoshop 8.0 CS.

Rozměry rostlin byly získány manuálním měřením obrazu v programech LuciaG5 a Image J. Úprava primárních dat probíhala v programech Microsoft Excel for Windows 2000, Microsoft Office Excel 2007 a Notepad2. K jejich následné analýze byly kromě zmíněného programu Excel 2000 využity statistické programy R 2.9.1 a NCSS 97.

Statisticky významné rozdíly mezi variantami byly hodnoceny na základě výsledků metody ANOVA. V případě normality dat byly rozdíly hodnoceny dle výsledků Tukey-Kramerova testu. Pokud data neměla normální rozdělení, byly rozdíly hodnoceny dle výsledků Kruskal-Wallisova testu.

2.5. Analýza obsahu rozpustných sacharidů

2.5.1. Odběr vzorků

Vzorky byly uloženy do plastových nádobek, v nich zamrazeny v tekutém dusíku a dále skladovány při -80°C .

2.5.2. Extrakce sacharidů

- 1) Vzorky lyofilizovány v přístroji Lyovac GT 2 (Finn-Aqua) - 14 až 24 hodin dle charakteru materiálu. Po vysušení dále skladovány v exikátoru nad vrstvou vysušeného silikagelu.
- 2) Odebráno vhodné množství sušiny do mikrozkušavek s propíchnutými víčky. Připipetováno 0,5 ml 80 % methanolu, vzorky inkubovány v termobločku (GrantBoeckel BBD) při 75°C po dobu 15 minut.
- 3) Methanol odpařen ve vakuu v přístroji Speedvac Plus SC110A (Savant) po dobu 3 hodin.

4) Přidána demineralizovaná voda (MilliQ) v množství dle hmotnosti sušiny:

< 5 mg	0,3 ml
5 – 10 mg	0,5 ml
10 – 20 mg	1,0 ml
20 – 30 mg	1,5 ml

5) Vzorky ošetřeny sonikací v ultrazvukové lázni Julabo USR 05 po dobu 15 minut.

6) Centrifugace (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 rcf po dobu 10 minut.

7) Supernatant opatrně odebrán injekční jehlou, přefiltrován přes membránové filtry Millex Millipore (0,22 μm) do nových mikrozkušavek.

8) Vzorky následně uchovávány při -18°C .

2.5.3. Stanovení obsahu a spektra sacharidů

Sacharidy byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s refraktometrickou detekcí.

Parametry měřicího systému: refraktometrická detekce (Shodex RI-71); isokratická pumpa Spektra Physics; integrace: počítačový program CSW 1.7; teplota 80°C ; předkolonky Hema-Bio 1000 SB+Q (Watrex); kolona polymer IEX 8 μm Pb^{2+} (Watrex); eluent: demineralizovaná voda (MilliQ), rychlost průtoku $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem injikovaného vzorku: 10 μl ; standardy: Sigma.

Jelikož tento systém špatně odlišoval rafinózu od sacharózy, byly vzorky obsahující rafinózu analyzovány paralelně obdobným systémem s kolonou polymer IEX 8 μm Ca^{2+} (Watrex). Výsledné množství sacharidů pak bylo počítáno z měření prvně zmíněného systému (kolona Pb^{2+}) s výjimkou rafinózy a sacharózy počítaných dle měření druhého zmíněného systému.

2.6. Práce s rostlinným materiálem

Všechny rostliny *in vitro* byly odvozené výsevem semen.

Vlastní experimenty byly založeny buď přímo výsevem nebo přesázením rostlin kultivovaných po výsevu *in vitro*.

Dále budou jednotlivé kultury označovány kódem, kde první písmeno označuje rod, druhé písmeno označuje druh a koncové číslo označuje konkrétní výsev. Přiřazení těchto kódů jednotlivým rostlinám je spolu s jejich původem uvedeno v příloze 3.

2.6.1. Kultivace rostlinného materiálu

Kultivace matečných rostlin probíhala dle postupů publikovaných dříve (Ponert, 2005; Ponert, 2006; Ponert, 2007; Ponert, 2008; Sekerka et al., 2006; Sekerka et al., 2007).

Veškeré aseptické manipulace s rostlinnými kulturami byly prováděny v laminárním flow-boxu Heraeus LaminAir® TL2448.

2.6.2. Příprava a skladování semen

Semena byla skladována v papírových sáčcích, zpravidla s celými uschlými semeníky. Před výsevem, byla přesypána na nový A4 kancelářský papír s nahoru ohnutými okraji (aby semena nepřepadávala z papíru) a přečištěna manuálním vybráním zbytků semeníků a nečistot pinzetou. Po tomto přečištění byla semena přesypána pomocí druhého, menšího a přehnutého papíru zpět do papírového sáčku, nebo rovnou do injekční stříkačky. Uchovávání semen v plastových obalech se neukázalo vhodné – jednak může snadno dojít k zapaření ne zcela doschlých semen, jednak se semena snadno přichytávají ke stěnám statickou elektřinou a nelze je pak všechna použít.

2.6.3. Desinfekce semen:

Nejprve byla rozbalena injekční jehla 1,2 x 40 (18Gx1½“, Luer-Lock, Dispomedicor Rt, Hungary) a do jejího rozšířeného konce byl pinzetou se zahnutými konci vložen kousek molitanu. Vhodný kousek molitanu byl předem vytvořen rozstříháním na kvádry cca 4 x 4 x 5,5 mm. Do jehly byl vložen tak, že podélná osa tohoto kousku molitanu souhlasila s podélnou osou jehly. Jehla byla nasazena na sterilní injekční stříkačku 2 ml nebo 5 ml (dle množství vysévaných semen a zamýšlené hustoty výsevu; Luer, Chirana). Kousek molitanu byl tímto stlačen v hrdle jehly mezi obústí hrdla stříkačky a ústí vlastní kovové jehly do nástavce. Poté byl ze stříkačky úplně vytažen píst, přesypána semena (pomocí přeloženého kancelářského papíru) a opět zasunut píst. Tímto byla semena připravena k desinfekci nasáváním a odstříkáváním jednotlivých roztoků, přičemž molitan fungoval jako filtr zadržující semena uvnitř.

Při výměně roztoků uvízne část semen v molitanu a i s ním je posléze i odstraněna. Zpravidla bylo vyséváno větší množství semen a tyto ztráty nevadily. Pro malá množství semen byl postup modifikován přetažením čtverečku vystřiženého ze sítě pro sítotisk přes hrdlo stříkačky a nasazením jehly přes něj. V síti pro sítotisk semena

neuvíznou, neucpává se, ale při neopatrné manipulaci pak po síti sklouzává jehla ze stříkačky.

Tato metoda byla optimalizována z běžně používané techniky pro výsev velmi jemných semen *in vitro*. Standardně se doporučuje použití tenké jehly, která sama funguje jako filtr. V případě orchidejových semen se ale tato snadno ucpává semeny a posléze též vysráženým chlornanem. Vede to k nesnadné manipulaci a možnému zničení semen přílišným tlakem při zoufalém vytlačování roztoku ucpanou jehlou (Mácha, pers.com.; Ponert, nepublikováno). Použití širší jehly a vloženého filtru tento problém uspokojivě řeší.

Standardní postup desinfekce byl následující:

- 1) pět minut čistý 96% ethanol, občas ručně protřepáno
- 2) 3 x promytí destilovanou vodou, průběžně protřepáváno
- 3) semena následně ponechána ve vodě delší dobu, dokud jich cca polovina neklesla ke dnu (smáčela se)

Od tohoto kroku byla práce prováděna sterilně v laminárním flow-boxu:

- 4) 3x vyměněný roztok $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ – pro většinu semen celkem deset minut, případně modifikováno dle potřeby (viz. příloha 3), případně doplněno promytím 2% H_2SO_4 s následnou opětovnou neutralizací roztokem $\text{Ca}(\text{OCl})_2$; občas protřepáváno
- 5) 3 x promytí sterilní destilovanou vodou (nasávána skrze propíchnuté alobalové víčko z Erlenmeyerovy baňky, předem desinfikována autoklávováním), průběžně protřepáváno
- 6) nasáta sterilní destilovaná voda pro vznik konečné výsevni suspenze
- 7) sejmuta tenčí jehla i s filtrem a nasazena sterilní jehla 1,8 x 40 (15Gx1½“, Luer-Lock, Dispomedicor Rt, Hungary)
- 8) suspenze semen vytlačována jehlou do kultivačních nádob a jejich krouživým pohybem rozprostřena po povrchu agarového média (v případě tekutého média nekrouženo). Vždy před vytlačováním byla stříkačka protřepána. K rozprostření semen po povrchu agarového média nebyly používány žádné další nástroje.

Roztok $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ byl připravován vždy čerstvý. 10 g chlorového vápna bylo rozmícháno v 50 ml destilované vody, necháno ve tmě odstát cca 4 – 6 hodin, poté

krouživým pohybem baňky rozmícháno, zfiltrováno přes filtrační papír do nové Erlenmeyerovy baňky, uzavřeno alobalem a po cca 5-10 minutách používáno.

2.7. Práce s bakteriemi

2.7.1. Bakteriální kmeny

V práci byly využity kmeny *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook et al., 1989) a *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 s plasmidem pGV2260 (Deblaere a kol., 1985).

2.7.2. Kultivační podmínky

Escherichia coli na tuhých médiích byla standardně kultivována v kultivačním boxu UN-I-TROL CO₂ Incubator Model 329 (Forma Scientific®) při teplotě 37°C, v tekutých médiích probíhala kultivace na horizontální třepačce Certomat®R (180 RPM) v kultivačním boxu Certomat®H (B.Braun) při stejné teplotě.

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* na tuhých médiích byla kultivována v kultivačním boxu Heraeus B6120 při teplotě 27°C, v tekutých médiích probíhala kultivace na horizontální třepačce POS-300 (Grant-bio) při 150 RPM v kultivačním boxu FTC90E Refrigerated Incubator při stejné teplotě.

Kultivační postup

Zmíněné kmeny bakterií byly dlouhodobě uchovávány hluboce zmrazené. K tomu účelu bylo nejprve centrifugováno 1,5 ml bakteriální suspenze narostlé v LB médiu 12 – 16 hodin (centrifuga Heraeus Biofuge 13, 1 minuta, 13000 RPM), odebrán supernatant, sediment následně rozmíchán ve 40 μ l sterilního 10 % glycerolu. Vzniklá suspenze byla v mikrozkuvkách Eppendorf zamrazena v tekutém dusíku a dále skladována při -80°C. V případě potřeby pak bylo ze zmrazené suspenze odebráno malé množství sterilním párátkem, přeneseno na tuhé médium v Petriho misce a takto kultivováno.

K očkování a rozčárkování bakterií byla používána sterilní dřevěná párátko. Veškeré aseptické manipulace s bakteriemi byly prováděny v laminárním flow-boxu Heraeus LaminAir® HP72. Bakterie na tuhých médiích v Petriho miskách byly kultivovány neuzavřené parafilmem v obrácené poloze dnem vzhůru. V případě potřeby byly krátkodobě skladovány v Petriho miskách uzavřených parafilmem v chladničce při +4°C. Vždy byly k jejich kultivaci použity sterilní plastové Petriho misky průměru 9 cm.

2.7.3. Příprava kompetentních buněk *A. tumefaciens*

Postup dle McCormac et al. (1998).

Bakterie rozčárkovány na tuhé LB médium s rifampicinem (100 mg/l), kultivovány tři dny. Jednotlivé kolonie zaočkovány do 10 ml tekutého LB média s rifampicinem a kultivovány 18 hodin. 10 ml vzniklé bakteriální suspenze zaočkováno do 200 ml tekutého YEB média s rifampicinem, kultivováno do dosažení optické denzity 0,6 (spektrofotometr Thermo Spectronic, Biomate 5; 560 nm; kyveta 1 cm). Kultura ochlazená umístěním kultivačních nádob do ledové lázně.

Všechny další kroky byly prováděny při teplotě v rozmezí 0-4°C (ledová lázeň, chlazená centrifuga):

- 1) Centrifugace (centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen; 10 min; 2000 g; 4°C), odstraněn supernatant.
- 2) Sediment resuspendován ve 200 ml sterilní demineralizované vody.
- 3) Centrifugace (centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen; 10 min; 2000 g; 4°C), odstraněn supernatant.
- 4) Sediment resuspendován ve 100 ml sterilní demineralizované vody.
- 5) Centrifugace (centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen; 10 min; 2000 g; 4°C), odstraněn supernatant.
- 6) Sediment resuspendován v 10 ml sterilního 10 % glycerolu.
- 7) Centrifugace (centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen; 10 min; 2000 g; 4°C), odstraněn supernatant.
- 8) Sediment resuspendován v 1 ml sterilního 10 % glycerolu.
- 9) Vzniklá suspenze rozpipetována po 100 µl do mikrozkušavek Eppendorf, zamražena v tekutém dusíku, uchovávána při -80°C.

2.8. Práce s houbami

2.8.1. Kultivační podmínky:

Vláknité houby byly kultivovány v plastových Petriho miskách na tuhých médiích (není-li dále uvedeno jinak) v kultivačním prostoru B ve tmě papírové krabice. Aseptická práce s kulturami hub byla prováděna v laminárním flow-boxu EM Box 90.

2.8.2. Izolace hub z kořenů orchidejí

Izolace byla provedena s využitím kitu Orchid Fungi Isolation Kit (for Mas; UTSR). Kořeny byly odebírány z dospělých rostlin v podobě přibližně 2 až 5 cm dlouhých segmentů. Tyto byly do použití přechovávány v pufru Swamp Buffer® (součást kitu).

Vlastní izolace:

- 1) Kořeny důkladně omyty pod tekoucí vodovodní vodou.
- 2) Kořeny pinzetou přeneseny do 15% roztoku Sava s kapkou smáčedla Tween 20, občas promíchány krouživým pohybem.
- 3) Po různě dlouhé době (2,5; 3,5 a 4,5 minuty) vždy část kořenů přenesena do baněk se sterilní demineralizovanou vodou a krouživým pohybem promícháno.
- 4) Pinzetou přeneseny z vody na sterilní plastovou Petriho misku průměru 9 cm. Skalpelem odříznuty 3 – 4 mm dlouhé okraje a zbylá část nakrájena na přibližně 0,75 mm dlouhé segmenty.
- 5) Vzniklé segmenty byly mírně zanořeny do povrchu tuhého (Stemon nebo ČA) média v Petriho miskách průměru 9 cm. Takto byly dále kultivovány a průběžně kontrolovány na růst hub.

Dále byly jednotlivě přesazovány kolonie vláknitých hub bez kontaminací mikroorganismy, které vyrostly na miskách po takové době desinfekce, kdy tyto vyrůstaly z co nejmenšího podílu kořenů. Pokud po daném ošetření vyrůstaly houby z více jak třetiny segmentů, nebyly tyto dále kultivovány, protože se již se značnou pravděpodobností nemuselo jednat o rostlinné endofyty.

Byla používána dvě média: Stemon a ČA.

2.8.3. Použité houby

kód	taxon houby	izolováno z rostliny
FU-05	<i>Meliniomyces</i> sp.	<i>Leucorchis albida</i>
FU-06	<i>Phialocephala/Acepphala</i>	<i>Leucorchis albida</i>
FU-09-1a		<i>Dactylorhiza majalis</i>
FU-09-1b		<i>Dactylorhiza majalis</i>
FU-10-1		<i>Orchis purpurea</i>
FU-10-2		<i>Orchis purpurea</i>
FU-10-3		<i>Orchis purpurea</i>

Tabulka 2.3. - seznam použitých hub:

Houby FU-05 a FU-06 byly poskytnuty týmem Dr. Martina Vohníka. Jednalo se o jejich izoláty již dříve určované. Zbývající houby byly v rámci této práce vyizolovány z uvedených rostlin výše zmíněným postupem.

2.9. Práce s DNA

2.9.1. Použité vektory

- 1) Binární vektor pVKH s konstruktem DR5rev::GFP s reverzně orientovaným auxinem indukovaným promotorem DR5 kontrolujícím expresi GFP; s bakteriální rezistencí na kanamycin a rostlinnou rezistencí na hygromycin (Benková et al., 2003). Tento vektor byl získán od Dr. J. Petráška v podobě kolonií *E.coli* na plotně LB média.
- 2) Binární vektor PCP60 s konstruktem 35S::GFP. Konstitutivní promotor viru tabákové mozaiky CaMV 35S kontrolující expresi GFP. Rostlinná rezistence na kanamycin (neomycinfosfottransferáza pod kontrolou promotoru nopalinsyntázy pNOS::NPTII). (Nocarova et Fischer, 2009). Tento vektor byl získán od Dr. J. Petráška v podobě připravených nábojů.

2.9.2. Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

Podle účelu bylo izolováno buď menší množství DNA pomocí kitu Wizard®Plus SV Minipreps (DNA Purification System, Promega), nebo větší množství pomocí kitu Jetstar 2.0 MIDI.

Wizard®Plus SV Minipreps

Postup byl proveden dle přiloženého protokolu.

Jednotlivé kolonie *E. coli* narostlé na tuhém médiu byly zaočkovány do 3 ml tekutého média LB s příslušnými antibiotiky ve skleněných zkumavkách a kultivovány 12-16 hodin.

- 1) Bakteriální suspenze byla centrifugována pět minut (centrifuga Heraeus Biofuge 13, 13000 RPM, používána během celého tohoto protokolu). Odstraněn supernatant.
- 2) Sediment resuspendován v 250 µl Cell Resuspension Solution.
- 3) Přidáno 250 µl Cell Lysis Solution, jemně promícháno, inkubováno pět minut.

- 4) Přidáno 10 µl Alkaline Protease Solution, jemně promícháno, inkubováno pět minut.
- 5) Přidáno 350 µl Wizard® Plus SV Neutralization Solution, jemně promícháno.
- 6) Centrifugováno deset minut.
- 7) Supernatant přepipetován do připravené kolonky Spin Column.
- 8) Centrifugováno jednu minutu, odstraněn eluát.
- 9) Přidáno 750 µl Column Wash Solution rozpuštěné v příslušném množství ethanolu (viz. návod kitu).
- 10) Centrifugováno jednu minutu, odstraněn eluát.
- 11) Přidáno 250 µl Column Wash Solution rozpuštěné v příslušném množství ethanolu.
- 12) Centrifugováno dvě minuty, kolonka vložena do nové mikrozkuhavky.
- 13) DNA eluována 100 µl vody Nuclease-Free Water, centrifugováno jednu minutu.
- 14) Roztok DNA byl skladován v lednici při -20°C.

Jetstar 2.0 MIDI

Postup byl proveden dle přiloženého protokolu Jetstar 2.0 MIDI columns with Lysate Filter Unit (LFU).

Dvě až tři kolonie *E. coli* narostlé na tuhém médiu byly zaočkovány do 27 ml tekutého média LB s příslušnými antibiotiky v 50 ml Erlenmeyerově baňce a kultivovány 23 hodin.

- 1) Kolonka Jetstar 2.0 MIDI columns s vloženou Lysate Filter Unit (LFU) byla promyta 14 ml pufru E4.
- 2) Narostlá bakteriální kultura byla přelita do sterilních plastových zkumavek a centrifugována 3 minuty při 10000 g (centrifuga Jouan MR22). Odstraněn supernatant.
- 3) Sediment byl rozmíchán v 8 ml pufru E1 (obsahuje RNAzu).
- 4) Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 8 ml pufru E2, jemně promícháno. Inkubováno pět minut (lyze buněk).
- 5) K suspenzi bylo přidáno 8 ml pufru E3, jemně promícháno (neutralizace).
- 6) Suspenze byla přelita do Lysate Filter Unit (LFU) vložené v Jetstar 2.0 MIDI kolonce.
- 7) Po odkapání kapalně fáze byla jednotka promyta 5 ml pufru E5.

- 8) Po odkapání kapalné fáze byla odstraněna Lysate Filter Unit (LFU) a kolonka promyta 20 ml pufru E5.
- 9) Po odkapání kapalné fáze byla z kolonky DNA eluována promytím 5 ml pufru E6.
- 10) DNA byla z roztoku vysrážena přidáním 3,5 ml isopropanolu.
- 11) Suspenze byla centrifugována 30 minut (centrifuga Jouan MR22, 12000 g, 4°C).
- 12) Po odebrání supernatantu byl sediment rozmíchán ve 2 ml 70 % ethanolu, přepipetován do 2 ml plastové mikrozkuhavky. Centrifugace deset minut (16000 RCF, Eppendorf Centrifuge 5415R).
- 13) Odebrán supernatant, sediment dosušen přes noc v chladničce při +4°C.
- 14) Sediment (DNA) rozpuštěn v 50 µl demineralizované vody a skladován v ledničce při -20°C.

2.9.3. Příprava nábojů pro Helios Gene Gun System

Byly připraveny náboje s mikroprojektily nesoucími vektor pVKH s DR5rev::*GFP*.

2.9.3.1. Příprava vektoru

Použit binární vektor pVKH s konstruktem DR5rev::*GFP* Kolonie *E. coli* nesoucí tento vektor byly přečárkovány na nové plotny LB média s kanamycinem (50 mg/l). Jednotlivé kolonie byly zaočkovány do tekutého média LB a podrobeny izolaci plazmidové DNA kitem Jetstar 2.0 MIDI (popis v kapitole 2.1.10.1.). Pro určení koncentrace DNA byly z roztoku odebrány 2 µl a rozředěny 200 µl demineralizované vody. Koncentrace DNA následně určena měřením na spektrofotometru Thermo Spectronic (BioMate 5) v 1 cm kyvetě křemenného skla skenováním v pásu vlnových délek 200-300 nm. Odečteny hodnoty při 260 nm (pro koncentraci DNA) a při 280 nm (pro stanovení znečištění proteiny). Množství DNA v původním vzorku dopočítáno dle vztahu:

$$c = \varepsilon \cdot l \cdot A \cdot f$$

kdy

ε (DNA, 260 nm) = 50 µg·µl⁻¹·cm⁻¹; l = 1 cm; A je naměřená absorbance při 260 nm; f je ředění a má v tomto případě hodnotu 100.

Pro přípravu nábojů bylo použito množství roztoku odpovídající 50 µg DNA, tj. 25 µl.

2.9.3.2. Příprava mikroprojektilů

Cílem tohoto kroku bylo navázání DNA na mikroprojektily.

- 1) Do mikrozkušavky Eppendorf odváženo 16 mg zlatých mikroprojektilů průměru 1 µm. Resuspendovány v 200 µl 70% ethanolu. Sedimentovány centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5415R; 5000 RPM; 0,5 minuty). Odebrán ethanol.
- 2) Resuspendovány v 200 µl demineralizované vody, sedimentovány centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5415R; 7000 RPM; 0,5 minuty), odebrána voda.
- 3) Krok 2 byl 3x zopakován.
- 4) Resuspendovány v 200 µl 50% glycerolu, sedimentovány centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5415R; 7000 RPM; 0,5 minuty), odebrán supernatant.
- 5) Znovu 2x promyty demineralizovanou vodou stejně, jako v kroku 2.
- 6) Resuspendovány ve 100 µl 0,05 M spermidinu, míchány přístrojem MS1 Minishaker (IKA) po dobu dvou vteřin, sonikovány ve vodní lázni přístroje Bandelin Sonorex RK31 dvakrát po sobě po dobu 30 vteřin.
- 7) Přidáno množství roztoku DNA odpovídající 50 µg DNA (25 µl), zamícháno přístrojem MS1 Minishaker (IKA) po dobu 5 vteřin.
- 8) Za průběžného promíchávání pomocí přístroje MS1 Minishaker (IKA) přikapáváno celkem 100 µl 1M roztoku CaCl₂. Po promíchání vzorky nechány sedimentovat po dobu deseti minut.
- 9) Sedimentovány centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5415R; 5000 RPM; 0,5 minuty), odstraněn supernatant.
- 10) Resuspendováno ve 100 µl 100% ethanolu, sedimentováno centrifugací (Eppendorf Centrifuge 5415R; 5000 RPM; cca 5 vteřin), odstraněn supernatant.
- 11) Krok 10 byl třikrát zopakován.
- 12) Sediment resuspendován a převeden do plastové zkumavky čtvrtým vypláchnutím 500 µl roztoku polyvinylpyrolidonu (PVP, 0,05 mg/ml 100% ethanolu).
- 13) Zkumavka zaparafilmována a skladována do druhého dne při -20°C.

2.9.3.3. Vlastní příprava nábojů

Cílem tohoto kroku bylo naplnit připravenými mikroprojektily náboje. Byl proveden pomocí přístroje Tubing Prep Station (Bio-Rad).

- 1) Do přístroje vložen odpovídající kus trubičky (Bio-Rad).
- 2) Trubička v přístroji bez otáčení sušena procházejícím dusíkem (tlak odpovídající 0,3 – 0,4 l/min na stupnici přístroje) po dobu 15 minut.
- 3) Trubička vyjmuta z přístroje, připojena na injekční stříkačku a z připravené plastové zkumavky byl pozvolna nasát roztok mikroprojektilů.
- 4) Trubička opět vložena do přístroje. Mikroprojektily nechány sedimentovat na stěny trubičky bez tlaku dusíku s jen občasným pootáčením po dobu 15 minut. Během této doby byla k trubičce stále připojena injekční stříkačka.
- 5) Připojenou injekční stříkačkou velice pozvolna odsáta zbylá kapalina. Odpojena stříkačka.
- 6) Tlak nastaven na hodnotu odpovídající 0,3 – 0,4 l/min na stupnici přístroje, trubička sušena procházejícím dusíkem za stálého otáčení po dobu pěti minut.
- 7) Trubička vyjmuta z přístroje Tubing Prep Station, mikroprojektily obalená část nakrájena pomocí Bio-Rad Tubing Cutter na jednotlivé náboje.
- 8) Náboje přeneseny pinzetou do plastové uzavíratelné zkumavky („falkony“) nad vrstvu vysušeného silikagelu zakrytého kouskem buničiny. Zkumavka uzavřena parafilmem. Náboje v ní skladovány do použití v chladničce při +4°C.

2.9.4. Transientní transformace rostlin

Rostliny transformovány nástřelem mikroprojektily pomocí Helios Gene Gun System (Bio-Rad). Postup proveden dle manuálu s následujícími modifikacemi: použity listy rostlin, nástřelny položené na plastové Petriho misce průměru 9 cm abaxiální stranou nahoru. Tlak helia byl nastaven na 250 psi. Na jedno místo listu bylo z jednoho náboje stříleno 3x po sobě. Po nastřílení listy omyty vodovodní vodou, umístěny abaxiální stranou dolů do plastové Petriho misky průměru 9 cm s médiem SU4. Po jednom a čtyřech dnech kultivace ve tmě při laboratorní teplotě byly pozorovány mikroskopem Olympus Provis AX70 s kostkou U-MNIBA a excitací modrým světlem.

2.9.5. Stabilní transformace *Dactylorhiza fuchsii*

Při vytváření postupu transformace byly využity zkušenosti s transformací bramboru dle publikovaného protokolu (Dietze et al., 1995) a zkušenosti s kultivací orchidejí *in vitro*.

2.9.5.1. Příprava rostlin

Semena *Dactylorhiza fuchsii* byla velmi hustě vyseta do plastových Petriho misek průměru 6 cm na médium Michl. Rostliny byly v těchto miskách kultivovány v kultivačním prostoru D ve tmě v papírové krabici po dobu sedmi měsíců.

2.9.5.2. Příprava *A. tumefaciens* s příslušným vektorem

Příprava vektoru

K transformaci byl použit binární vektor pVKH s konstruktem DR5rev::GFP. Kolonie *E. coli* nesoucí tento vektor byly přečárkovány na nové plotny LB média s kanamycinem (50 mg/l). Jednotlivé kolonie byly zaočkovány do tekutého média LB a podrobeny izolaci plazmidové DNA kitem Wizard®Plus SV Minipreps (popis v kapitole 2.1.10.2.).

Elektroporace vektoru do *A. tumefaciens*

Izolovaná DNA byla elektroporována do *A. tumefaciens* (postup dle Shen et Forde, 1989):

Suspenze kompetentních buněk *A. tumefaciens* byla rozmrazena v ledové lázni. Byly přidány 3 μ l roztoku DNA, promícháno, inkubováno jednu minutu v ledové lázni. Následně byla suspenze rychle přenesena do elektroporační kyvety (vychlazené předem v ledové lázni), sklepana na dno. Aplikován elektrický pulz (elektroporátor Bio-Rad Gene Pulser™; 25 μ F; 2 kV; 200 Ω ; 4,4 ms). Rychle přidán 1 ml sterilního YEB recovery média, vzniklá suspenze přelita do sterilní skleněné zkumavky a kultivována tři hodiny. Poté byla suspenze vyseta v objemech 100 μ l a 900 μ l na YEB tuhé médium s kanamycinem (50 mg/l). Takto byly *A. tumefaciens* kultivovány tři dny.

Následně bylo po třech vyrostlých koloniích zaočkováno do dvou 50 ml Erlenmeyerových baněk do 5 ml YEB+MgSO₄ s rifampicinem (100 mg/l) a kanamycinem (50 mg/l). Tyto kultivovány 18 hodin.

Vlastní transformace rostlin

Vyrostlé protokormy *Dactylorhiza fuchsii* byly pinzetou přeneseny do 20 μ l tekutého média SU4 v plastových Petriho miskách průměru 9 cm. K médiu bylo připipetováno 40 μ l narostlé suspenze *A. tumefaciens* s vektorem pVKH nesoucím konstrukt

DR5rev::GFP. Misky byly uzavřeny parafilmem a kultivovány v kultivačním prostoru C ve tmě papírové krabice po dobu dvou dnů.

Následně byly protokormy přeneseny pinzetou do sterilních plastových zkumavek a sedimentovány centrifugací (Universal 32R, Hettich Zentrifugen; 1 min; 5000 RPM; 20°C). Odstraněna většina supernatantu, připipetováno 18 ml SU4 média s claforanem (250 mg/l) a hygromycinem (18 mg/l), promícháno, centrifugováno opět za stejných podmínek.

Vrstva se sedimentovanými protokormy (mírně nade dnem) odebrána ustříženou 10 ml špičkou (automatickou pipetou) a přenesena do sterilní 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Dolito médiem SU4 s claforanem a hygromycinem na objem cca 50 ml.

Regenerace rostlin

Protokormy byly ve zmíněném tekutém SU4 médiu s claforanem a hygromycinem kultivovány za stálého třepání ve tmě papírové krabice na třepačce KS250 basic (IKA Labortechnik; 150 RPM) v kultivačním prostoru B po dobu 24 dnů. Po této době byly přesázeny pinzetou na tuhé médium 1/4-2 s claforanem (250 mg/l) a hygromycinem (18 mg/l) do plastových Petriho misek průměru 9 cm. Misky byly zaparafilmovány a kultivovány ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru C.

2.10. Analýza endogenních sacharidů hub

Tento experiment byl dosud proveden pouze jako orientační.

Prvotní úmysl analyzovat mycelium vyrostlé na agarových médiích se ukázal nevhodný. Mycelium hub se velmi špatně odebírá a nelze jej zbavit zbytků média, které mohou výsledky měření ovlivňovat. Houby byly proto k tomuto účelu kultivovány v tekutém médiu ČA.

Mycelium bylo zaočkováno do přibližně 25 ml tekutého média ČA ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách zakrytých alobalem. Následující kultivace probíhala ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru B po dobu 36 dnů. S kulturami po tuto dobu nebylo hýbáno.

Sklizení kultur

Suspenze mycelia v kultivačním médiu byla přelita na kovové sítko (Screens for CD-1, Size: 40 mesh, Sigma-Aldrich) vložené v plastové Büchnerově nálevce. Nálevka byla

připojena přes odsávací baňku k vývěvě (KNF Neuberger Laboport) a kapalina vakuově odsávána.

Po odsátí kultivačního média bylo mycelium 3x promyto pufrům HEPES a po jeho úplném odsátí přemístěno do plastových nádobek, zamraženo v tekutém dusíku a dále zpracováno stejně, jako vzorky rostlinného materiálu (popsáno v kapitole 2.1.6.). Jedinou odlišností bylo ošetření ultrazvukem po dobu 30 minut místo 15.

složka	množství na 100 ml	výsledná koncentrace
HEPES	1,42 g	50 mM
MgCl ₂	9,5 mg	1mM
pH 7,6 (1M KOH)		

Tabulka 2.4. - složení pufru HEPES. Pufr byl uchováván ve tmě v chladničce při +4°C.

3. Experimentální část

3.1. Vliv sacharidů na vývoj orchidejí

Orchideje jsou v raných fázích svého vývoje závislé na výživě mykorhizou. Jedněmi z významných přenášených látek jsou sacharidy a houba je pro příslušné vývojové fáze orchidejí nejspíše jediným jejich zdrojem. Charakterizace účinků sacharidů je tedy pro pochopení těchto vztahů zásadní.

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, které sacharidy mohou být využívány semenáčky vybraných orchidejí. Bylo vytvořeno médium SM, které umožňuje dobrý růst semenáček vybraných orchidejí a přitom neobsahuje žádné nedefinované složky, které by mohly obsahovat sacharidy. Jediným zdrojem sacharidů je pak v tomto médiu sacharid záměrně přidaný.

3.1.1. Vývoj raných fází semenáček na médiích s vybranými sacharidy

Cílem bylo zjistit, které sacharidy mohou být využívány semenáčky vybraných orchidejí v raných fázích vývoje.

Výsevy byly provedeny přímo na varianty SM média s jednotlivými sacharidy a kontrolní variantu bez sacharidů v plastových Petriho miskách průměru 9 cm. Byla vyseta semena DM4; OE1; ED1 a SF2. Kultivace probíhala 3 měsíce ve tmě papírové krabice, z toho 1 měsíc v kultivačním prostoru B, poté 2 měsíce v kultivačním prostoru C. Po této době byly rostliny hodnoceny a v případě OE1 odebrány pro analýzu endogenních sacharidů. Semena SF2 se ukázala příliš stará a v tomto experimentu nevyklíčila. Experimenty se zbývajícími třemi druhy budou vyhodnoceny v samostatných kapitolách.

označení	přidaný sacharid	koncentrace
MAL	maltóza	50 mM
SOR	sorbitol	100 mM
GLU	glukóza	100 mM
MAN	manitol	100 mM
FRU	fruktóza	100 mM
RAF	rafinóza	33,3 mM
GAL	galaktóza	100 mM
SUC	sacharóza	50 mM
LAK	laktóza	50 mM
F+G	fruktóza + glukóza	50 + 50 mM
NIC	bez sacharidů	0 mM

Tabulka 3.1. – varianty experimentů zabývajících se vývojem semenáček na médiích s různými sacharidy.

3.1.1.1. Vývoj semenáčků *Ophrys eleonora* v raných fázích na vybraných sacharidech

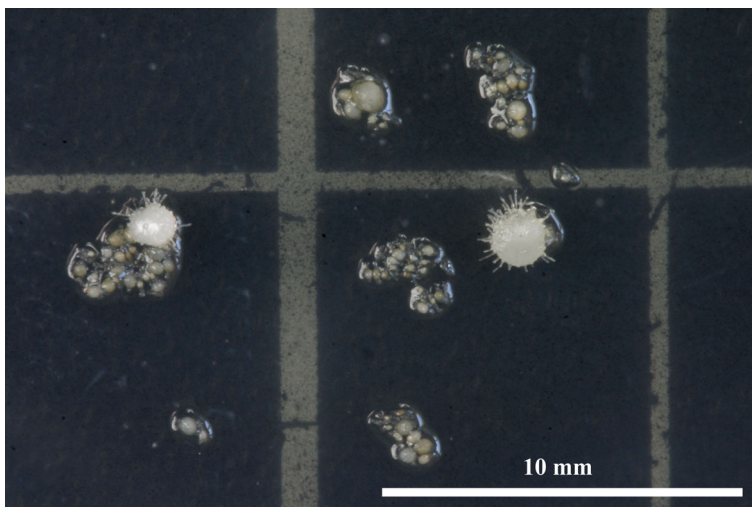
Byla vyseta semena OE1. Na vyrostlých protokormech byl hodnocen průměr protokormů, délka vlásků a obsah endogenních sacharidů.

Průměr protokormů zachycuje graf 3.1. Největší protokormy narostly na médiu se sacharózou. Jen o něco menší protokormy narostly na médiích s glukózou a rafinózou. Nejmenší protokormy kupodivu nebyly na médiu bez sacharidů, ale na médiu s galaktózou. Protokormy na médiích s fruktózou a manitolem byly průměrně stejně velké, jako na médiu bez sacharidů. Na médiích s laktózou, maltózou, sorbitolem a kombinací fruktózy s glukózou byly protokormy velikostí mezi variantou bez sacharidů a variantou se samotnou glukózou. Rozdíly mezi popsányými kategoriemi byly statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %. Zajímavé je, že na médiích s fruktózou byly vyrostlé protokormy dosti variabilní. Většina jich zůstala v raných fázích svého vývoje, malá část však tuto fázi překonala (viz. odlehle hodnoty grafu 3.1.A) a vyvíjela se dále v protokormy srovnatelné velikosti, jako na sacharóze či glukóze (obr. 3.1.).

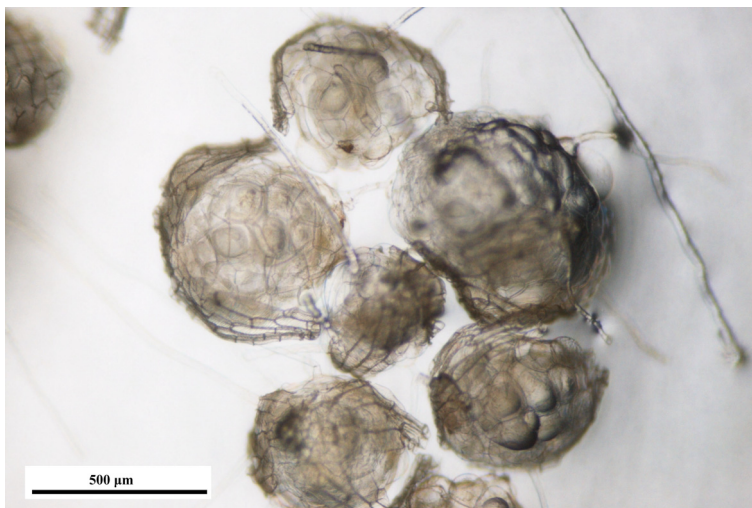
Délku vlásků zachycuje graf 3.2.. Nejdelší vlásky byly na médiu s rafinózou. Jen o málo kratší pak vyrostly na médiích se sacharózou a laktózou (rozdíl neprůkazný). Na médiu s galaktózou se vlásky netvořily vůbec. Podobných délek, jako na médiu bez sacharidů dosahovaly vlásky na médiích s fruktózou, manitolem a kombinací fruktózy s glukózou. Délka vlásků na glukóze, maltóze a sorbitolu byla mezi hodnotami pozorovanými na médiu bez sacharidů a na médiu se sacharózou.

Obsah endogenních sacharidů zobrazuje graf 3.3.. Vzhledem k malým rozměrům rostlin v mnohých variantách nebylo možné analyzovat dostatečné množství vzorků pro statistické zpracování. Ze získaných výsledků lze však přesto poukázat na zajímavé souvislosti. Na médiu bez sacharidů se v rostlinném materiálu nepodařilo detekovat žádné endogenní sacharidy. Rostliny na médiu s galaktózou neobsahovaly v detekovatelné míře žádný další sacharid. Vezmeme-li v úvahu velikost protokormů v této variantě se zdá velice pravděpodobné, že galaktóza vůbec metabolizována není. Na médiích s laktózou, maltózou a manitolem byla podobná situace, kdy protokormy obsahovaly velké množství příslušného dodaného sacharidu a menší množství dalších sacharidů. Tyto sacharidy již tedy metabolizovány být mohou. V protokormech na médiu s maltózou byly přítomné dva další sacharidy, jež se však s využitím dostupných standardů nepodařilo identifikovat. V protokormech na médiu s laktózou byla kromě

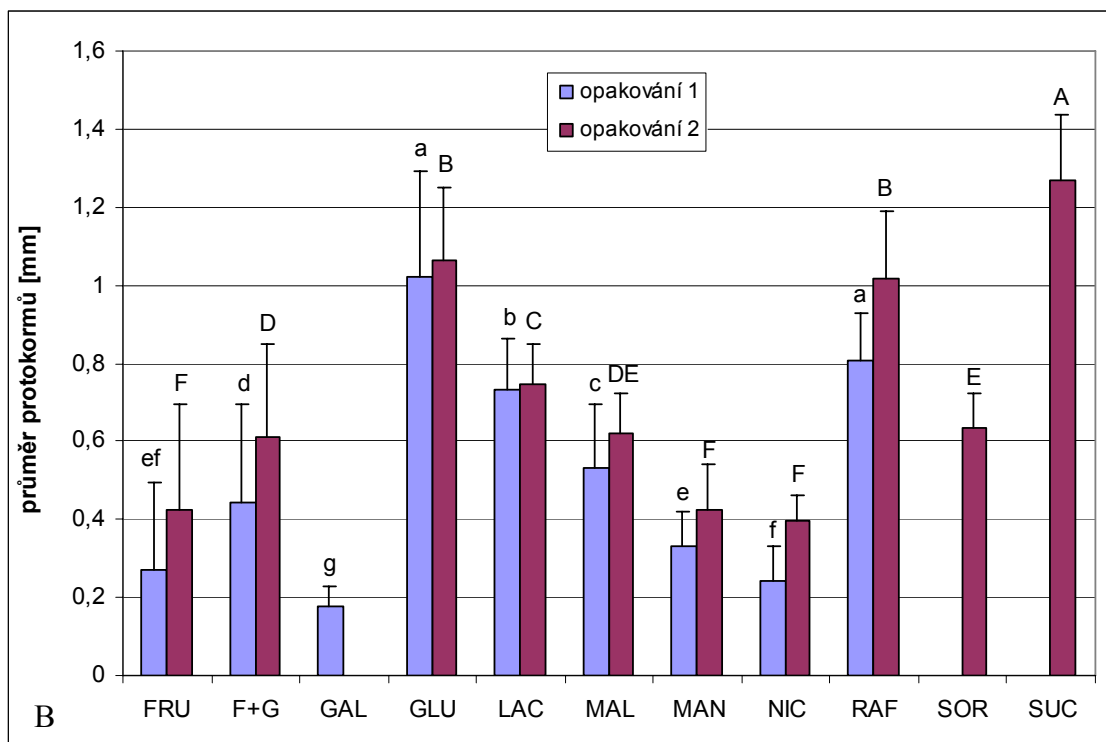
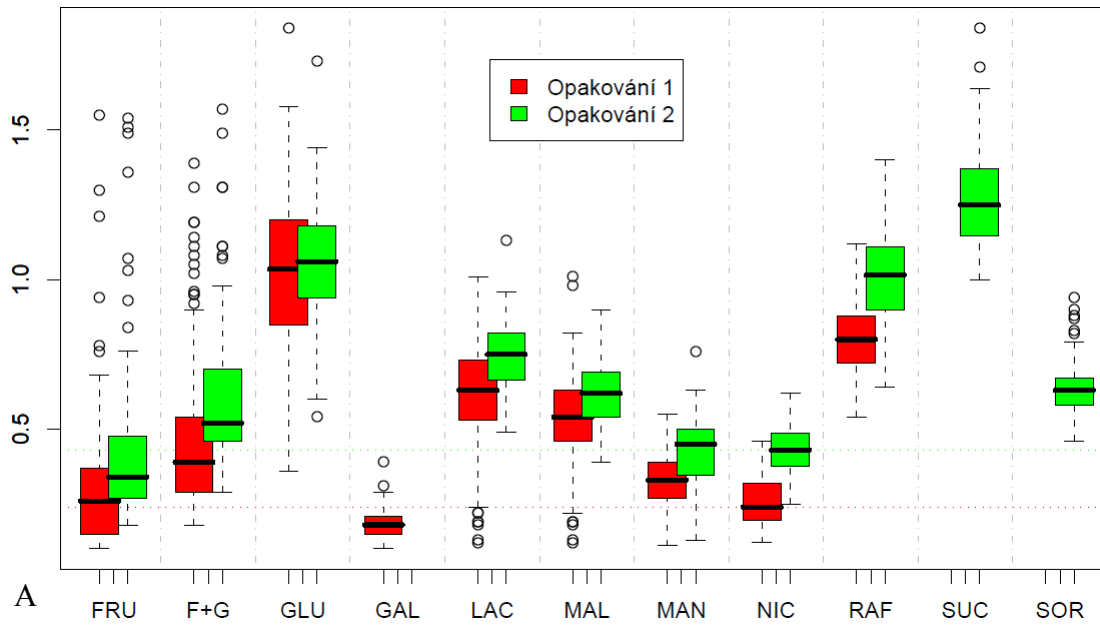
jednoho z těchto neidentifikovaných sacharidů přítomná sacharóza. V protokormech na médiu s manitolem byla kromě dvou neidentifikovaných sacharidů detekovatelná malá množství fruktózy, glukózy a sacharózy. V protokormech na ostatních variantách již bylo vyšší zastoupení sacharózy; méně na médiích s fruktózou a její kombinaci se sacharózou, více pak na médiích s glukózou, rafinózou, sorbitolem a nejvíce na médiu se sacharózou. Exogenně dodaný sacharid v protokormech tvořil vždy většinu obsahu endogenních sacharidů s výjimkou rafinózy, která tvořila méně než 10 % obsahu celkových sacharidů.



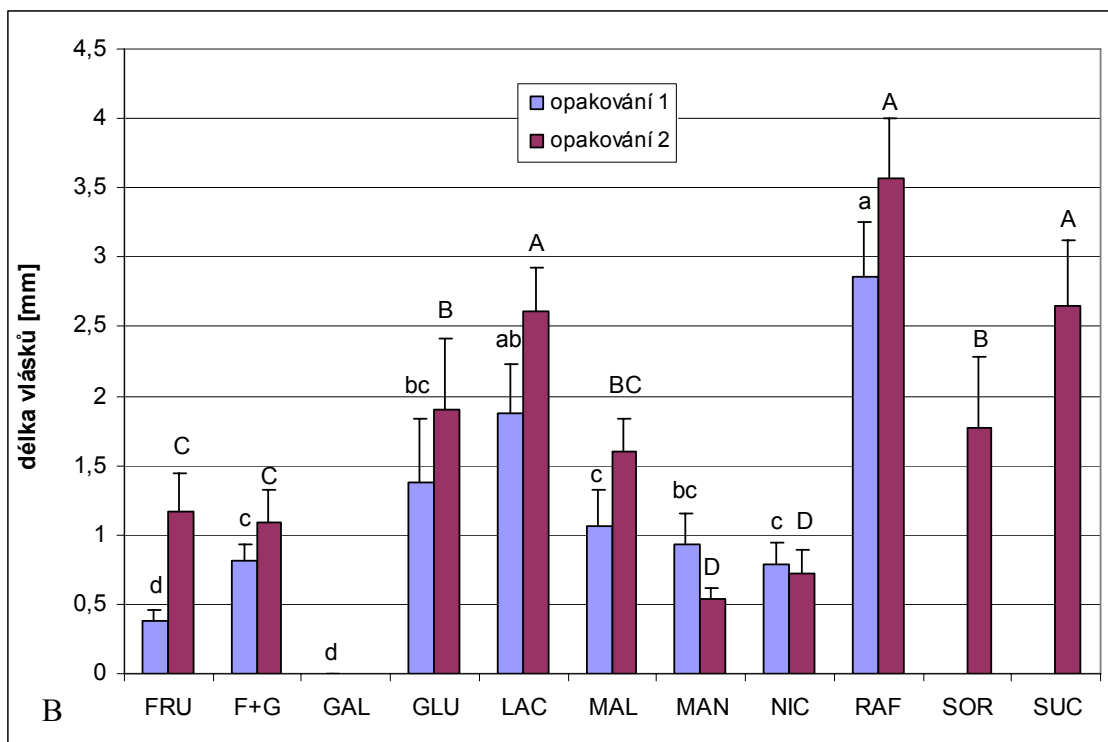
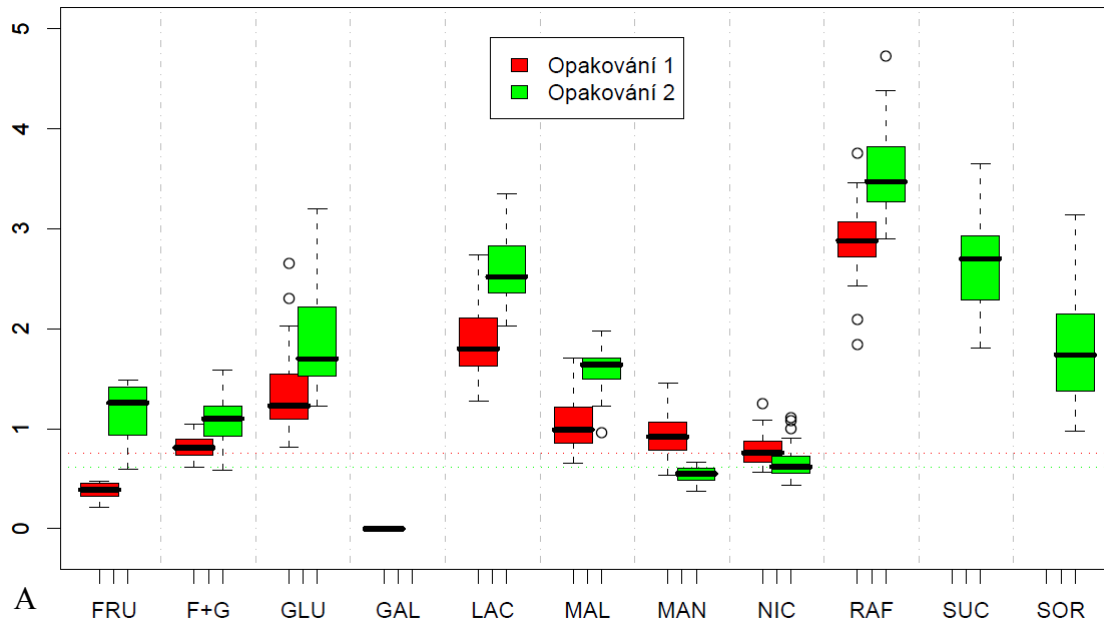
**obrázek 3.1. –
protokormy *Ophrys
eleonora* na médiu
s fruktózou. OE1 po
třech měsících
kultivace.**



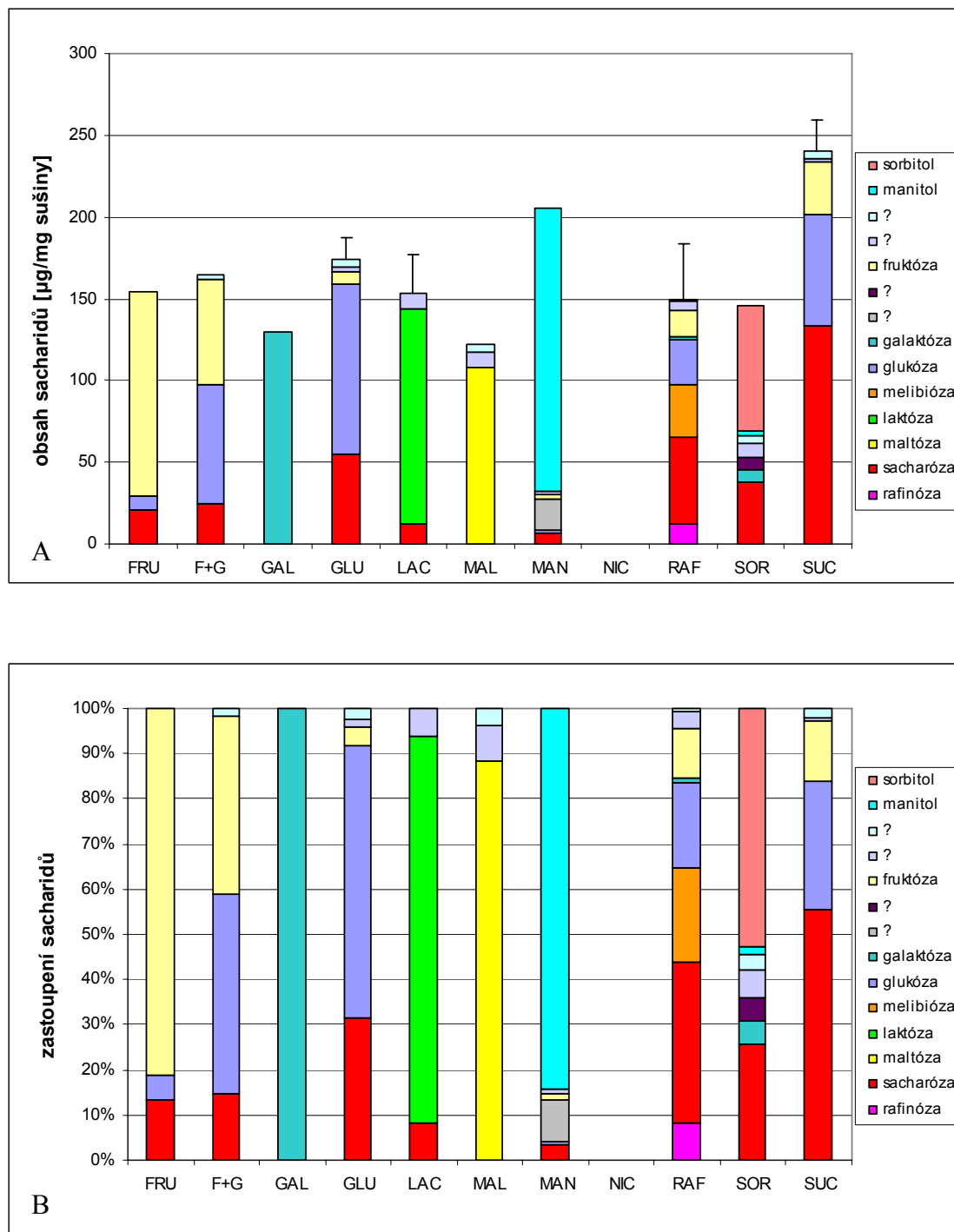
obrázek 3.2. – protokormy
Ophrys eleonora na médiu
bez sacharidů. OE1 po
třech měsících kultivace.



Graf 3.1. – Průměr protokormů *Ophrys leonorae* na médiích s různými sacharidy. A,B: různá vynesení stejných dat. Rostliny OE1. Na ose x jednotlivé varianty, na ose y průměr protokormů [mm]. Úsečky v grafu B zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.



Graf 3.2. – Délka vlásků *Ophrys eleonora* na médiích s různými sacharidy. A,B: různá vynesení stejných dat. Rostliny OE1. Na ose x jednotlivé varianty, na ose y délka vlásků [mm]. Úsečky v grafu B zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

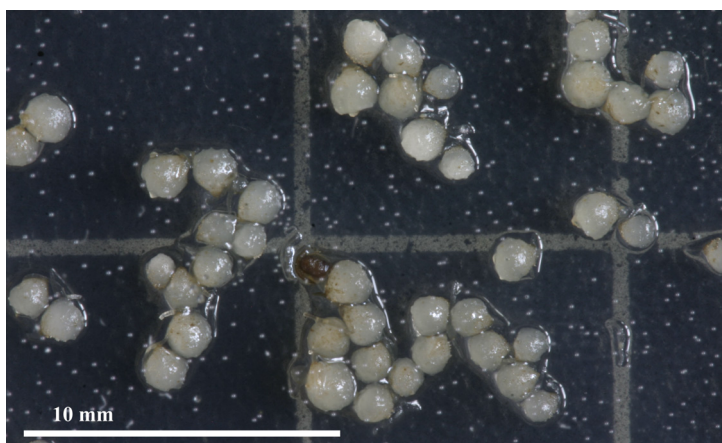


Graf 3.3. – Endogenní sacharidy protokormů *Ophrys eleonora*. A: obsah sacharidů. B: zastoupení sacharidů. Rostliny OE1. Na ose x jednotlivé varianty. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

3.1.1.2. Vývoj semenáčků *Oeceoclades decaryana* v raných fázích na vybraných sacharidech

Tento druh byl vybrán jako zástupce podčeledi *Epidendroideae*. Protokormy vůbec nevytvářejí vlásky, proto byl hodnocen pouze průměr protokormů. Experiment byl proveden pouze v jediném opakování. Kromě konečného hodnocení po 3 měsících kultivace byl průměr protokormů hodnocen také 5 týdnů po výsevu. Výsledky zobrazuje graf 3.4.. Protokormy na médiu s laktózou nerostly, dosáhly pouze velikosti protokormů na médiu bez sacharidů (obr. 3.4.). Na médiích s maltózou a rafinózou protokormy přirůstaly pouze velice pomalu. Na médiích se zbylými sacharidy, fruktózou, glukózou, sacharózou a kombinací fruktózy s glukózou, rostly protokormy velice dobře (obr. 3.3.).

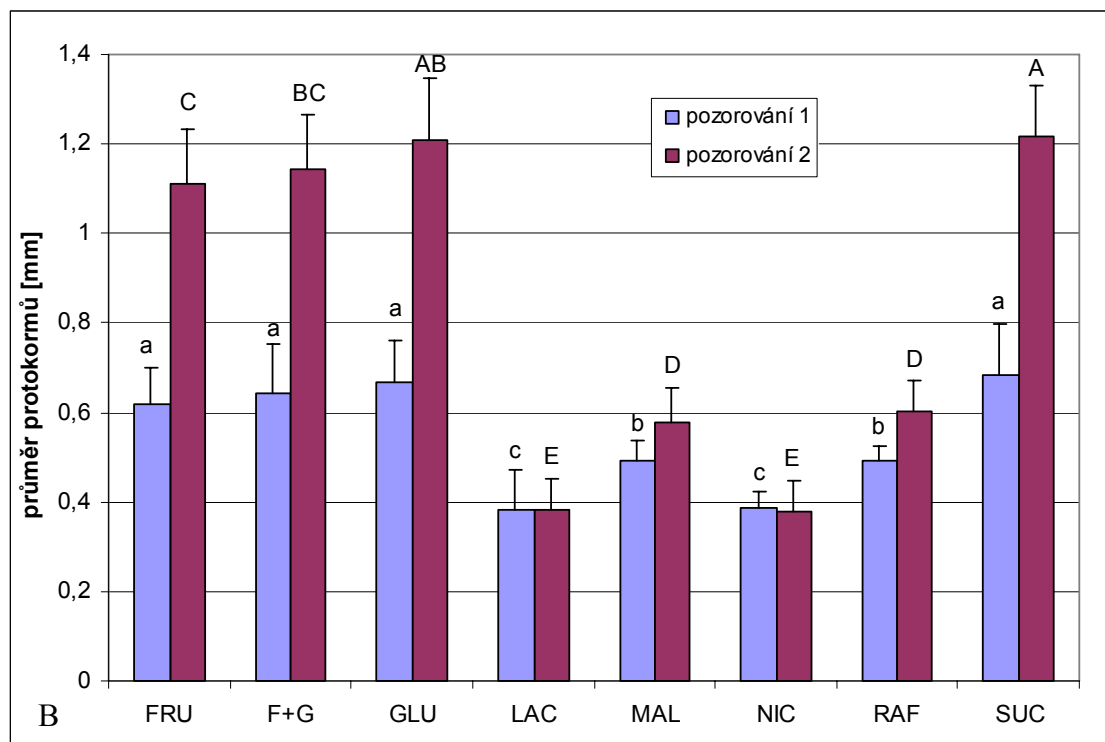
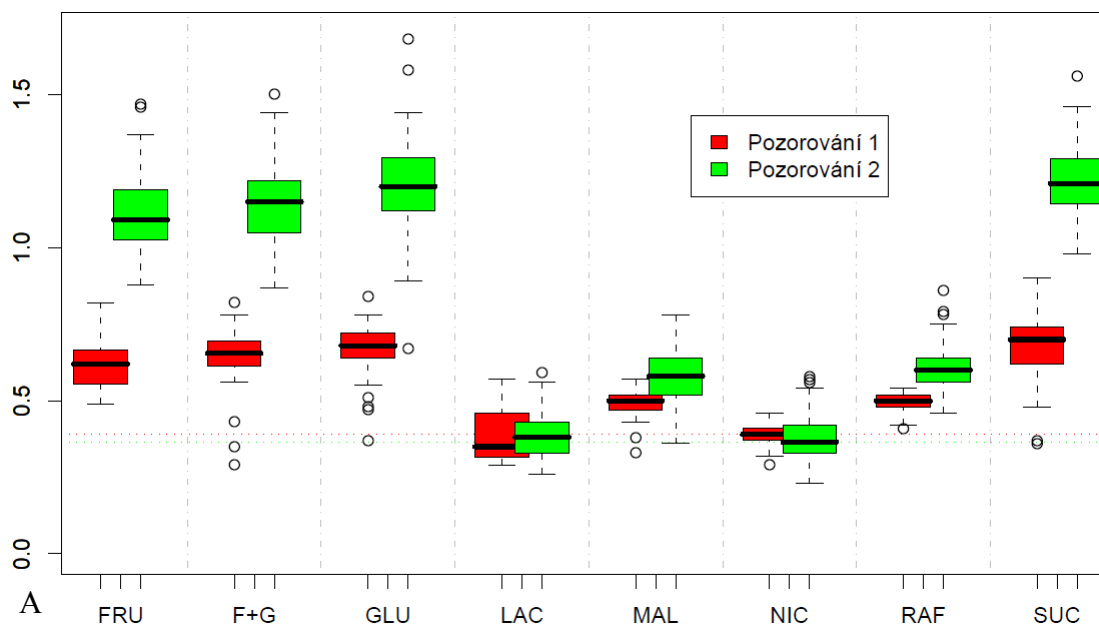
Nejspíše tedy mohou dobře využívat fruktózu, glukózu i sacharózu. Maltóza a rafinóza mohou být metabolizovány jen v malé míře a laktóza nejspíše využívána není.



**obrázek 3.3. –
protokormy
*Oeceoclades
decaryana* na médiu
se sacharózou. ED1
po třech měsících
kultivace.**



**obrázek 3.4. –
protokormy
*Oeceoclades
decaryana* na médiu
bez sacharidů. ED1
po třech měsících
kultivace.**

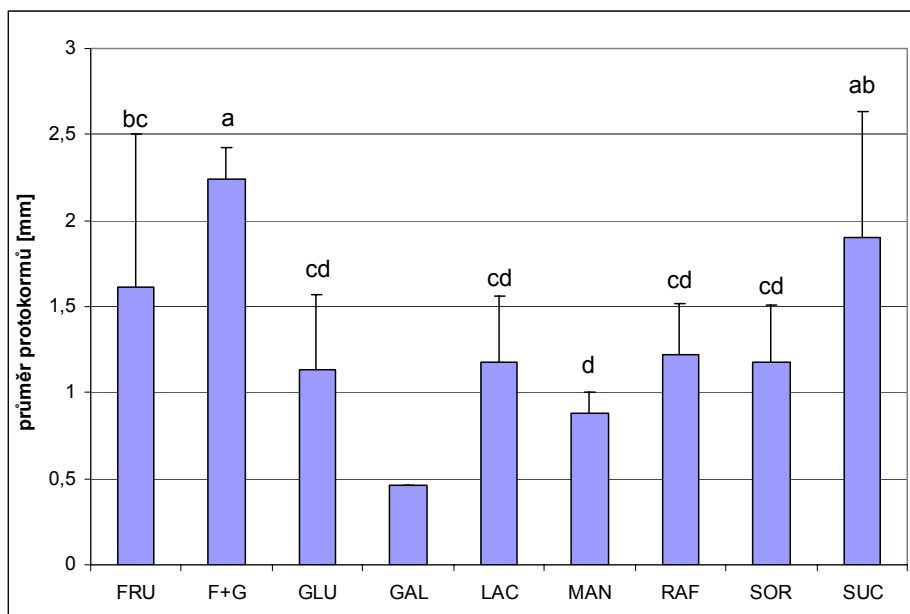


Graf 3.4. – Průměr protokormů *Oeceoclades decaryana* na médiích s různými sacharidy. A,B: různá vynesení stejných dat. Rostliny ED1. Na ose x jednotlivé varianty, na ose y průměr protokormů [mm]. Úsečky v grafu B zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

3.1.1.3. Vývoj semenáčků *Dactylorhiza majalis* v raných fázích na vybraných sacharidech

Výsev tohoto druhu se nezdařil. Vyklíčila pouze velmi malá část semen. Nebyla proto hodnocena ani délka vlásků, ani obsah endogenních sacharidů. Jediným výstupem experimentu je tedy průměr protokormů na médiích s různými sacharidy, který zachycuje graf 3.5..

Protokormy dosahovaly největších velikostí na médiích s fruktózou, sacharózou a kombinací fruktózy s glukózou. Menší velikosti pak dosáhly protokormy na médiích s glukózou, laktózou, rafinózou a sorbitolem. Ještě o trochu menší protokormy pak vyrostly na médiu s manitolem a v době hodnocení experimentu byly již narozdíl od ostatních variant všechny odumřelé. Na médiu bez sacharidů nebyly pozorovány žádné vyrostlé protokormy a na médiu s galaktózou pouze jediný, velmi malý protokorm. Nejspíše tedy galaktóza využívána není. Glukóza, laktóza, manitol, rafinóza a sorbitol mohou být částečně metabolizovány. Fruktóza a sacharóza pak umožňují dobrý růst semenáčků. Relativně špatný růst semenáčků na médiu s glukózou by nasvědčoval možné inhibiční roli glukózy v raných fázích vývoje.

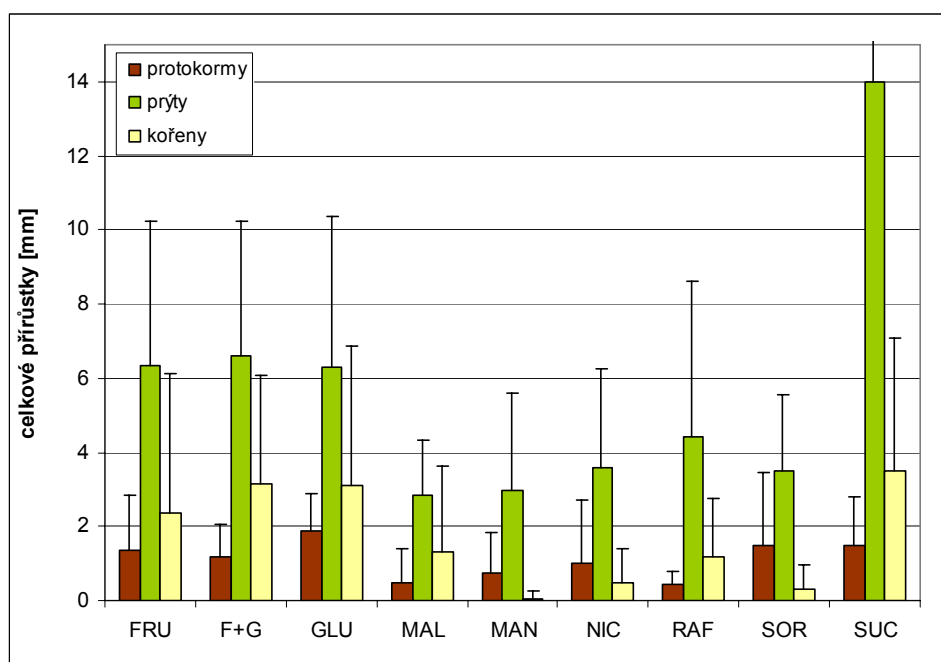


Graf 3.5. – Průměr protokormů *Dactylorhiza majalis* na médiích s různými sacharidy. Rostliny DM1. Na ose x jednotlivé varianty. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

3.1.2. Vývoj semenáčků v pozdějších fázích na vybraných sacharidech

Tento experiment byl založen pro ověření možných rozdílů ve využívání sacharidů semenáčky v různých fázích vývoje. Byly použity předpěstované semenáčky DM1 (vysety do 100 ml Erlenmeyerových baněk s 50 ml média 1/4-2, kultivovány ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru B po dobu 8 měsíců). Rostliny byly nasázeny do plastových Petriho misek průměru 9 cm s variantami SM média s různými sacharidy a kontrolní variantou bez sacharidů. Použité sacharidy a jejich označení byly stejné, jako u předchozích experimentů (kapitola 3.1.1.). Kultivace probíhala na světle (Petriho misky ve vertikální poloze ve stojánku) v kultivačním prostoru D po dobu 3 měsíců. Po této době byly hodnoceny přírůstky délky a šířky protokormů, délky prýtů a délky kořenů. Rostliny byly zároveň odebrány pro analýzu endogenních sacharidů.

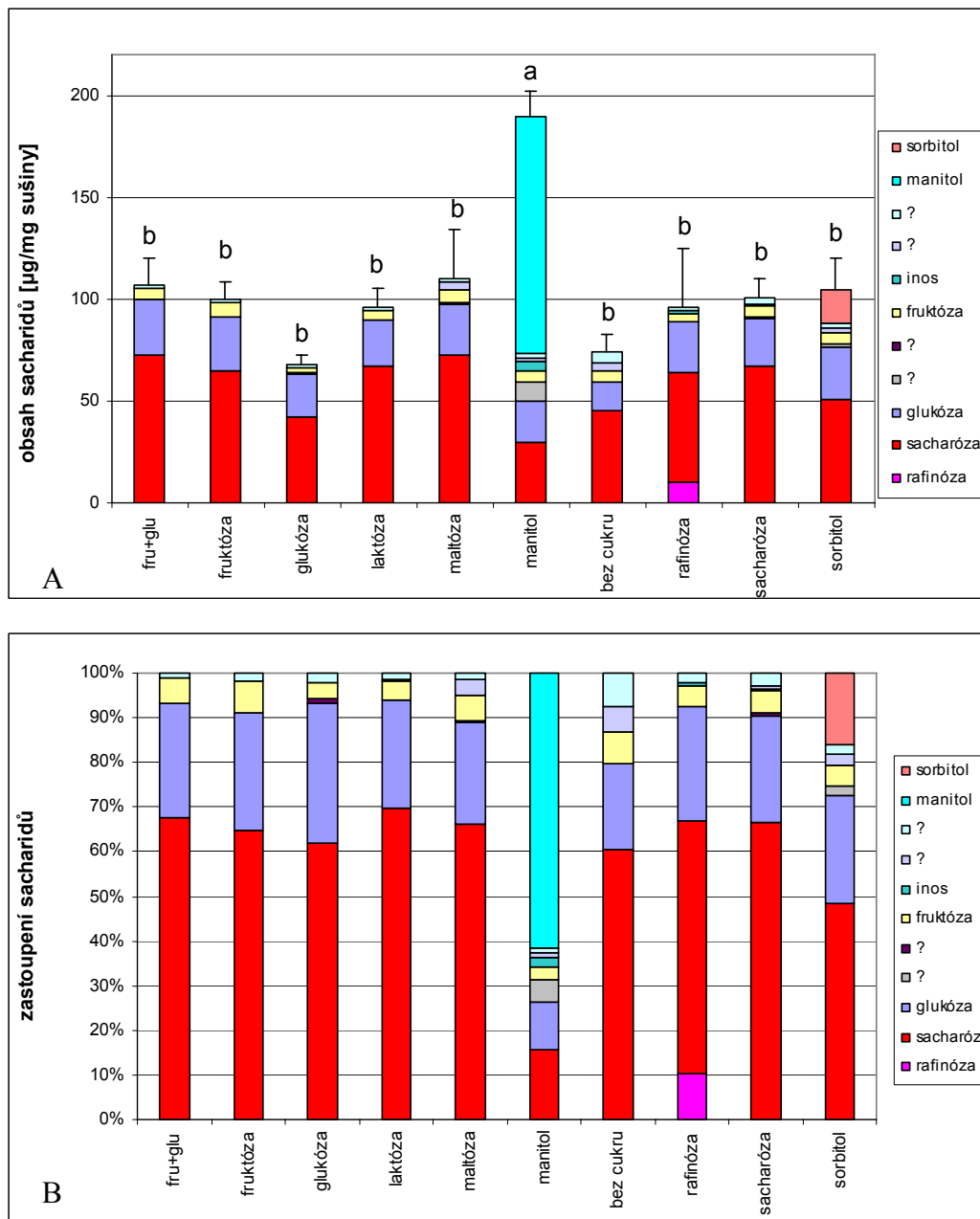
Endogenní sacharidy byly ve všech variantách poměrně podobné. Největší zastoupení měla sacharóza následovaná především glukózou a malým množstvím fruktózy. Výjimkou byly rostliny na médiu s manitolem, které tento sacharid akumulovaly ve vysokých koncentracích a tvořil tak většinu celkového obsahu sacharidů. Kromě zmíněných sacharidů byly ve významném množství zastoupeny ještě sorbitol u varianty na médiu se sorbitolem a rafinóza u varianty na médiu s rafinózou.



Graf 3.6. –Přírůstky semenáčků *Dactylorhiza majalis* na médiích s různými sacharidy. Rostliny DM1. Na ose x jednotlivé varianty. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky (hodnota směrodatné odchylky prýtů ve variantě SUC: 15,35). Statisticky průkazné rozdíly značí tabulka.

varianta	GLU	SUC	FRU	F+G	SOR	NIC	MAL	MAN	RAF
protokormy	a	ab	ab	ab	bc	c	c	c	c
prýty	b	a	b	ab	c	c	c	c	c
kořeny	ab	a	ab	a	b	b	ab	b	b

tabulka 3.2. – data ke grafu 3.6. Odlišná písmena značí rozdíly statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.



Graf 3.7. – Endogenní sacharidy semenáčků *Dactylorhiza majalis*. A: obsah sacharidů. B: zastoupení sacharidů. Rostliny DM1. Na ose x jednotlivé varianty. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

varianta	veličina	rafinóza	sacharóza	glukóza	?	?	fruktóza	inositol	?	?	manitol	sorbitol	celkem
LAC	průměr	0,00	66,92	23,09	0,00	0,00	4,06	0,00	0,34	1,35	0,00	0,00	95,75
	SD	0,00	9,10	3,07	0,00	0,00	1,22	0,00	0,68	0,39	0,00	0,00	13,05
MAL	průměr	0,00	72,72	24,82	0,00	0,55	6,16	0,00	3,99	1,56	0,00	0,00	109,80
	SD	0,00	7,93	3,01	0,00	0,77	1,55	0,00	3,36	1,33	0,00	0,00	8,79
MAN	průměr	0,00	30,00	20,17	9,31	0,00	5,34	4,26	1,62	2,32	116,90	0,00	189,94
	SD	0,00	1,56	2,69	2,14	0,00	1,85	0,74	1,44	0,85	9,18	0,00	5,17
SOR	průměr	0,00	50,89	25,19	2,21	0,00	5,00	0,00	2,48	2,50	0,00	16,62	104,89
	SD	0,00	1,77	2,88	0,81	0,00	2,39	0,00	2,32	1,41	0,00	2,29	9,73
SUC	průměr	0,00	66,70	24,17	0,00	0,53	5,04	0,25	0,93	2,70	0,00	0,00	100,34
	SD	0,00	18,63	6,40	0,00	0,78	1,27	0,51	0,82	1,48	0,00	0,00	24,31
FRU	průměr	0,00	64,90	26,00	0,00	0,00	7,34	0,00	0,00	1,72	0,00	0,00	99,97
	SD	0,00	13,04	4,17	0,00	0,00	2,77	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	12,24
GLU	průměr	0,00	41,75	21,34	0,00	0,63	2,52	0,00	0,00	1,35	0,00	0,00	70,51
	SD	0,00	4,36	2,31	0,00	0,64	0,47	0,00	0,00	0,68	0,00	0,00	8,19
F+G	průměr	0,00	72,26	27,28	0,00	0,00	5,99	0,00	0,00	1,21	0,00	0,00	106,74
	SD	0,00	19,42	5,94	0,00	0,00	2,75	0,00	0,00	1,17	0,00	0,00	28,38
RAF	průměr	9,85	54,49	24,59	0,00	0,00	4,27	0,89	0,00	1,98	0,00	0,00	96,07
	SD	3,45	1,23	3,58	0,00	0,00	1,42	1,26	0,00	0,23	0,00	0,00	9,42
NIC	průměr	0,00	45,04	14,30	0,00	0,00	5,21	0,00	4,29	5,52	0,00	0,00	74,36
	SD	0,00	6,97	6,90	0,00	0,00	2,51	0,00	0,40	0,85	0,00	0,00	15,30

tabulka 3.3.- data ke grafu 3.7. (SD: směrodatná odchylka).

varianta	veličina	rafinóza	sacharóza	maltóza	laktóza	melibióza	glukóza	galaktóza	?	?	fruktóza	?	?	manitol	sorbitol	celkem
F+G	průměr	0,00	24,40	0,00	0,00	0,00	72,68	0,00	0,00	0,00	64,94	0,00	2,57	0,00	0,00	164,58
FRU	průměr	0,00	20,63	0,00	0,00	0,00	8,54	0,00	0,00	0,00	124,88	0,00	0,00	0,00	0,00	154,05
GAL	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	130,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	130,09
GLU	průměr	0,00	54,63	0,00	0,00	0,00	104,80	0,00	0,00	0,00	7,34	2,69	4,29	0,00	0,00	173,75
	SD	0,00	6,29	0,00	0,00	0,00	7,48	0,00	0,00	0,00	0,38	0,51	1,62	0,00	0,00	13,17
LAC	průměr	0,00	12,54	0,00	131,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,25	0,00	0,00	0,00	153,49
	SD	0,00	3,67	0,00	26,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	0,00	0,00	23,03
MAL	průměr	0,00	0,00	108,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,69	4,51	0,00	0,00	122,31
MAN	průměr	0,00	6,83	0,00	0,00	0,00	1,90	0,00	18,83	0,00	2,79	1,85	0,00	172,78	0,00	204,98
NIC	průměr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RAF	průměr	12,12	53,48	0,00	0,00	31,49	27,99	1,64	0,00	0,00	16,21	5,92	0,86	0,00	0,00	137,61
	SD	9,77	7,69	0,00	0,00	12,65	10,61	1,20	0,00	0,00	4,42	0,98	1,06	0,00	0,00	33,58
SOR	1	0,00	37,65	0,00	0,00	0,00	0,00	7,38	0,00	7,59	0,00	9,02	5,01	2,21	76,92	145,78
SUC	průměr	0,00	133,58	0,00	0,00	0,00	68,02	0,00	0,00	0,00	31,96	2,02	4,73	0,00	0,00	240,30
	SD	0,00	9,98	0,00	0,00	0,00	5,70	0,00	0,00	0,00	3,19	0,52	0,13	0,00	0,00	18,96

tabulka 3.4. - data ke grafu 3.3. (SD: směrodatná odchylka, uvedena pouze pokud byly změřeny 3 nezávislé vzorky).

3.1.3. Využití trehalózy

Experimenty zaměřující se na možnost využití trehalózy byly z technických důvodů založeny odděleně. Rostliny byly pěstovány v plastových Petriho miskách průměru 6 cm variantami SM média se sacharidy glukózou, sacharózou, trehalózou a kontrolní variantou bez sacharidů. Označení bylo obdobné předchozím experimentům:

označení	přidaný sacharid	koncentrace
GLU	glukóza	100 mM
SUC	sacharóza	50 mM
TRE	trehalóza	50 mM
NIC	bez sacharidů	0 mM

tabulka 3.5. – varianty experimentů zabývajících se využitím trehalózy

Byly založeny dva experimenty:

- 1) výsev *Dactylorhiza majalis* (DM3). Kultivace ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru D po dobu 4 měsíců.
- 2) přesázení semenáčků *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata* (DN1) na experimentální média. Kultivace ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru D po dobu 4 měsíců. (Předpěstovány: výsev do 100 ml Erlenmeyerových baněk s cca 50 ml média 1/4-2, kultivovány 5 měsíců ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru B, poté 3 měsíce v kultivačním prostoru F.)

Po výše uvedené době kultivace byly rostliny hodnoceny a v případě DN1 odebrány pro analýzu endogenních sacharidů.

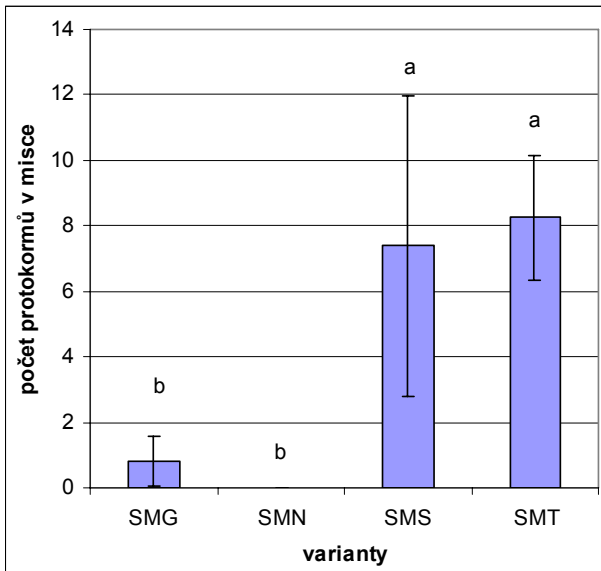
Výsev *Dactylorhiza majalis*

Semena v tomto experimentu velmi špatně klíčila. V jednotlivých Petriho miskách vyrostlo jen malé množství protokormů. Jediným vyhodnocením je tak množství velkých, zdravých, světlých protokormů vyrostlých v jednotlivých Petriho miskách (graf 3.8.). I tyto výsledky však jasně dokládají využitelnost trehalózy semenáčky v raných fázích vývoje *Dactylorhiza majalis*. Dále poukazují na možný inhibiční účinek glukózy během raných fází vývoje po vyklíčení, předpokládaný již v experimentu s výsevem tohoto druhu na ostatní sacharidy (kapitola 3.1.1.3.).

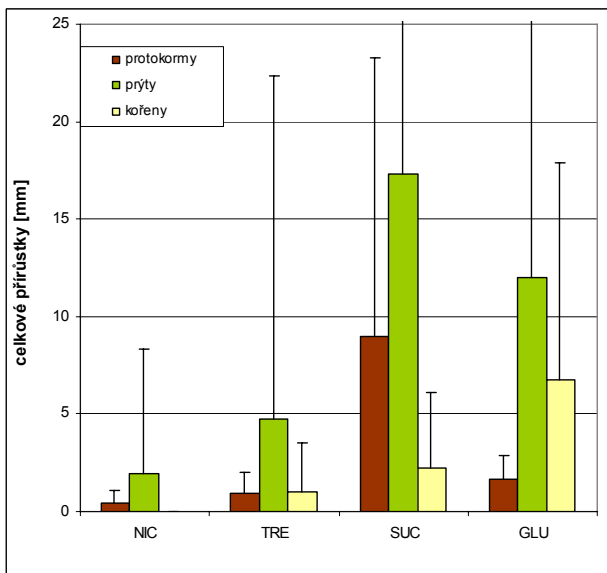
Růst semenáčků *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*

Největší přírůstky semenáčků byly pozorovány na médiu se sacharózou, nižší na médiích s glukózou, trehalózou a nejnižší na médiu bez sacharidů (graf 3.9.).

Vzájemné zastoupení endogenních sacharidů bylo u všech variant podobné. Sacharóza tvořila přes 60 % celkového obsahu sacharidů, následovaná glukózou, malým množstvím fruktózy a dalších neidentifikovaných sacharidů. Fruktóza nebyla přítomná pouze u rostlin na médiu bez sacharidů. Celkový obsah sacharidů pak byl výrazně nižší na médiu bez sacharidů, než na všech ostatních variantách (graf 3.10.).



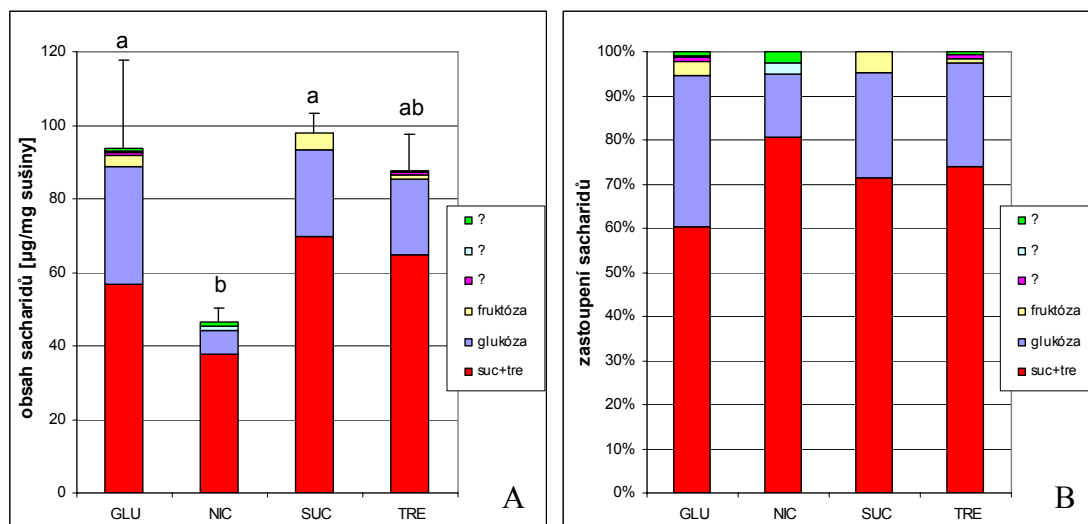
Graf 3.8. –Počet semenáčků *Dactylorhiza majalis* na médiích s různými sacharidy. Rostliny DM3. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.
 SMG - SM médium s glukózou
 SMN - SM bez sacharidu
 SMS - SM médium se sacharózou
 SMT - SM médium s trehalózou



Graf 3.9. –Přírůsteky semenáčků *Dactylorhiza maculata* s.s. na médiích s různými sacharidy. Rostliny DN1. Na ose x jednotlivé varianty. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky (prýty SUC: 25,32; prýty GLU: 25,01), odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

varianta	NIC	TRE	SUC	GLU
protokormy	c	b	a	ab
prýty	c	bc	a	b
kořeny	c	bc	ab	a

Tabulka 3.6. - data ke grafu 3.9. Odlišná písmena značí rozdíly statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.



Graf 3.10. – Endogenní sacharidy semenáčků *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata*. A: obsah sacharidů. B: zastoupení sacharidů. Rostliny DN1. Na ose x jednotlivé varianty. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

varianta	veličina	suc+tre	glukóza	fruktóza	?	?	?	celkem
GLU	prumer	56,63	32,13	3,13	0,83	0,19	0,94	93,85
	SD	19,29	6,35	2,43	0,86	0,33	1,63	23,67
TRE	prumer	64,93	20,45	0,96	0,76	0,16	0,46	87,73
	SD	7,62	6,39	0,61	0,74	0,28	0,80	9,83
SUC	prumer	69,79	23,40	4,72	0,00	0,00	0,00	97,91
	SD	6,29	2,23	1,08	0,00	0,00	0,00	5,46
NIC	prumer	37,57	6,60	0,09	0,00	1,14	1,15	46,56
	SD	5,06	0,87	0,09	0,00	1,14	1,15	3,55

Tabulka 3.7. - data ke grafu 3.10. (SD: směrodatná odchylka).

3.2. Obsah endogenních sacharidů v semenech orchidejí

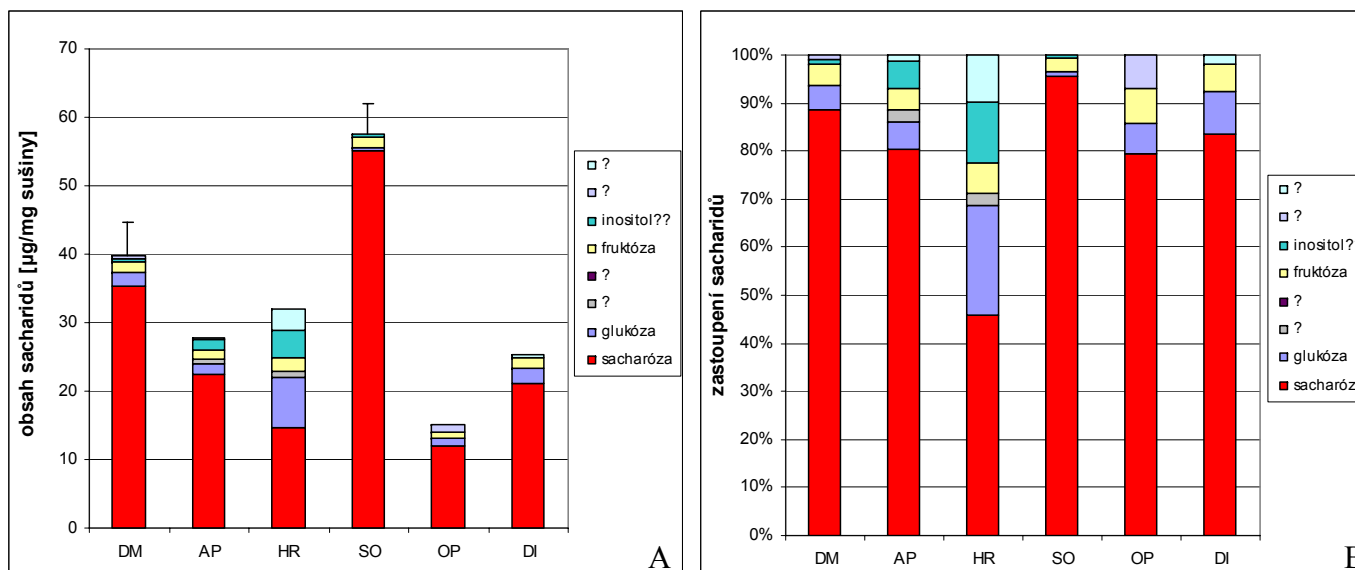
O možném obsahu rozpustných sacharidů v semenech orchidejí existuje patrně jediná zmínka (Manning et Van Staden, 1987). Jejich obsah přitom může být pro klíčení semen s malým množstvím zásobních látek významný.

Byla proto analyzována semena několika druhů orchidejí, uvedených v tabulce 3.8.. Semena byla zpracována a analyzována stejně, jako ostatní vzorky rostlinného materiálu.

druh	původ	datum sběru	změřeno vzorků
<i>Anacamptis papilionacea</i> s.s.	Albania, Bistică	6.5.2009	2
<i>Dactylorhiza incarnata</i> s.s.	v kultuře	1.9.2006	2
<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Kokořínsko	5.7.2009	3
<i>Himantoglossum robertianum</i>	Ελλαδα, Μεσοωοθνι	7.5.2009	2
<i>Orchis purpurea</i>	v kultuře	30.5.2009	1
<i>Sobralia dichotoma</i>	Peru, Machu Picchu	2008	3

Tabulka 3.8. - semena analyzovaná na obsah rozpustných sacharidů

Výsledky zobrazuje graf 3.11.. Vzhledem k malé velikosti semen bylo analyzováno pouze malé množství vzorků. Výsledky proto nebyly zpracovány statisticky (tab. 3.9.). Ve všech semenech byly detekovány endogenní rozpustné sacharidy. Hlavním sacharidem byla sacharóza a s výjimkou *Himantoglossum robertianum* tvořila nad 70 % celkových sacharidů. Dále byly obsaženy glukóza, fruktóza a u některých druhů též neidentifikované sacharidy a sacharid, který se je dle retenčních časů nejspíše inositol. U zmíněného *Himantoglossum robertianum* tvořila sacharóza pouze přes 40 % celkových sacharidů, následovaná glukózou (přes 20 %), pravděpodobným inositolem (přes 10 %), dále fruktózou a dvěma neidentifikovanými sacharidy (vše pod 10 %). Celkový obsah sacharidů byl nejvyšší u *Sobralia dichotoma*. Nižší obsah endogenních sacharidů vykazovaly *Dactylorhiza majalis*, *Himantoglossum robertianum*, *Anacamptis papilionacea* a *Dactylorhiza incarnata*. Nejnižší obsah endogenních sacharidů byl zaznamenán u *Orchis purpurea*. Výsledky jasně ukazují, že dormantní semena orchidejí obsahují rozpustné sacharidy.



Graf 3.11. – Endogenní sacharidy semen různých orchidejí. A: obsah sacharidů. B: zastoupení sacharidů. Na ose x jednotlivé rostliny: DM: *Dactylorhiza majalis*, AP: *Anacamptis papilionacea* s.s., HR: *Himantoglossum robertianum*, SO: *Sobralia dichotoma*, OP: *Orchis purpurea*, DI: *Dactylorhiza incarnata*. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů.

druh	označení	veličina	sacharóza	glukóza	?	?	fruktóza	inositol??	?	?	celkem
<i>Dactylorhiza majalis</i>	DM	průměr	35,26	2,04	0,00	0,00	1,65	0,38	0,44	0,00	39,76
<i>Dactylorhiza majalis</i>	DM	SD	3,38	0,43	0,00	0,00	0,54	0,54	0,62	0,00	4,85
<i>Anacamptis papilionacea</i> s.s.	AP	1. vzorek	23,28	1,55	0,45	0,00	0,80	0,66	0,00	0,74	27,47
<i>Anacamptis papilionacea</i> s.s.	AP	2. vzorek	21,52	1,61	0,92	0,00	1,66	2,45	0,00	0,00	28,16
<i>Himantoglossum robertianum</i>	HR	1. vzorek	14,22	6,92	0,61	0,00	2,08	3,45	0,00	1,92	29,19
<i>Himantoglossum robertianum</i>	HR	2. vzorek	15,14	7,74	0,95	0,00	1,96	4,65	0,00	4,31	34,75
<i>Sobralia dichotoma</i>	SO	průměr	55,04	0,53	0,00	0,03	1,61	0,34	0,00	0,00	57,53
<i>Sobralia dichotoma</i>	SO	SD	4,89	0,38	0,00	0,04	0,14	0,48	0,00	0,00	4,56
<i>Orchis purpurea</i>	OP	1. vzorek	12,04	0,96	0,00	0,00	1,07	0,00	1,06	0,00	15,14
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	DI	1. vzorek	25,00	0,91	0,00	0,00	1,71	0,00	0,00	0,00	27,63
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	DI	2. vzorek	17,38	3,54	0,00	0,00	1,11	0,00	0,00	1,02	23,05

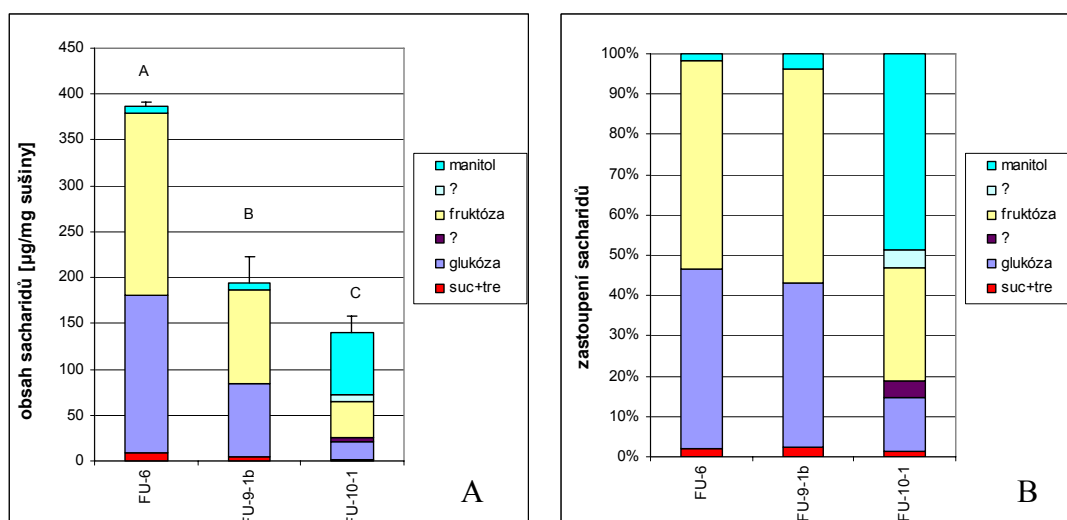
tabulka 3.9. - data ke grafu 3.11. (SD: směrodatná odchylka, uvedena pouze pokud byly změřeny 3 nezávislé vzorky).

3.3. Obsah endogenních sacharidů v mykorhizních houbách

Cílem bylo identifikovat hlavní endogenní sacharidy mykorhizních hub orchidejí.

Byly testovány 3 izoláty hub: FU-6, FU-9-1b a FU-10-1. Kultivace a zpracování vzorků je popsána v kapitole 2.8..

Všechny 3 izoláty obsahovaly významná množství monosacharidů glukózy i fruktózy. Manitol byl u izolátů FU-6 a FU-9-1b přítomen v relativně malém množství, zatímco u izolátu FU-10-1 tvořil takřka polovinu celkového obsahu sacharidů. V relativně malém množství byly u všech izolátů zastoupeny disacharidy sacharóza či trehalóza (použitý systém je neumožňuje odlišit). U izolátu FU-10-1 byla navíc detekována malá množství dvou sacharidů, jež se nám s využitím dostupných standardů nepodařilo identifikovat. Výsledky shrnuje graf 3.12.



Graf 3.12. – Endogenní sacharidy mykorhizních hub orchidejí. A: obsah sacharidů. B: zastoupení sacharidů. Suc+tre: sacharóza + trehalóza. Na ose x jednotlivé izoláty hub. Úsečky zobrazují směrodatné odchylky celkového obsahu sacharidů, odlišná písmena nad sloupci značí rozdíly v celkovém obsahu sacharidů statisticky průkazné na hladině $\alpha=0,05$ %.

izolát	veličina	sacharóza	glukóza	?	fruktóza	?	manitol	celkem
FU-6	průměr	8,55	171,96	0,00	199,43	0,00	7,05	386,99
FU-6	SD	2,55	1,25	0,00	5,41	0,00	1,29	4,63
FU-9-1b	průměr	4,54	79,23	0,00	103,30	0,00	7,29	194,36
FU-9-1b	SD	1,07	13,92	0,00	11,93	0,00	1,15	28,00
FU-10-1	průměr	1,87	18,72	5,65	39,17	6,32	67,93	139,66
FU-10-1	SD	0,55	8,07	0,49	11,54	0,44	9,00	17,92

Tabulka 3.10. – hodnoty ke grafu 3.12. [µg/mg sušiny]. SD: směrodatná odchylka.

3.4. Vliv fytohormonů na vývoj orchidejí

Kromě sacharidů se v regulaci mykorhiz mohou uplatňovat také fytohormony. Tyto látky jsou nejen syntetizovány přímo rostlinami pro ovlivnění jejich vlastního růstu, ale také houbami. Studium těchto regulací u mykorhizních rostlin tak může být pro pochopení vztahů mezi houbou a rostlinou velice přínosné.

O vlivu fytohormonů na vývoj semenáčků orchidejí existují spíše kusé informace. Dosavadní podrobné studie se pak týkaly spíše nižších koncentrací fytohormonů s ohledem na optimalizaci kultivačních postupů *in vitro* (Vejsadová 2006). Pro pochopení regulace fytohormony v malých semenáčcích orchidejí závislých na endomykorhize byly provedeny experimenty sledující vliv fytohormonů také ve vyšších koncentracích.

3.4.1. Účinek vybraných fytohormonů na rané fáze vývoje semenáčků

Kromě vývoje semenáčků není mnoho známo ani o vlivu fytohormonů na vlastní klíčení semen. Cílem těchto experimentů tak bylo jednak odlišení účinku fytohormonů na vlastní klíčení semen a dále charakterizace morfologických změn, které aplikace fytohormonů způsobí. Byla proto sledována odděleně velikost protokormů záhy po vyklíčení a pozdější morfologické změny vyvolané aplikací fytohormonů. Velikost protokormů po vyklíčení byla měřena z obrázků nasnímaných 18 dnů po výsevu a v případě potřeby také později (uvedeno u jednotlivých experimentů). Další morfologické hodnocení bylo prováděno po dvou a třech měsících od výsevu.

Experimenty byly přednostně prováděny s *Dactylorhiza majalis*. Výsevy byly provedeny přímo na varianty FM média s různými koncentracemi fytohormonů a kontrolní verzi média bez fytohormonů v plastových Petriho miskách průměru 9 cm. Všechny fytohormony byly testovány v koncentracích 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg/l. Výjimkou jsou kombinace fytohormonů BAP a NAA, jejichž koncentrace budou uvedeny v popisu příslušného experimentu. Výsevy byly vždy kultivovány ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru C. Hodnocen byl u všech variant průměr protokormů 18 dnů po výsevu pro odlišení možného účinku na klíčení, a dále v různý čas dle pozorovaných změn.

Seznam těchto experimentů uvádí tabulka 3.11..

kód výsevu	název taxonu	použité fytohormony
AP1	<i>Anacampris papilionacea</i> s.s.	ABA
AP1	<i>Anacampris papilionacea</i> s.s.	GA ₃
DF2	<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	NAA
DF2	<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	2,4-D
DM6	<i>Dactylorhiza majalis</i>	kinetin
DM6	<i>Dactylorhiza majalis</i>	kinetin ribosid
DM7	<i>Dactylorhiza majalis</i>	GA ₃
DM7	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ABA
DM8	<i>Dactylorhiza majalis</i>	kinetin
DM8	<i>Dactylorhiza majalis</i>	kinetin ribosid
DM9	<i>Dactylorhiza majalis</i>	kombinace
DM9	<i>Dactylorhiza majalis</i>	BAP
DM10	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ABA
DM10	<i>Dactylorhiza majalis</i>	GA ₃
HR1	<i>Himantoglossum robertianum</i>	ABA
HR1	<i>Himantoglossum robertianum</i>	GA ₃

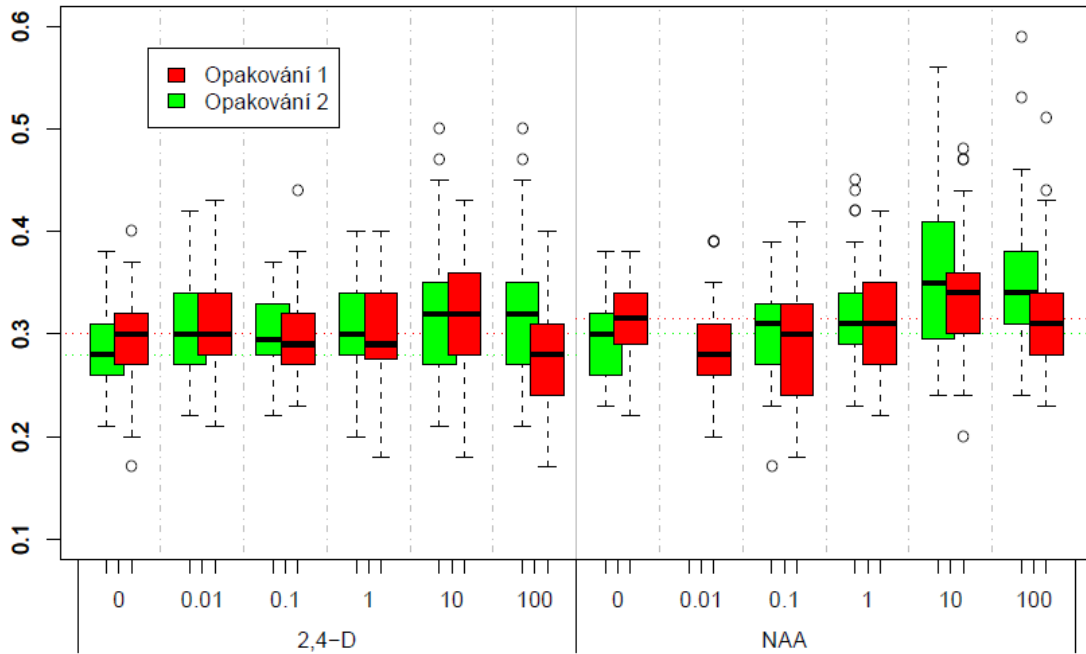
Tabulka 3.11.. – výsevy na varianty FM média s fytohormony

3.4.1.1. Vliv auxinů na semenáčky v rané fáze vývoje

Cílem tohoto experimentu byla charakterizace morfogenních účinků auxinů na protokormy rodu *Dactylorhiza*. V době zakládání experimentu však nebyla k dispozici semena zvoleného druhu *Dactylorhiza majalis* v dostatečném množství. Experiment byl proto proveden s příbuzným druhem *Dactylorhiza fuchsii* (DF2). Dále bude předpokládáno, že obecné regulační mechanismy protokormů jsou u obou těchto druhů podobné.

Vliv na velikost protokormů po vyklíčení

Hodnocení délky protokormů po 18 dnech kultivace neukázalo silnou inhibici ani stimulaci klíčení na žádné testované koncentraci fytohormonů (graf 3.13., tabulka 3.12.). Při aplikaci 2,4-D byl zřetelný inhibiční efekt vysoké koncentrace 100 mg/l pouze u prvního opakování. Při aplikaci NAA docházelo na koncentraci kolem 10 mg/l ke zřetelné stimulaci růstu a též na koncentraci 100 mg/l byly protokormy delší, než u varianty bez fytohormonů. Experiment tedy neprokázal výrazný účinek auxinů na klíčení semen této orchideje ve fyziologických koncentracích



Graf 3.13. – velikost protokormů DF2 na médiích s různou koncentrací vybraných auxinů. Na ose x koncentrace uvedených auxinů v mg/l média; na ose y průměr protokormů v mm. Na ose y délka protokormů v mm.

fytohormon	opakování	koncentrace [mg/l]					
		0	0,01	0,1	1	10	100
2,4-D	1	ab	ab	ab	ab	bc	a
	2	ab	a	ab	a	a	a
NAA	1	c	bc	bc	c	ab	c
	2	c		bc	b	a	a

Tabulka 3.12. - data ke grafu 3.13. – statisticky průkazné rozdíly mezi variantami na hladině $\alpha=0,05$ %.

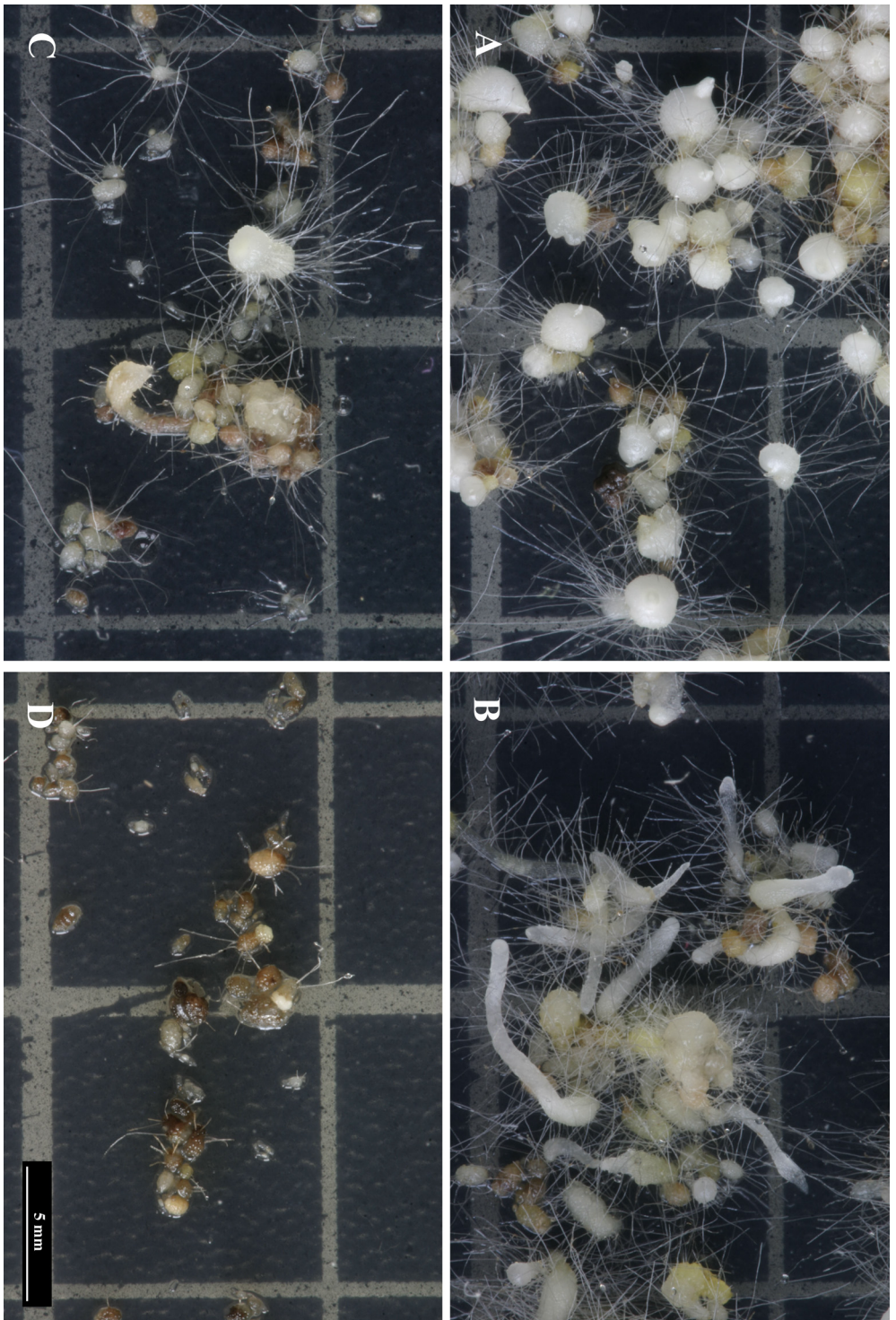
Morfologické změny rostoucích protokormů

NAA:

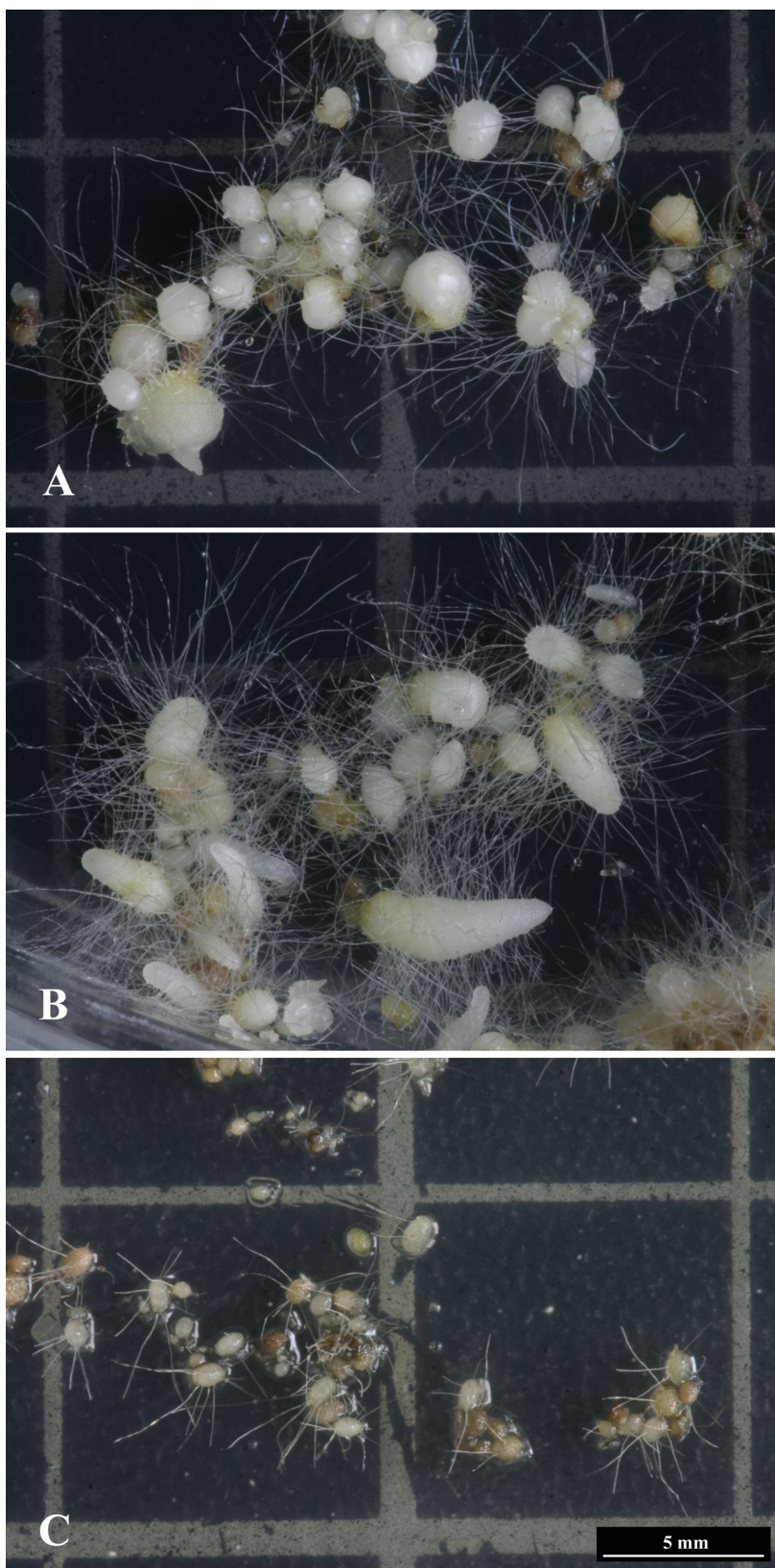
Na médiu s 0,01 mg/l NAA měla většina protokormů stejný tvar, jako na médiu bez fytohormonů (obr. 3.5. A), jen některé byly mírně protáhlejší. Na médiu s 0,1 mg/l NAA již byla většina protokormů znatelně protažená do délky. Tělo protokormu tu jakoby nerostlo rovnoměrně za vzniku kulovitěho útvaru, ale přirůstalo přednostně do délky. Na médiu s 1 mg/l byla odezva nejvýraznější (obr. 3.5.B). Většina protokormů reagovala vznikem polárně rostoucích protažených útvarů. Tyto měly zjevně původ ve vlastním těle meristému a charakter těchto „výhonů“ neodpovídal prýtu. Jen výjimečně se na konci tohoto útvaru zakládal úvar odpovídající svou strukturou meristému neošetřeného embrya pro vznik prýtu. Menší část protokormů však nereagovala tímto způsobem okamžitě, ale tvorbě popsaného polárně rostoucího útvaru u nich předcházela tvorba kalusu, který až posléze diferencoval v polárně rostoucí útvar (obr. 3.5.B vpravo). Na médiu s 10 mg/l NAA již část protokormů odumírala. Zbylé vytvářely kalusy, nebo častěji pouze menší sférické protokormy. Jen některé pak reagovaly dlouhým růstem podobným typické odezvě na koncentraci NAA 1 mg/l (obr. 3.5.C). Na médiu se 100 mg/l NAA se již vytvářely pouze malé protokormy, které postupně odumíraly (obr. 3.5.D).

2,4-D:

Na médiu s 0,01 mg/l 2,4-D měly protokormy stejný tvar, jako na médiu bez fytohormonů (obr. 3.6.A). Na médiu s 0,1 mg/l 2,4-D již byla část protokormů zřetelně protáhlejší. Na médiu s 1 mg/l reagovaly protokormy polárním růstem za vzniku protažených protokormů (širších a kratších oproti NAA) zužujících se pozvolna ke špičce (obr. 3.6.B). Růstová špička těchto protokormů však svým charakterem neodpovídala meristému neošetřených protokormů pro vznik prýtu. Na médiu s 10 a 100 mg/l 2,4-D se již tvořily pouze malé protokormy, z nichž část odumírala (obr. 3.6.C).



obrázek 3.5. – Vliv NAA na vývoj mladých protokornů. Semena DF2 byla vyseta na médium FM s různými koncentracemi NAA. Stav po 3 měsících kultivace. A: na médiu bez fytohormonů. B: na médiu s 1 mg/l NAA. C: na médiu s 10 mg/l NAA. D: na médiu se 100 mg/l NAA.



obrázek 3.6. – Vliv 2,4-D na vývoj mladých protokormů. Semena DF2 byla vyseta na médium FM s různými koncentracemi NAA. Stav po 3 měsících kultivace. A: na médiu bez fytohormonů. B: na médiu s 1 mg/l 2,4-D. C: na médiu s 10 mg/l 2,4-D.

3.4.1.2. Vliv cytokininů na semenáčky v raných fázích vývoje

Vliv na velikost protokormů

Vliv kinetinu a kinetin ribosidu

Byla založena 3 opakování experimentu, dvě výsevem DM6 a jedno výsevem DM8. Ve všech třech opakováních byl efekt kinetinu i kinetin ribosidu podobný. Koncentrace 100 mg/l již inhibovaly klíčení semen a značná část embryí ani neprotrhla osemení. Na koncentracích 10 mg/l byl naproti tomu růst semenáčků podpořen. Tento efekt byl však dobře patrný až po delší době kultivace, a zřejmě tak není způsoben ovlivněním vlastního klíčení (grafy 3.14., 3.15., 3.16.).

Vliv BAP

Byla založena 2 opakování výsevem DM9 (graf 3.17.). Pozorovaný efekt BAP byl podobný účinku kinetinu a kinetin ribosidu. Na médiu s koncentrací BAP 10 mg/l byl opět pozorovatelný stimulační efekt až po delší době kultivace. Na médiu s koncentrací BAP 100 mg/l byl patrný slabší inhibiční efekt oproti kinetinu i kinetin ribosidu. Po 18 dnech kultivace byl vývoj protokormů inhibován jen v jednom ze dvou opakování. Po dvou měsících kultivace však byly protokormy v této variantě ještě trochu větší, než ve variantě bez fytohormonů. Byly však již výrazně menší oproti variantě s koncentrací 10 g/l.

Morfologické změny rostoucích protokormů

kinetin ribosid:

Na médiu s 0,01 mg/l kinetin ribosidu již byly některé protokormy více zakulacené oproti klasickému hruškovitému tvaru protokormů na médiu bez fytohormonů (obr. 3.7.A). Na médiu s 0,1 mg/l kinetin ribosidu byly již protokormy výrazně více zakulacené. Na médiu s 1 mg/l kinetin ribosidu byla většina protokormů zhruba kulatá a některé zakládaly více meristematických vrcholů na pólu pro vznik prýtu (obr. 3.8.C). Na médiu s 10 mg/l kinetin ribosidu vyrůstaly protokormy zřetelně deformované s mohutně narostlou centrální částí. Často zakládaly více meristematických vrcholů na pólu pro vznik prýtu a tyto vrcholy byly mohutnější, než u neošetřených protokormů (obr. 3.8.B). Občas na existujícím protokormu vznikl nový pól dělicích se buněk dávající vznik menším útvarům charakteru protokormů (obr. 3.8.A). Tyto útvary se nikdy nezakládaly v blízkosti hlavního meristematického pólu. Na médiu se 100 mg/l kinetin ribosidu se již protokormy nevyvíjely. Vyrůstly pouze v malé kulaté útvary a dále v růstu nepokračovaly (obr. 3.8.D).

kinetin:

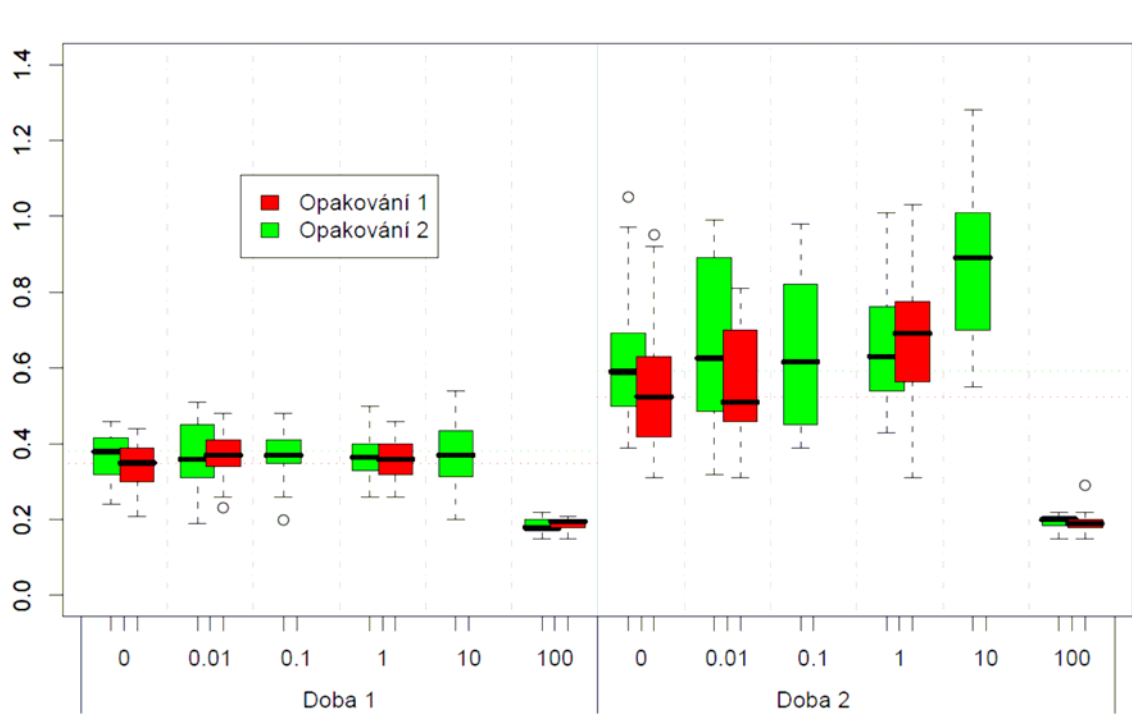
Na médiu s 0,01 a 0,1 mg/l kinetinu měly protokormy stejný tvar, jako na médiu bez cytokininů. Na médiu s 1 mg/l kinetinu již byly protokormy zřetelně kulatější, ztrácející svůj hruškovitý tvar. Na médiu s 10 mg/l kinetinu se tvořily kulaté protokormy (obr. 3.7.B), občas zakládající více meristemických vrcholů na pólu pro vznik prýtu (obr. 3.7.C). Na médiu se 100 mg/l kinetinu již protokormy nepřirůstaly a zůstaly ve fázi po vyklíčení, jako na médiu se stejnou koncentrací kinetin ribosidu.

BAP:

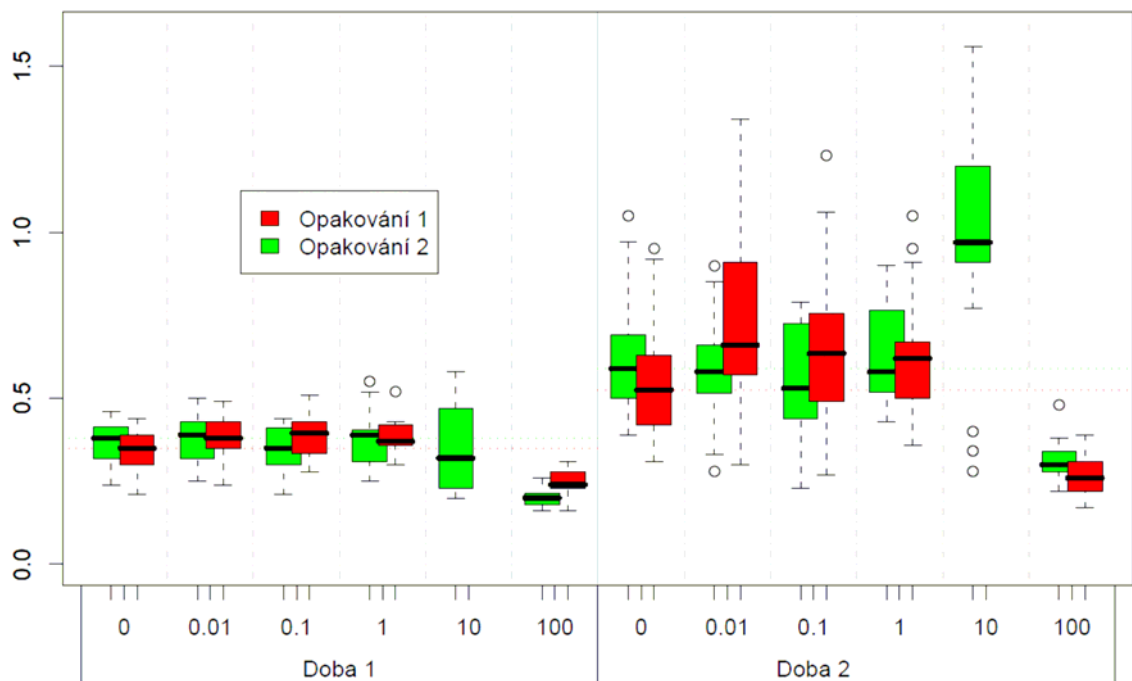
Na médiu s 0,01 a 0,1 mg/l BAP se vytvářely protáhlejší protokormy se zakulacenou částí u meristemického pólu. Na médiu s 1 mg/l BAP se na některých protokormech zakládaly další meristemické vrcholy. Tyto se zakládaly již na poměrně malých protokormech a často též ektopicky mimo oblast meristemického pólu protokormu pro vznik prýtu (obr. 3.10.). Neměly tvar klasických meristémů prýtů, ale byly vzhledem ke své délce širší a vznikaly z nich spíše další části protokormů. Vytvořily se tak v některých případech také rozvětvené (nejčastěji rozdvojené) protokormy (obr. 3.9.). Veškerá takto vzniklá hmota protokormů byla tvořena buňkami s charakterem odpovídajícím buňkám v blízkosti meristemického pólu neošetřených protokormů, neodpovídaly svým charakterem velkým buňkám bazální části, které se ve velké míře tvořily na médiích s auxiny. Na médiu se 100 mg/l BAP již byly protokormy menší a kulaté, ale výše uvedené změny na nich byly přesto dobře pozorovatelné. Ektopické meristemické póly se zakládaly velice často a v některých případech jejich průměr přesahoval polovinu průměru vlastního protokormu.

výsev	fytohormon	doba	opakování	koncentrace					
				0	0,01	0,1	1	10	100
DM8	kinetin	1	1	d	cd	d		bc	a
DM8	KR	1	1	b	b	b	b	b	a
DM9	BAP	1	1		a	a	a	a	a
DM9	BAP	1	2	b	b	b	b	b	a
DM9	BAP	2	1		a	a	a	b	a
DM6	kinetin	1	1		b		c		a
DM6	KR	1	1	b	b	b	b		a
DM6	kinetin	1	2		b	b	b	c	a
DM6	KR	1	2	c	c	c	c	b	a
DM6	kinetin	2	1		b		b		a
DM6	KR	2	1	b	b	b	b		a
DM6	kinetin	2	2		b	b	b	b	a
DM6	KR	2	2	b	b	b	b	b	a

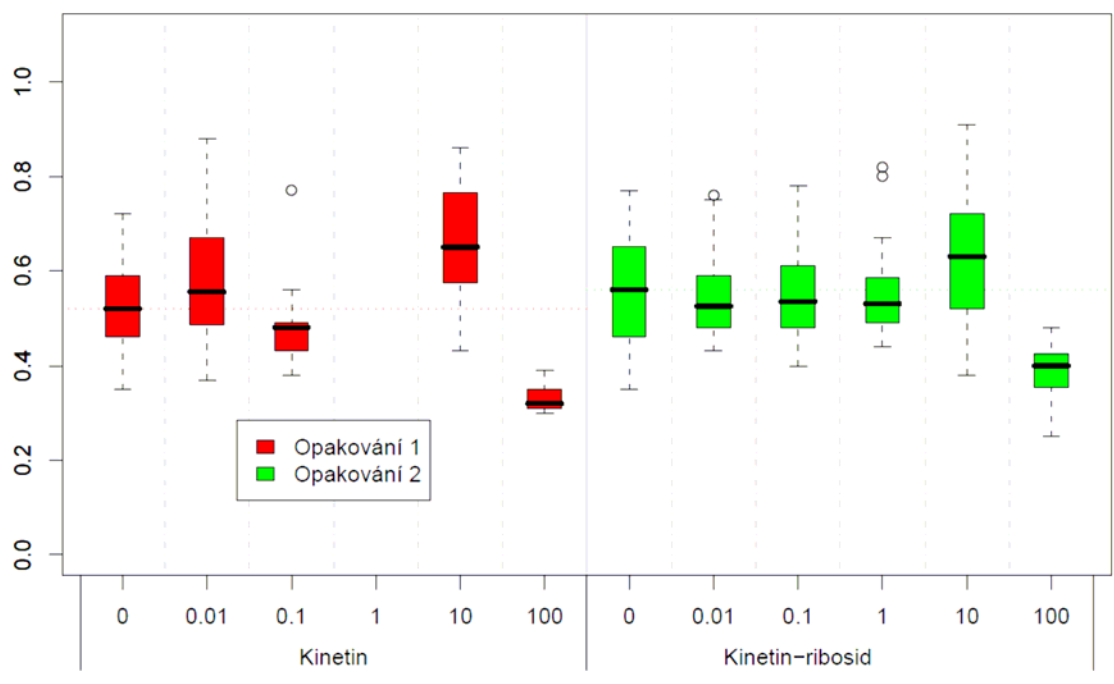
Tabulka 3.13. – data ke grafům 3.14., 3.15., 3.16., 3.17. – statisticky průkazné rozdíly mezi variantami na hladině $\alpha=0,05$ %.



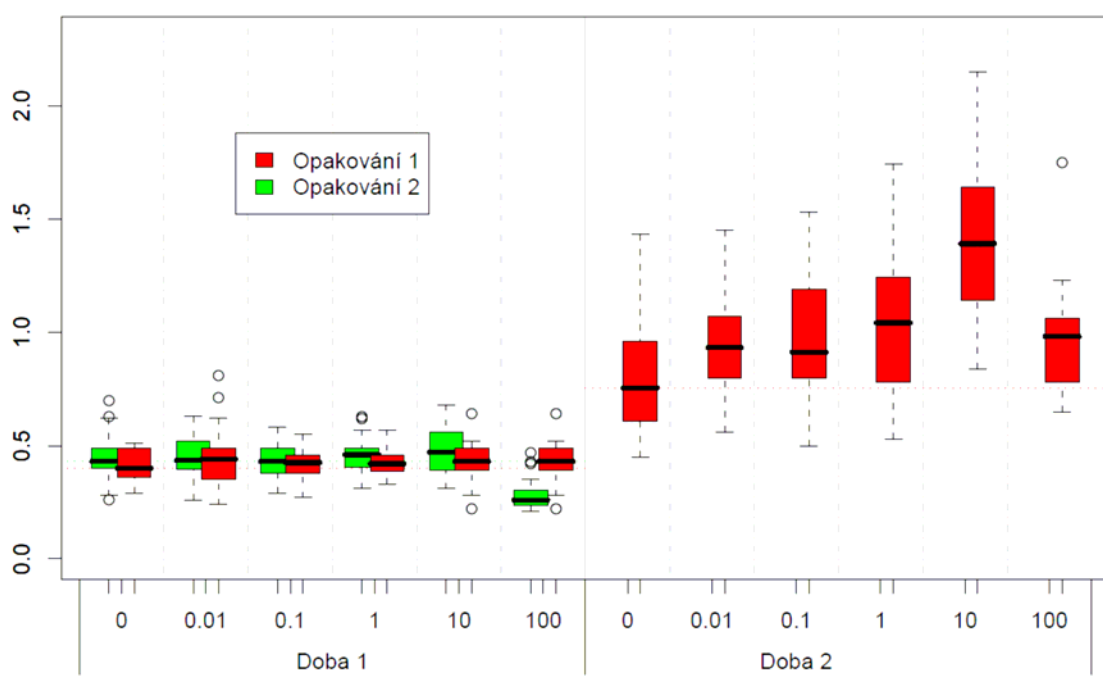
Graf 3.14. – velikost protokormů DM6 na médiích s různou koncentrací kinetinu. Na ose x koncentrace kinetinu v mg/l média; na ose y průměr protokormů v mm. Na svislé ose délka protokormů v mm. Doba 1: měření po 18 dnech kultivace. Doba 2: měření po 2 měsících kultivace.



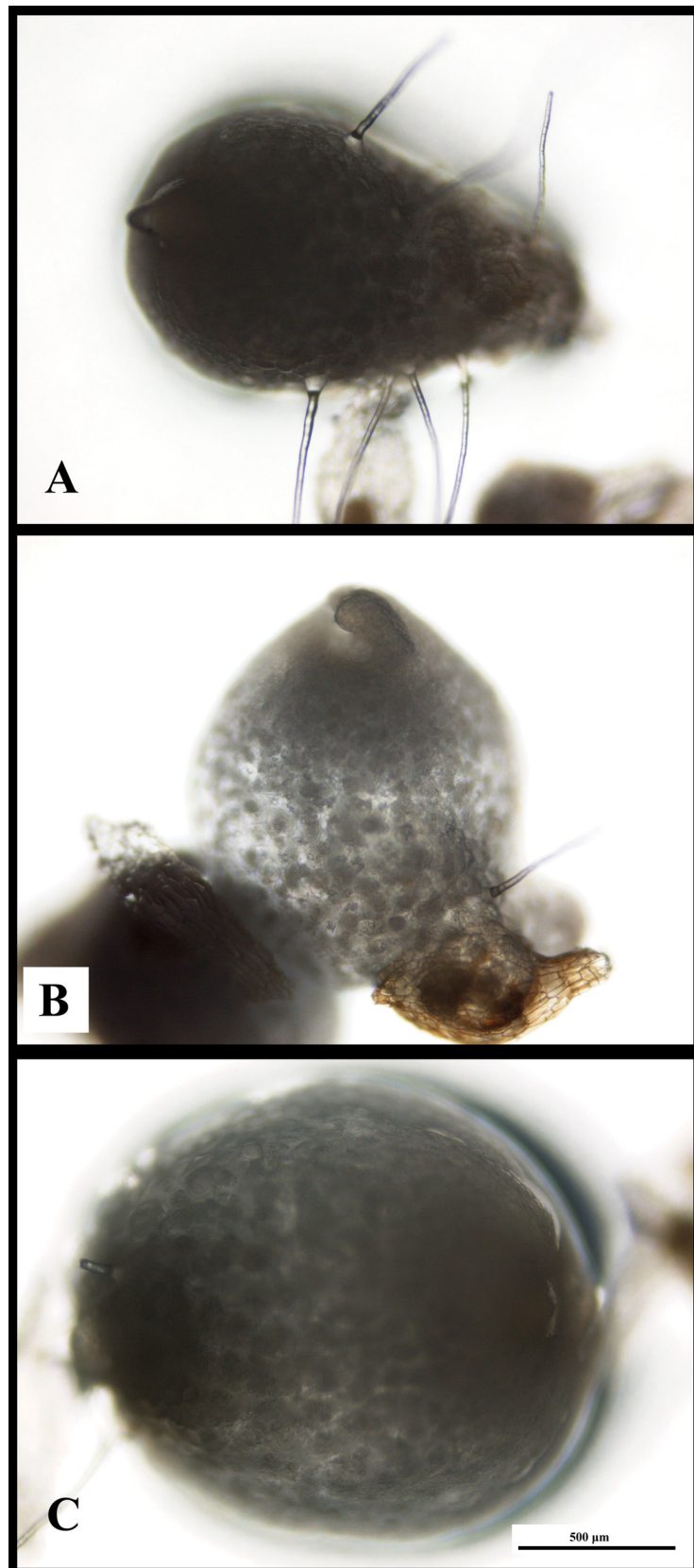
Graf 3.15. – velikost protokormů DM6 na médiích s různou koncentrací kinetin ribosidu. Na ose x koncentrace kinetin ribosidu v mg/l média. Na ose y délka protokormů v mm. Doba 1: měření po 18 dnech kultivace. Doba 2: měření po 2 měsících kultivace.



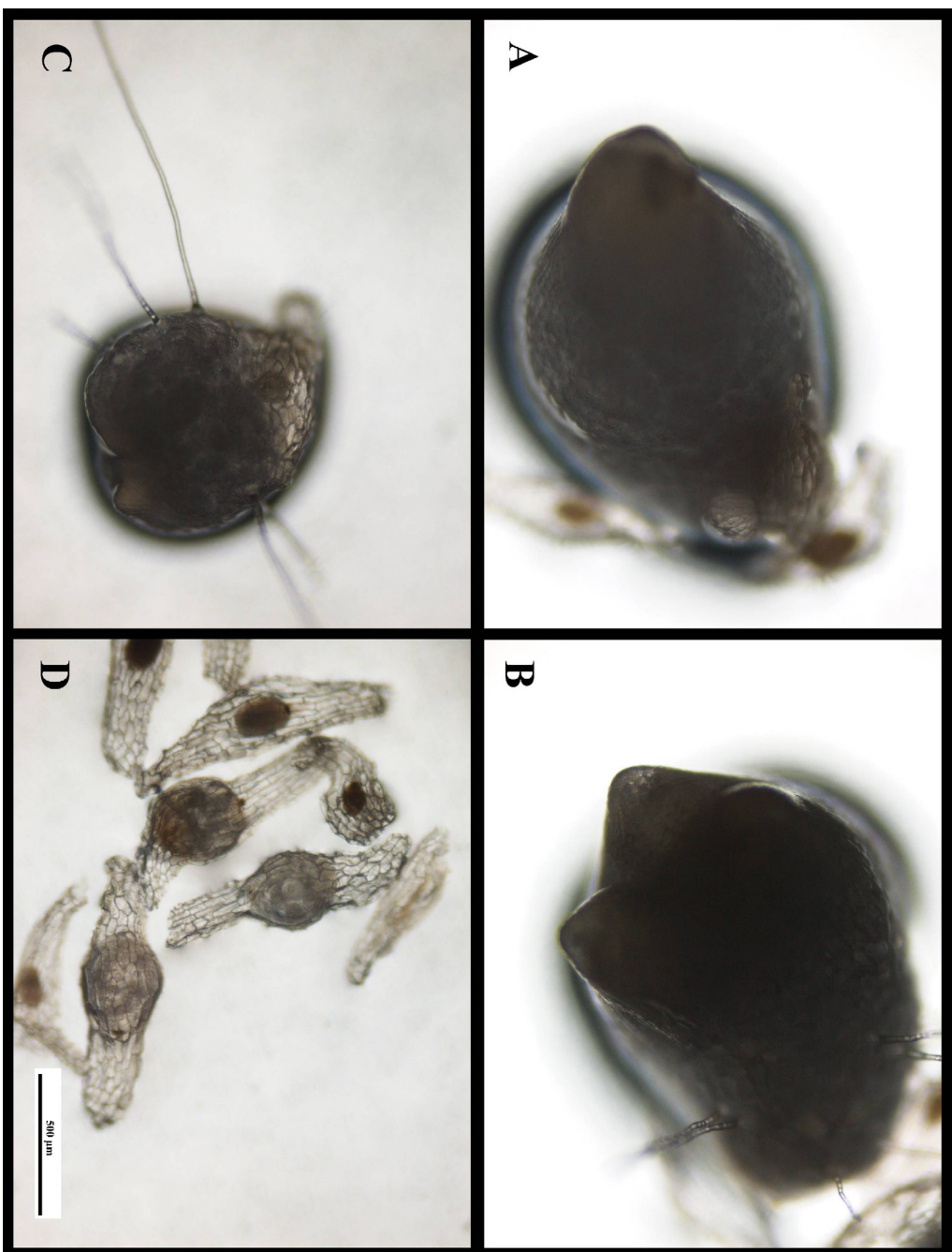
Graf 3.16. – velikost protokormů DM8 na médiích s různou koncentrací kinetinu a kinetin ribosidu. Na ose x koncentrace vybraných cytokininů v mg/l média. Na ose y délka protokormů v mm. Měřeno po 18 dnech kultivace.



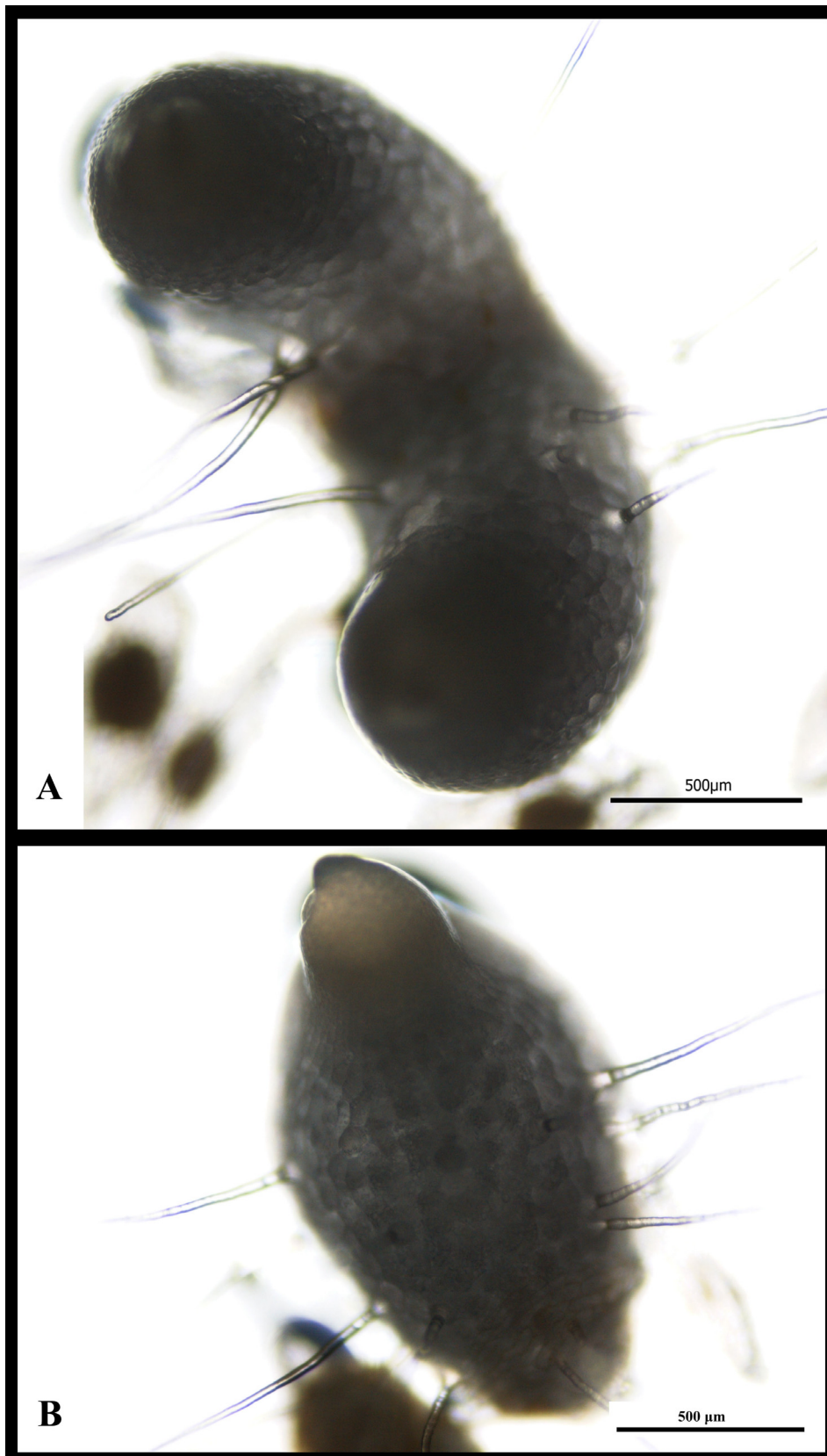
Graf 3.17. – velikost protokormů DM9 na médiích s různou koncentrací BAP. Na ose x koncentrace BAP v mg/l média. Na ose y délka protokormů v mm. Doba 1: měření po 18 dnech kultivace. Doba 2: měření po 2 měsících kultivace.



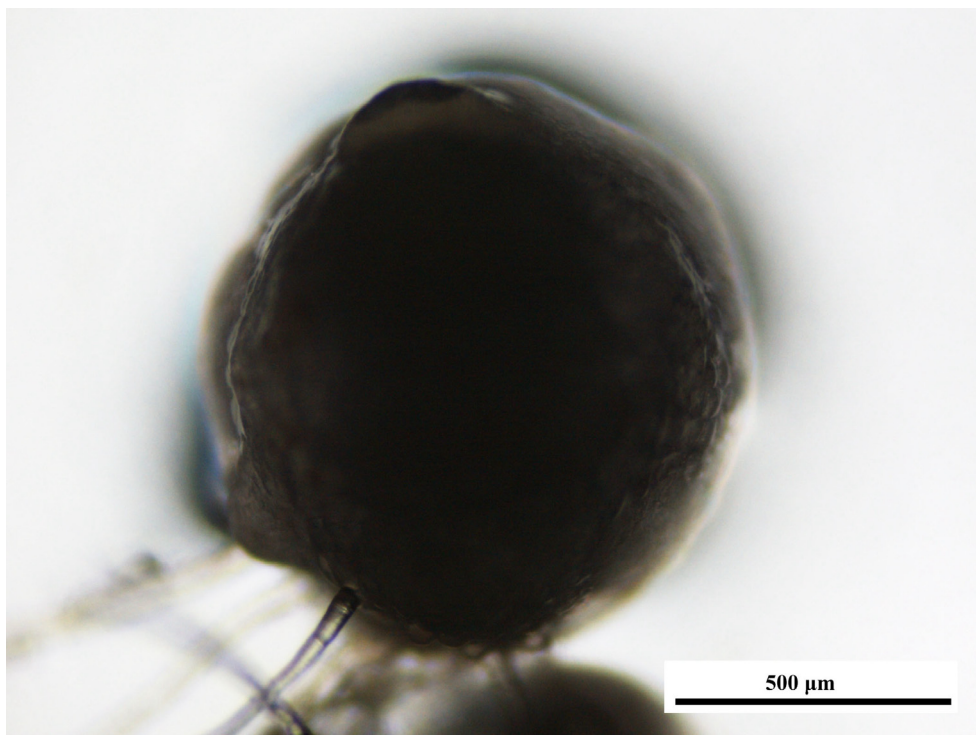
obrázek 3.7. – Vliv kinetinu na vývoj mladých protokormů. Semena DM6 byla vyseta na médium FM s různými koncentracemi kinetinu. Stav po 2 měsících kultivace. A: na médiu bez fytohormonů. B,C: na médiu s 10 mg/l kinetinu.



obrázek 3.8. – Vliv kinetin ribosidu na vývoj mladých protokormů. Semena DM6 byla vyseta na médium FM s různými koncentracemi kinetin ribosidu. Stav po 2 měsících kultivace. A,B: na médiu s 10 mg/l kinetin ribosidu. C: na médiu s 1 mg/l kinetin ribosidu. D: na médiu se 100 mg/l kinetin ribosidu.



obrázek 3.9. – Vliv BAP na vývoj mladých protokormů. Semena DM9 byla vyseta na médium FM s různými koncentracemi BAP. Stav po 2 měsících kultivace na médiu s 10 mg/l BAP. A,B různé protokormy.



obrázek 3.10. – Vliv BAP na vývoj mladých protokormů. Semena DM9 byla vyseta na médium FM s různými koncentracemi BAP. Stav po 2 měsících kultivace na médiu se 100 mg/l BAP.

3.4.1.3. Vliv kombinace NAA a BAP na semenáčky v rané fázi vývoje

Pro lepší porozumění účinku auxinů a cytokininů v regulaci vývoje protokormů byla v tomto experimentu vyseta semena *Dactylorhiza majalis* (DM9) na varianty média FM s různými kombinacemi NAA a BAP. Použité koncentrace shrnuje tabulka 3.14..

označení	NAA [mg/l]	BAP [mg/l]
A	100	0,01
B	100	1
C	10	0,01
D	10	1
E	1	1

Tabulka 3.14. – zastoupení fytohormonů ve variantách média FM

Vliv na velikost protokormů

Experiment byl založen ve dvou opakováních. Po 18 dnech od výsevu nebyla pozorovatelná inhibice u žádné varianty. Naopak varianty na médiu s 10 mg/l NAA (C, D) vykazovaly výraznou stimulaci růstu protokormů. Po dvou měsících od výsevu byly ale rozdíly odlišné. Nejdelší protokormy vyrostly na médiu s vyrovnanou koncentrací

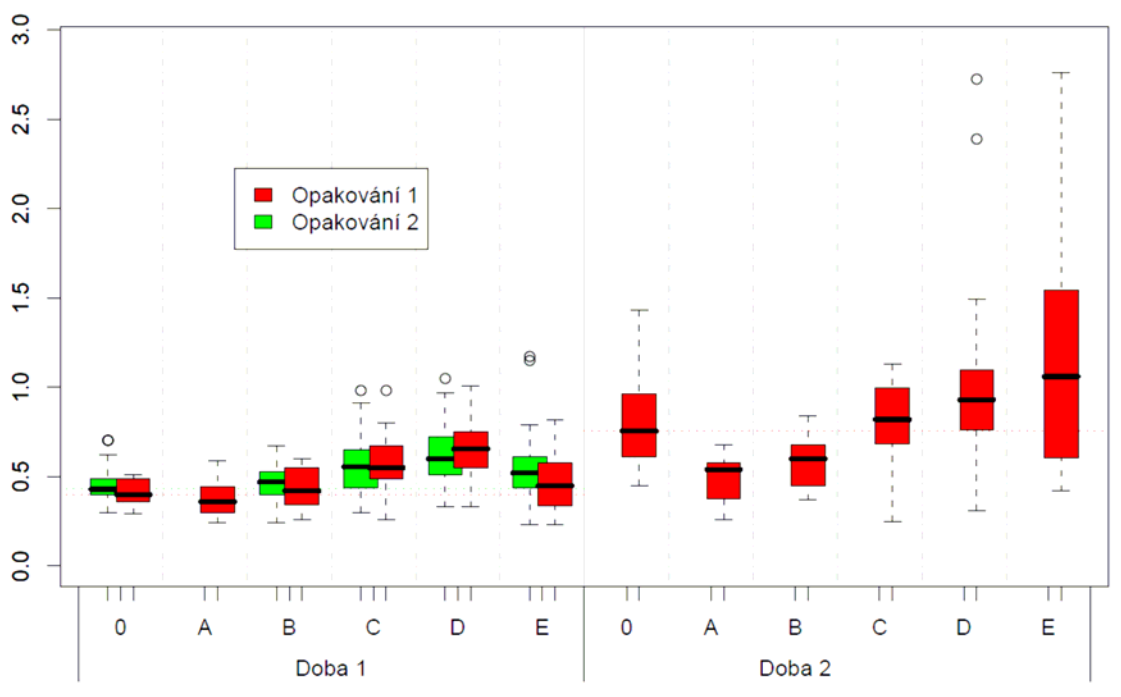
NAA a BAP (E). Na médiích s 10 mg/l NAA (C, D) byly jen o málo delší, než na médiu bez fytohormonů. Obě varianty s obsahem NAA 100 mg/l pak byly v růstu výrazně inhibované oproti kontrole, varianta s nižším obsahem BAP (A) více, než s vyšším obsahem BAP (B). Z výsledků vyplývá, že spolupůsobení auxinů a cytokininů může urychlovat vývoj bezprostředně po vyklíčení. Vysoké koncentrace NAA (100 mg/l) inhibují pouze následný vývoj semenáčků, ale nikoliv klíčení. Jejich inhibiční efekt pak lze oslabit přidávkem BAP. Zřejmě je tedy pro vývoj semenáčků spíše, než nastavení přesné hladiny, potřebné ustavení určité rovnováhy mezi auxiny a cytokininy.

Morfologické změny rostoucích protokormů

Na médiích se 100 mg/l NAA vyrostly jen malé protokormy, které posléze odumřely (podobně, jako na samotné NAA). Na médiích s 10 mg/l NAA se již protokormy vyvíjely. Bylo-li v médiu méně BAP (0,01 mg/l), vytvořily se menší protokormy se zbytnělou bazální částí s velkými buňkami. Bylo-li v médiu více BAP (1 mg/l), vytvořily se v polovině případů velice podobné protokormy (obr. 3.12.A). Druhá část protokormů jevila tendenci k prodlužování bazální části až tvorbě zvláštních polárně rostoucích útvarů (obr. 3.12.C). Tyto útvary však nedosahovaly délek pozorovaných při aplikaci samotné NAA a v některých případech záhy zbytněly v další jakoby protokorm (obr. 3.12.B). Podobné, ale mnohem intenzivněji rostoucí útvary nediferencující v nové protokormy pak byly hlavním projevem protokormů na médiu s vyrovnanou koncentrací BAP a NAA (1 a 1 mg/l). Na meristému se vytvářel pól dělicích se buněk, z nichž však nevznikal prýt, ale vlastně pokračování protokormu. U některých protokormů tu převážil spíše efekt cytokininů – protokormy byly širší, s menšími buňkami (obr. 3.11.B). U jiných protokormů zřejmě převážil efekt auxinů a vytvářely se delší útvary s většími buňkami (obr. 3.11.A). Vždy však docházelo k prodlužování protokormů a diferenciaci jednoho meristematického pólu.

výsev	doba	opakování	varianta					
			0	A	B	C	D	E
DM9	1	2	c		c	ab	b	a
DM9	1	1	a	a	a	b	b	a
DM9	2	1	a	b	b	a	a	a

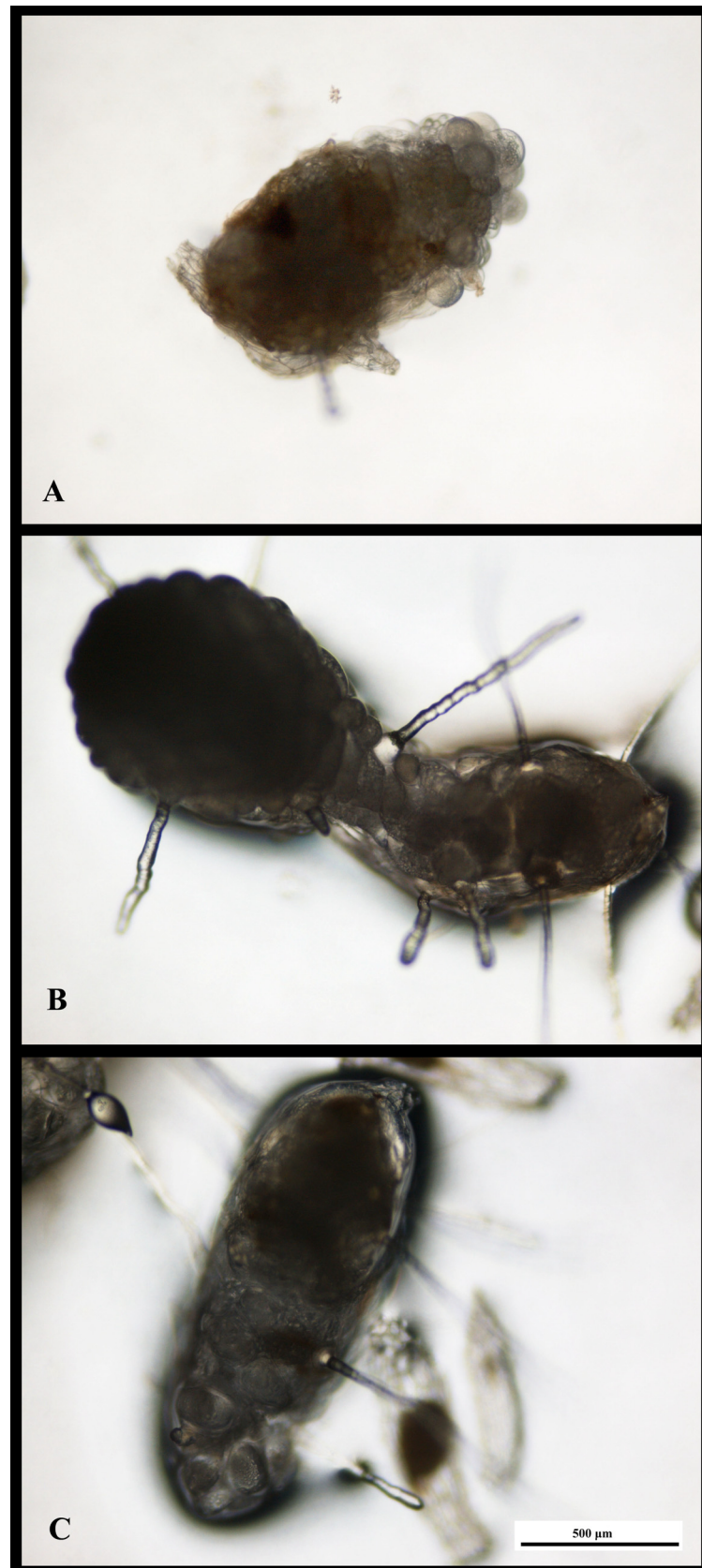
Tabulka 3.15. – data ke grafu 3.18. – statisticky průkazné rozdíly mezi variantami na hladině $\alpha=0,05$ %.



Graf 3.18. – velikost protokormů DM9 na médiích s různými koncentracemi NAA a BAP. Na ose x písmena označují variantu koncentrací uvedených fytohormonů (viz. tabulka 3.14.), 0 značí médium bez fytohormonů. Na ose y délka protokormů v mm. Doba 1: měření po 18 dnech kultivace. Doba 2: měření po 2 měsících kultivace.



obrázek 3.11. – Vliv kombinace BAP a NAA na vývoj mladých protokormů. Semena DM9 byla vyseta na médium FM 1 mg/l BAP a 1 mg/l NAA. Stav po 2 měsících kultivace. A,B různé protokormy.



obrázek 3.12. – Vliv kombinace BAP a NAA na vývoj mladých protokormů. Semena DM9 byla vyseta na médium FM s 10 mg/l NAA a 0,01 či 1 mg/l BAP. Stav po 2 měsících kultivace. A: na médiu s 10 mg/l NAA a 0,01 mg/l BAP. B,C: na médiu s 10 mg/l NAA a 1 mg/l BAP.

3.4.1.4. Vliv ABA a GA₃ na semenáčky v rané fázi vývoje

Klíčení většiny rostlin je inhibováno ABA a stimulováno GA₃. Literární údaje u orchidejí sice hovoří o inhibičním účinku ABA, ale nikoliv o stimulačním účinku GA₃. Pro ověření těchto údajů a zjištění možného morfogenního účinku těchto fytohormonů na vývoj semenáčků orchidejí byly provedeny experimenty s výsevem semen na varianty média FM s různými koncentracemi ABA a GA₃. Experiment byl přednostně proveden s *Dactylorhiza majalis* (DM7 a DM10, celkem 4 opakování) a pro porovnání ještě s *Anacamptis papilionacea* s.s. (AP1, bez opakování) a *Himantoglossum robertianum* (HR1, 2 opakování). Semena *Himantoglossum robertianum* však v tomto experimentu nevyklíčila a hodnoceny tedy byly pouze *Dactylorhiza majalis* a *Anacamptis papilionacea* s.s.. *Anacamptis papilionacea* s.s. klíčil oproti *Dactylorhiza majalis* jen velice pomalu a byl proto hodnocen až 30 dnů po výsevu.

Vliv na velikost protokormů

ABA:

Výsledky zobrazují grafy 3.19., 3.20., 3.22.. ABA se ukázala inhibiční již pro samotné klíčení semen. Na médiích s koncentracemi 10 a 100 mg/l již embrya vůbec neprotrhla osemení a jen velmi mírně se zvětšila. Na médiích s nižšími koncentracemi se reakce dvou zkoumaných druhů mírně lišila. Růst *Dactylorhiza majalis* byl na médiu s koncentrací 1 mg/l stále úplně inhibován. Na médiu s koncentracemi 0,01 a 0,1 mg/l již protokormy přirůstaly, ale zřetelně méně, než na médiu bez fytohormonů. Růst *Anacamptis pyramidalis* s.s. již na médiu s 1 mg/l ABA nebyl zcela inhibován a protokormy mírně přirůstaly. Na médiu s 0,1 mg/l ABA byla inhibice taktéž patrná. Na médiu s 0,01 mg/l ABA však již k žádné inhibici růstu nedocházelo. ABA tedy zřejmě inhibuje klíčení semen, ale v koncentracích závislých na konkrétním taxonu.

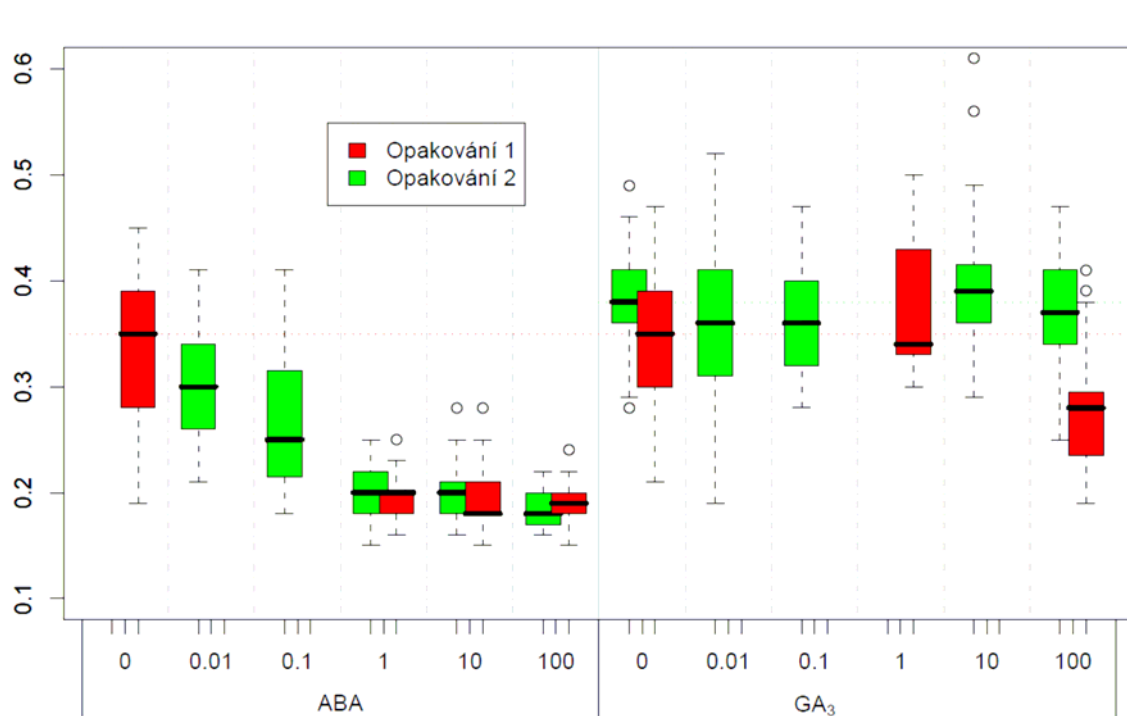
GA₃:

Výsledky zobrazují grafy 3.19., 3.21., 3.22.. U protokormů hodnocených po vyklíčení nebyly patrné jasné změny ve velikosti. Souhrnně pouze naznačují na možnou slabou inhibici při koncentracích 100 mg/l. Po dvou měsících kultivace *Dactylorhiza majalis* (jediné opakování DM10) byla patrná mírná sestupná tendence velikosti protokormů se vzrůstající koncentrací GA₃ v médiu. Protokormy však zdárně rostly též na médiu s koncentrací 100 mg/l GA₃. V experimentu nebylo hodnoceno množství vyklíčených semen (klíčivost) a nelze tedy rozhodnout, zda nedošlo k indukci klíčení dormantních semen, která by po daném ošetření na médiu bez fytohormonů neklíčila. Z uvedených

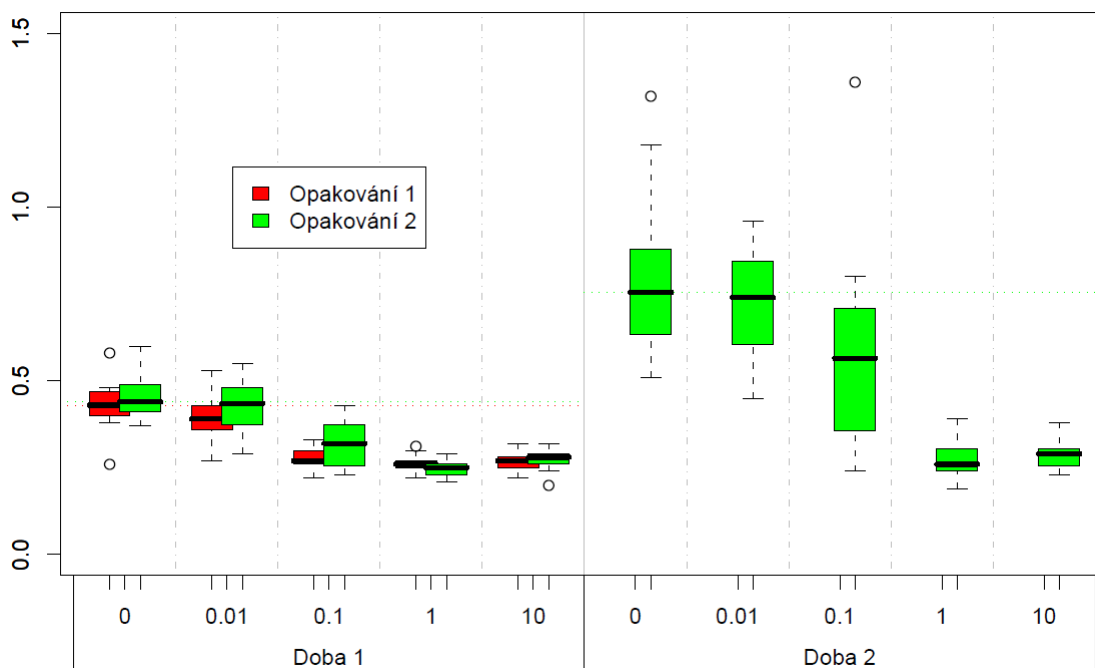
výsledků pozorování velikostí protokormů je však zřejmé, že GA_3 nejspíše klíčení neurychluje.

Morfologické změny rostoucích protokormů

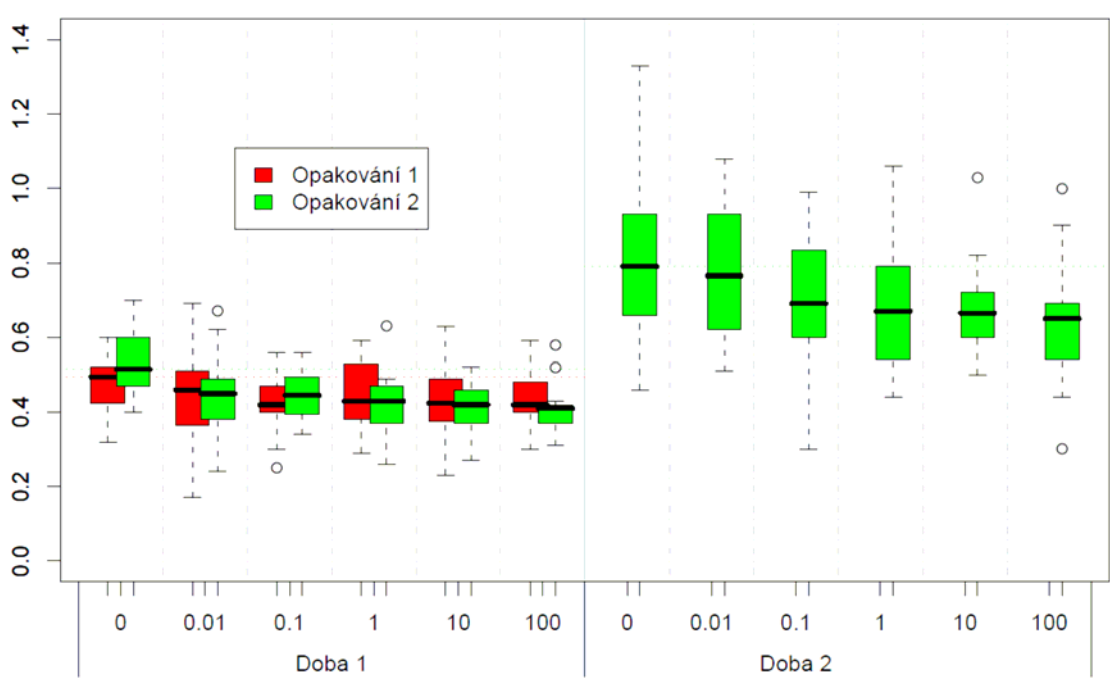
U protokormů na médiích s ABA nebyly pozorovány žádné morfologické změny. Protokormy na médiích s GA_3 měly také stejný tvar, jako na médiu bez fytohormonů. Pozorované zmenšení velikosti se vzrůstající koncentrací GA_3 v médiu se však dle orientačních mikroskopických pozorování týkalo pouze velikosti vlastního protokormu, nikoliv zakládáného meristematického vrcholu. Ten byl pak u variant s vyšší koncentrací GA_3 de facto relativně větší vůči velikosti vlastního protokormu. Vzhledem k omezenému rozsahu této práce však dosud nebyly tyto změny hodnoceny morfometricky, a jelikož mají charakter kvantitativní spíše, než kvalitativní, nelze s jistotou uzavřít, že k pozorovanému jevu skutečně dochází.



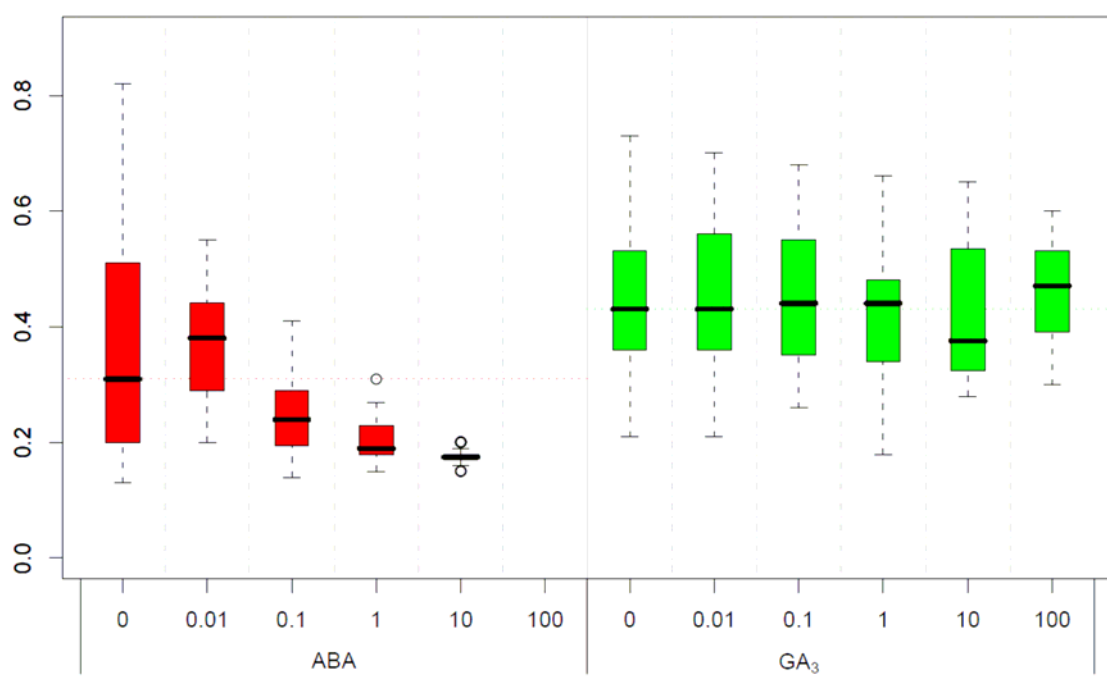
Graf 3.19. – velikost protokormů DM7 na médiích s různou koncentrací ABA a GA_3 . Na ose x koncentrace vybraných fytohormonů v mg/l média. Na ose y délka protokormů v mm. Měřeno po 18 dnech kultivace.



Graf 3.20. – velikost protokormů DM10 na médiích s různými koncentracemi ABA. Na ose x koncentrace ABA v mg/l média. Na ose y délka protokormů v mm. Doba 1: měření po 18 dnech kultivace. Doba 2: měření po 2 měsících kultivace.



Graf 3.21. – velikost protokormů DM10 na médiích s různými koncentracemi GA₃. Na ose x koncentrace GA₃ v mg/l média. Na ose y délka protokormů v mm. Doba 1: měření po 18 dnech kultivace. Doba 2: měření po 2 měsících kultivace.



Graf 3.22. – velikost protokormů AP1 na médiích s různou koncentrací ABA a GA₃. Na ose x koncentrace vybraných fytohormonů v mg/l média. Na ose y délka protokormů v mm. Měřeno po 30 dnech kultivace.

výsev	fytohormon	doba	opakování	koncentrace					
				0	0,01	0,1	1	10	100
DM7	ABA	1	1	b	a	a	a	a	a
DM7	ABA	1	2		b	b	a	a	a
DM7	GA ₃	1	1	b			ab		a
DM7	GA ₃	1	2	a	a	a		a	a
DM10	ABA	1	1	b	b		a	a	a
DM10	GA ₃	1	1	a	a	a	a	a	a
DM10	ABA	1	2	c	c	ab	a	ab	
DM10	GA ₃	1	2	b	a	a	a	a	a
DM10	ABA	2	1	c	c	b	a	a	
DM10	GA ₃	2	1	d	bc	c	ab	ab	a
AP1	ABA	1	1	c	d	c	b	a	
AP1	GA ₃	1	1	a	a	a	a	a	a

Tabulka 3.16. - data ke grafům 3.19., 3.20., 3.21., 3.22. – statisticky průkazné rozdíly mezi variantami na hladině $\alpha=0,05$ %.

3.4.1.5. Účinek vybraných fytohormonů na semenáčky v pozdějších fázích vývoje

Předchozí experimenty zabývající se účinkem fytohormonů odhalily významný vliv auxinů na regulaci vývoje mladých protokormů bezprostředně po vyklíčení. Tento experiment měl ukázat, zda se podobné regulace mohou uplatňovat také v pozdějších fázích vývoje protokormů. Jelikož v předchozích experimentech vyvolávaly nejmarkantnější změny auxiny, byly pro tento experiment zvoleny NAA a 2,4-D.

Bylo použito stejné médium FM se stejnými koncentracemi vybraných auxinů (tj. 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg/l). Jelikož nebyly dostupné protokormy *Dactylorhiza majalis* ve správné vývojové fázi, byl použit příbuzný druh *Dactylorhiza incarnata*. Tento experiment je tedy ve vztahu k ostatním nutno hodnotit pouze jako orientační. Použité protokormy DI1 byly předpěstovány následujícím způsobem: vysety do plastových Petriho misek průměru 6 cm na médium 1/4-2. Kultivovány ve tmě papírové krabice 5 měsíců v kultivačním prostoru B, poté 3 měsíce v kultivačním prostoru E. Poté přesázeny do plastových Petriho misek průměru 9 cm na médium Mo2. Kultivovány 2 měsíce ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru D.

Takto předpěstované rostliny byly nasázeny do plastových Petriho misek průměru 9 cm s verzemi FM média s různými koncentracemi NAA a 2,4-D (0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg/l) a kontrolní verzí bez fytohormonů (FMN).

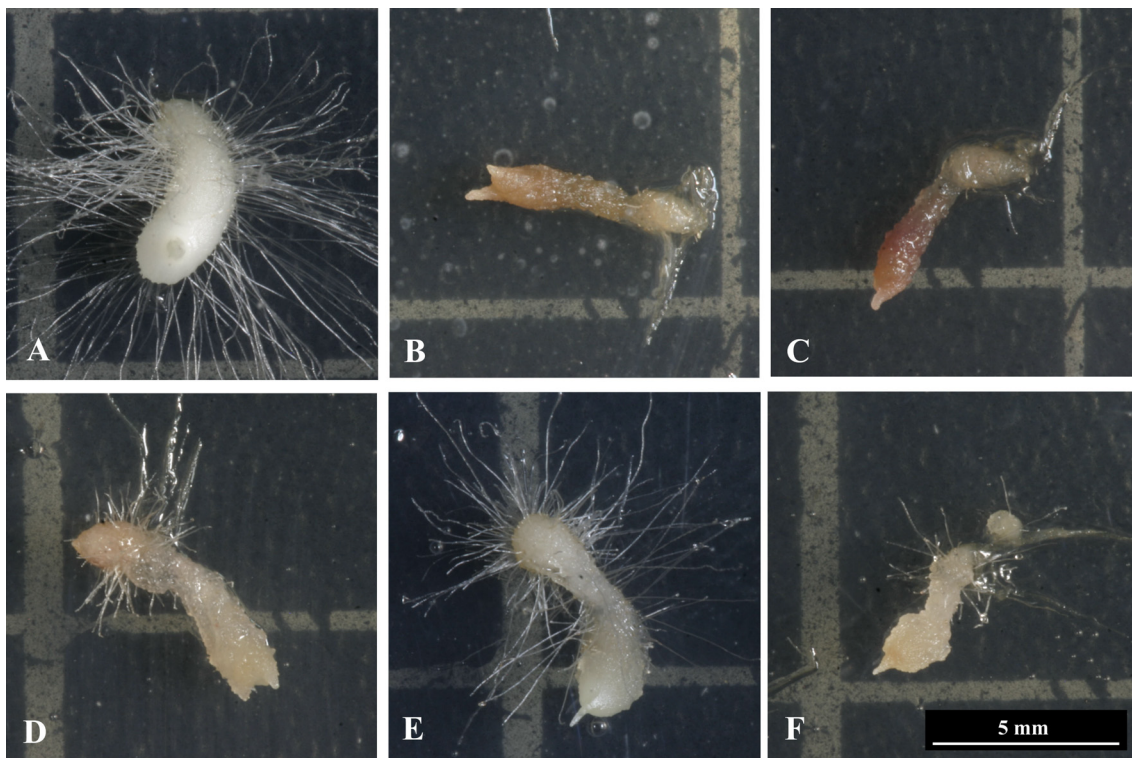
Morfologické změny byly hodnoceny po 6 týdnech kultivace ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru C.

NAA:

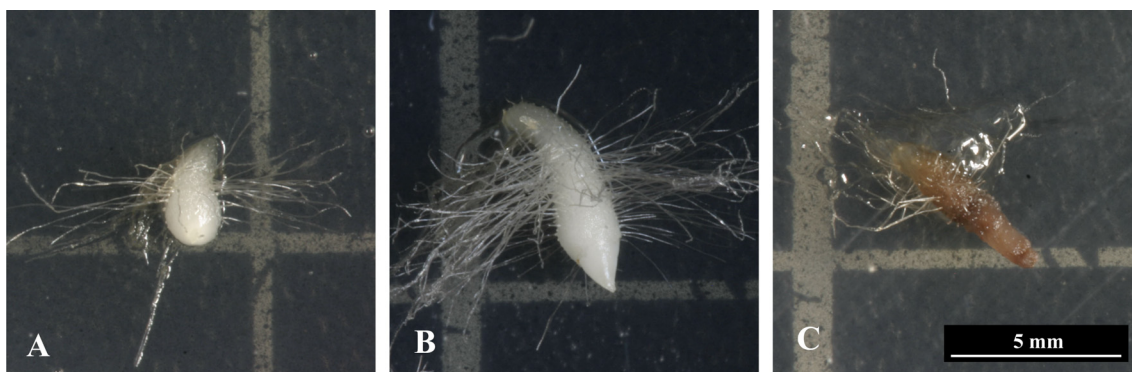
Na médiu s 0,01 mg/l NAA měly protokormy stejný tvar, jako na médiu bez fytohormonů (obr. 3.14.A). Na médiu s 0,1 mg/l NAA již byly zřetelně protáhlejší a celkově mohutnější (obr. 3.13.A). Na médiu s 1 mg/l NAA docházelo k indukci růstu zvláštních protáhlých útvarů, které se zdají být jakoby pokračováním protokormu. Zpravidla odrůstal delší polárně rostoucí útvar. Dále od původního protokormu (a tedy také dále od média) diferencoval často nový protokorm (obr. 3.13.D, E, F). Na médiu s 10 mg/l NAA tyto protáhlé útvary vyrůstaly vždy a nediferencovaly na svém konci v nový protokorm (obr. 3.13.B, C). Rostliny již byly mírně menší, než na nižší koncentraci NAA. Mnoho rostlin vykazovalo známky hnědnutí a některé odumřely zcela. Na médiu se 100 mg/l NAA protokormy takřka vůbec nepřiřostly a naprostá většina uhynula.

2,4-D:

Na médiích s 0,01 a 0,1 mg/l 2,4-D měly protokormy stejný tvar, jako na médiu bez fytohormonů (obr. 3.14.A). Na médiu s 1 mg/l 2,4-D byly protokormy výrazně protáhlejší a celkově větší (podobné NAA 0,1 mg/l; obr. 3.14.B). Na médiu s 10 mg/l 2,4-D již většina protokormů odumřela, ale zjevně předem přirůstaly polárně do délky (obr. 3.14.C).



obrázek 3.13. – Vliv NAA na vývoj pozdějších fází semenáčků. Předpěstované protokormy DII přesázené na médium FM s různými koncentracemi NAA po 6 týdnech kultivace. A: na médiu s 0,1 mg/l NAA. B,C: na médiu s 10 mg/l NAA. D,E,F: Na médiu s 1 mg/l NAA.



obrázek 3.14. – Vliv 2,4-D na vývoj pozdějších fází semenáčků. Předpěstované protokormy DII přesázené na médium FM s různými koncentracemi 2,4-D po 6 týdnech kultivace. A: na médiu bez fytohormonů. B: na médiu s 1 mg/l 2,4-D. C: na médiu s 10 mg/l 2,4-D.

3.4.1.6. Efekt auxinů v tekutém médiu

Předchozí experimenty s auxiny v tuhých médiích ukázaly výrazný účinek těchto fytohormonů na elongaci protokormů. Pro lepší porozumění významu lokalizace auxinů byly tyto přidány také do tekutého média. Zatímco v kultuře na tuhých médiích může docházet k tvorbě gradientu obsahu endogenních auxinů v protokormu, v tekutém médiu je tvorbě takového gradientu maximálně bráněno.

Experiment byl proveden ve dvou uspořádáních: přímý výsev do tekutého média a přesázení předpěstovaných protokormů do tekutého média.

- 1) Semena DM2 byla vyseta do 100 ml Erlenmeyerových baněk s 50 ml tekutého SU2 média, po 2 měsících byly rostliny přesázeny do SU2 média bez fytohormonů a do tohoto média s 1 mg/l NAA a 1 mg/l 2,4-D. Dále kultivovány ve tmě začerněné papírové krabici na horizontální třepačce KS250 basic (IKA Labortechnik; 150 RPM) v kultivačním prostoru B až do zhnědnutí a odumření.
- 2) Protokormy DF1 vysety na médium Michl do plastových Petriho misek průměru 6 cm. Kultivovány v kultivačním prostoru D ve tmě v papírové krabici po dobu 7 měsíců.

Přesázeny pinzetou do tekutého média SU4 (toto médium se během práce ukázalo vhodnější, než SU2) s 1 mg/l NAA a 1 mg/l 2,4-D. Kultivovány 2 měsíce ve tmě začerněné papírové krabici na horizontální třepačce KS250 basic (IKA Labortechnik; 150 RPM) v kultivačním prostoru B.

U obou uspořádání byly hodnoceny morfologické změny.

Při výsevu přímo do tekutého média nejprve v médiu SU2 vyrostly menší protokormy podobného charakteru raným fázím protokormů na tuhém médiu. Další vývoj v médiích s auxiny a bez nich se však výrazně lišil. V médiu bez přidaných auxinů se vytvářely menší protáhlejší protokormy diferencující meristemický pól a ve většině případů také následně tvořící prýt. V médiu s auxiny se vytvářely velké protokormy. Nebyly schopné diferencovat klasický meristemický pól. Naproti tomu u nich docházelo k mohutnému dělení základního pletiva vlastního meristému. Vznikaly velké kulovité útvary posléze zakládající oddělené oblasti intenzivnějšího růstu vedoucí k tvorbě dalších kulovitých útvarů na již existujících (obr. 3.15.). Po celou dobu kultivace v tekutém médiu protokormy vykazovaly tendenci k hnědnutí, jež posléze sílila, až vedla k odumření protokormů. V médiu bez auxinů k němu docházelo po 5 - 6 měsících od výsevu, v médiu s auxiny k němu docházelo po 7 - 8 měsících.

Po přesázení protokormů předpěstovaných na tuhém médiu do tekutého média s auxiny se jejich vývoj výrazně změnil. Nedošlo dále k jakémukoliv dalšímu vývoji prýtu. Naopak bylo podpořeno dělení základního pletiva meristému vedoucí k tvorbě kulovitých útvarů. Po 2 měsících kultivace byly původní části protokormů mnohdy odumřelé s mohutným živým nediferencovaným pletivem okolo (obr. 3.16.). Vzhledem byly vzniklé útvary velice podobné těm, které vyrostly při výsevu přímo do tekutého média.



obrázek 3.15. – Protokormy DM2 pěstované v tekutém médiu s auxiny. A: odumřelé protokormy po 8 měsících od výsevu. B: protokormy 4 měsíce od výsevu. Na protokormech je patrné mohutné přirůstání základního pletiva bez diference meristému. Médium SU2 s 1 mg/l NAA a 1 mg/l 2,4-D. Měřítka: 1 dílek odpovídá 1 mm.



obrázek 3.16. – Protokormy DF1 pěstované v tekutém médiu s auxiny. Po dvou měsících kultivace protokormů v tekutém médiu SU4 (s 1 mg/l NAA a 1 mg/l 2,4-D) je patrné mohutné přirůstání základního pletiva bez růstu meristému.

3.5. Účinek vybraných fytohormonů na mykorhizní houby

Předchozí experimenty ukázaly vliv fytohormonů na vývoj mladých semenáčků orchidejí. V regulaci mykorhizních symbióz je však možné též ovlivnění hub fytohormony. Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, zda mají fytohormony vliv na růst mykorhizních hub také v koncentracích, které byly použity u rostlinného materiálu.

Tři vybrané izoláty hub (FU-5, FU-6 a FU-9-1b) byly pěstovány na médiu ČA s různými koncentracemi vybraných fytohormonů (viz. tabulka 3.17.) v plastových Petriho miskách průměru 6 cm. Všechny varianty byly provedeny ve 3 opakováních.

Houby byly předpěstovány na médiu ČA v plastových Petriho miskách průměru 9 cm. Z myceliem rovnoměrně porostlé části agarové plotny byly skalpelem vyřezávány bločky přibližně 1 x 2 mm. Tyto bločky byly pinzetou přeneseny do středu Petriho misky s experimentálním médiem a lehce zanořeny do jeho povrchu. Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a houby dále kultivovány ve tmě papírové krabice v kultivačním prostoru B.

Pro orientační zjištění hodnoty přírůstků byly houby zaznamenány fotoaparátem po 13 a 29 dnech kultivace. Pro charakterizaci morfologických změn byly pozorovány po 29 dnech mikroskopem Olympus BX50.

fytohormon	použité koncentrace [mg/l]				
2,4-D	0,01	0,1	1	10	100
IBA	0,01	0,1	1	10	100
NAA	0,01	0,1	1		
BAP	0,01	0,1	1	10	100

Tabulka 3.17. – fytohormony použité v experimentu s houbami

Ze třech použitých izolátů mohly být dosud vyhodnoceny pouze FU-6 a FU-9-1b, protože FU-5 přirůstal velice pomalu. Přírůstky u těchto dvou izolátů nebyly hodnoceny, protože zvolené Petriho misky se ukázaly příliš malé (houby na některých variantách dorostly až k okraji). Byly tedy pouze charakterizovány morfologické změny.

Na různých koncentracích BAP nebyly pozorovány zjevné rozdíly ve struktuře kolonií ani mycelia. Na různých koncentracích auxinů naproti tomu byly pozorovány změny ve struktuře kolonií i mycelia. Nejmarkantnější odezva byla vždy pozorována na nejvyšší koncentraci 2,4-D či IBA 100 mg/l.

Kolonie byly menší v průměru, povrch kolonií huňatější a okraje kolonií ostřejší, často paprskovitě vybiňující do stran. Tyto změny byly částečně pozorovatelné též na médiích s auxiny v koncentracích 10 mg/l a jen velmi mírné při koncentracích 1 mg/l (obr. 3.17. a 3.24.).

Mikroskopické změny ve struktuře mycelia byly pozorovatelné již na nižších koncentracích auxinů. Hyfy se při vzrůstající koncentraci auxinů více větvily. Na nejvyšších koncentracích 2,4-D či IBA 100 mg/l se hyfy větvily již velmi blízko za růstovou špičkou a dále se vytvářely husté shluky intenzivně větvených hyf (např. obr. 3.21. a 3.28.). Zvýšené větvení hyf bylo u sledovaných izolátů pozorovatelné od různých koncentrací auxinů.

Izolát FU-6

NAA: hustší větvení mycelia bylo pozorovatelné při koncentraci 1 mg/l (obr. 3.19.).

2,4-D: hustší větvení mycelia bylo pozorovatelné při koncentraci 1 mg/l (obr. 3.20.).
Při koncentraci 10 mg/l bylo již dobře patrné a na koncentraci 100 mg/l docházelo ke vzniku typicky hustých větvených shluků hyf (obr. 3.21.).

IBA: hustší větvení mycelia bylo pozorovatelné při koncentraci 1 mg/l.
Při koncentraci 10 mg/l bylo lépe patrné (obr. 3.22.) a na koncentraci 100 mg/l docházelo ke vzniku typicky hustých větvených shluků hyf (obr. 3.23.).

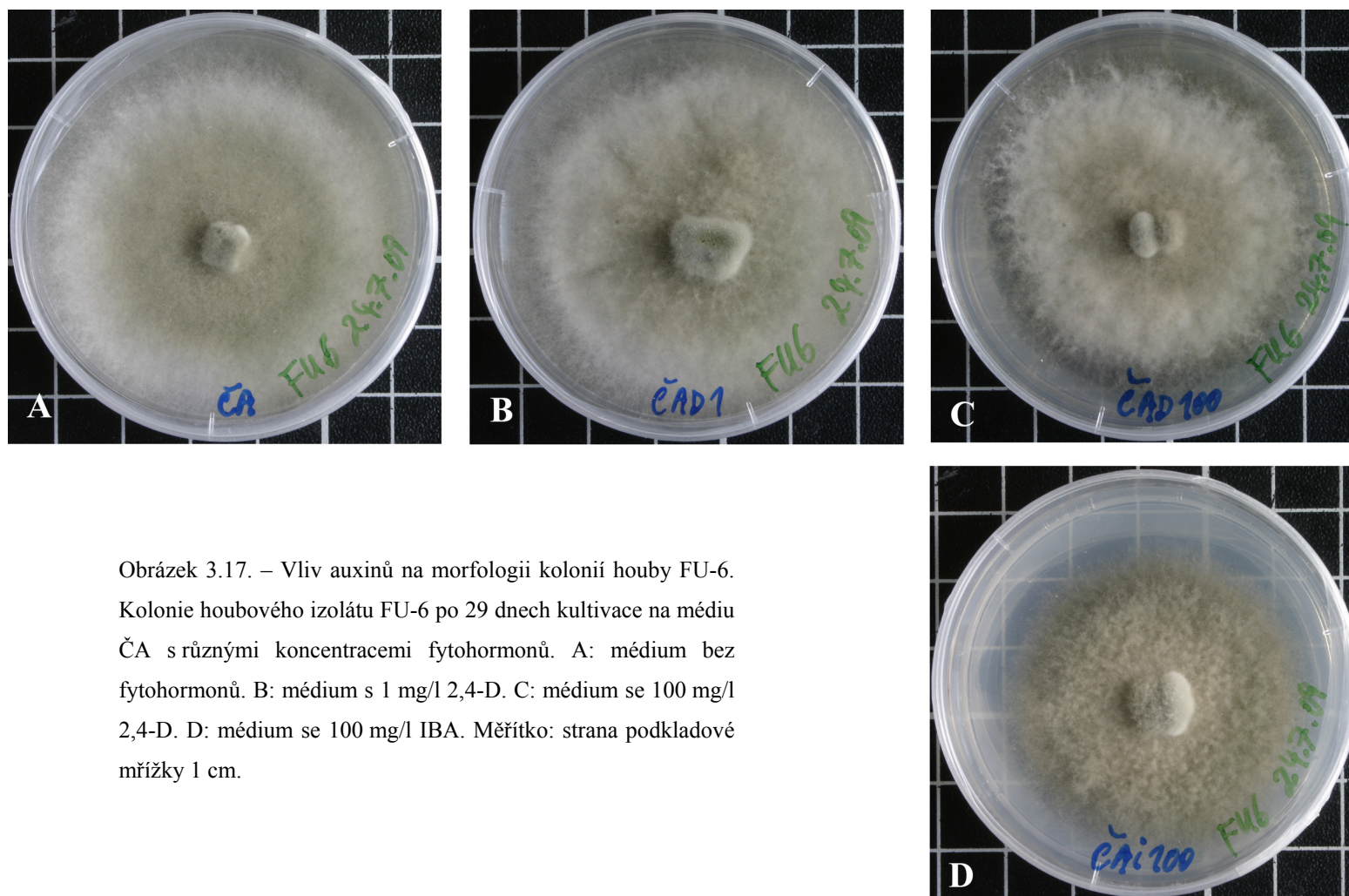
Izolát FU-9-1b

NAA: hustší větvení mycelia bylo pozorovatelné při koncentraci 0,1 mg/l a při koncentraci 1 mg/l bylo již dobře patrné (obr. 3.26.).

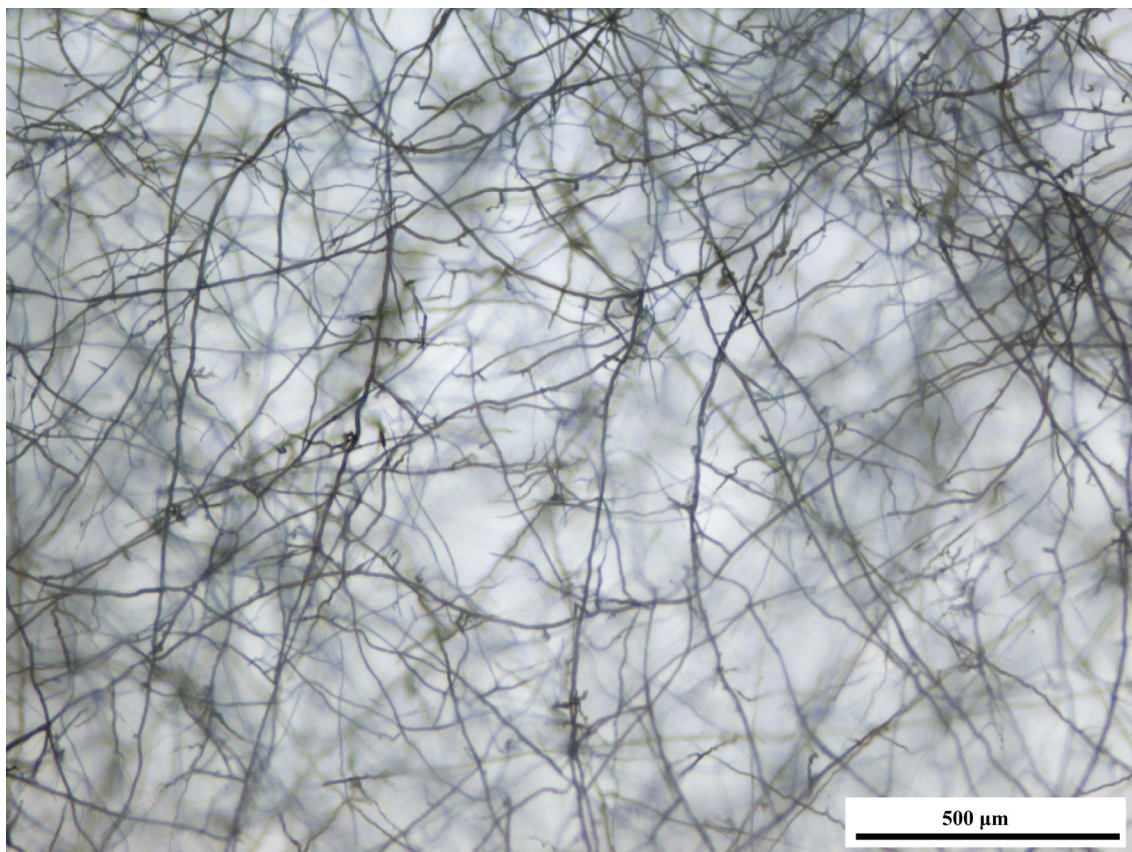
2,4-D: hustší větvení mycelia bylo pozorovatelné při koncentraci 0,1 mg/l. Při koncentraci 1 mg/l bylo již velmi dobře patrné (obr. 3.27.) a na koncentracích 10 a 100 mg/l již docházelo ke vzniku typicky hustě větvených hyf (obr. 3.28.).

IBA: hustší větvení mycelia bylo pozorovatelné při koncentraci 1 mg/l (obr. 3.29.).
Při koncentracích 10 a 100 mg/l již docházelo ke vzniku typicky hustě větvených hyf (obr. 3.30.).

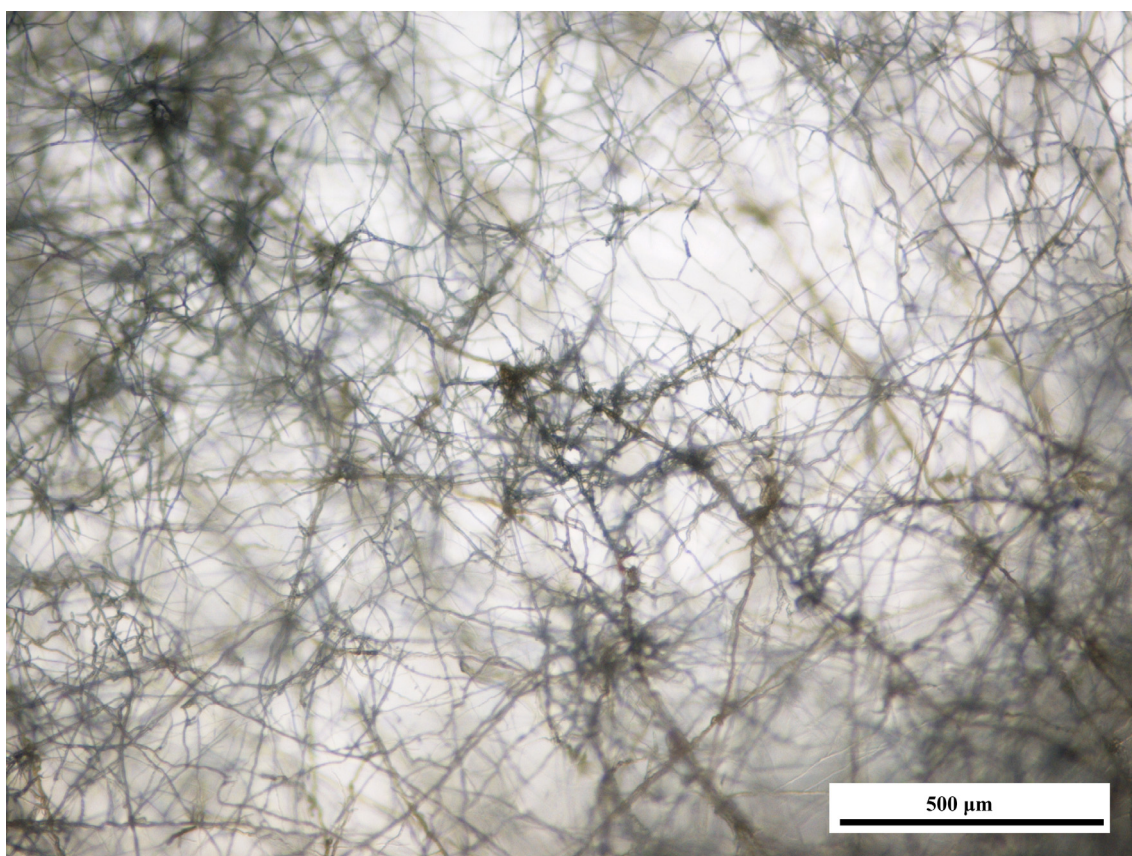
Souhrnně lze uzavřít, že auxiny mohou mít na vývoj hub vliv již v koncentracích, které umožňují růst semenáčků orchidejí. Hlavní charakter změn, ke kterým vlivem auxinů dochází, je zvýšené větvení hyf.



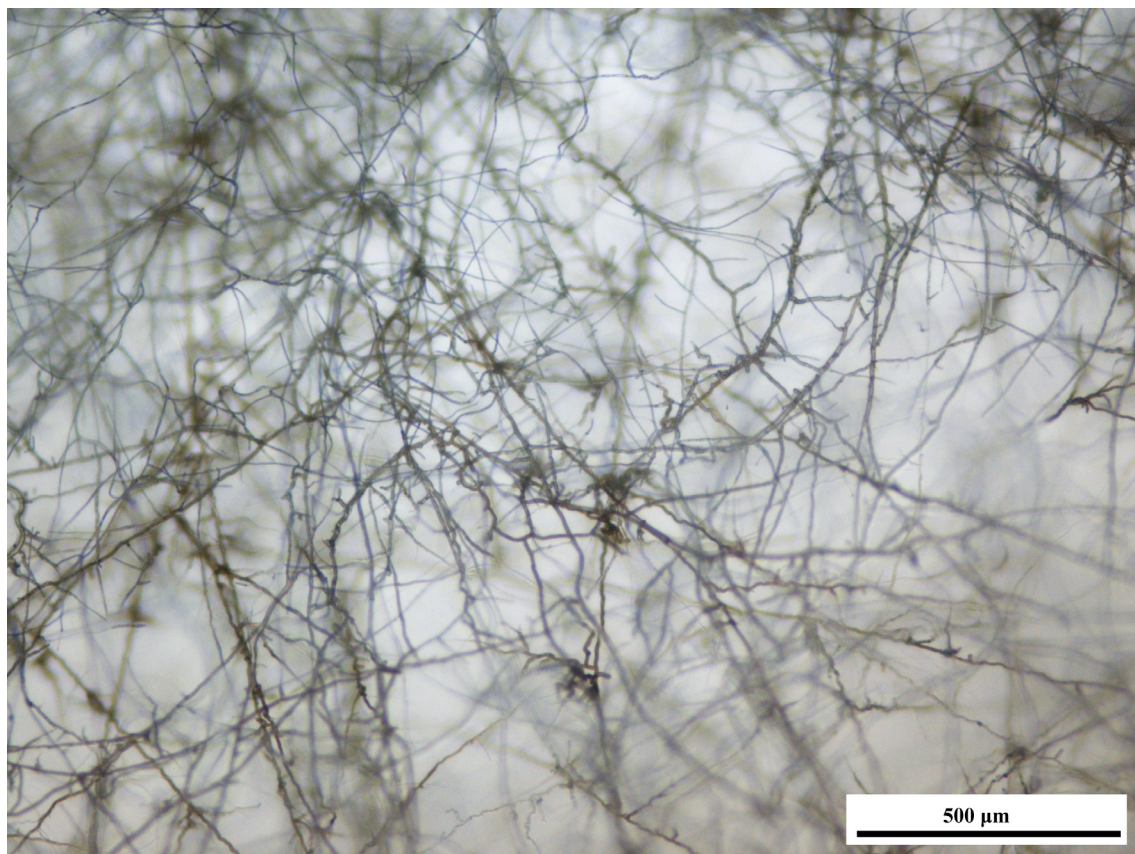
Obrázek 3.17. – Vliv auxinů na morfologii kolonií houby FU-6. Kolonie houbového izolátu FU-6 po 29 dnech kultivace na médiu ČA s různými koncentracemi fytohormonů. A: médium bez fytohormonů. B: médium s 1 mg/l 2,4-D. C: médium se 100 mg/l 2,4-D. D: médium se 100 mg/l IBA. Měřítka: strana podkladové mřížky 1 cm.



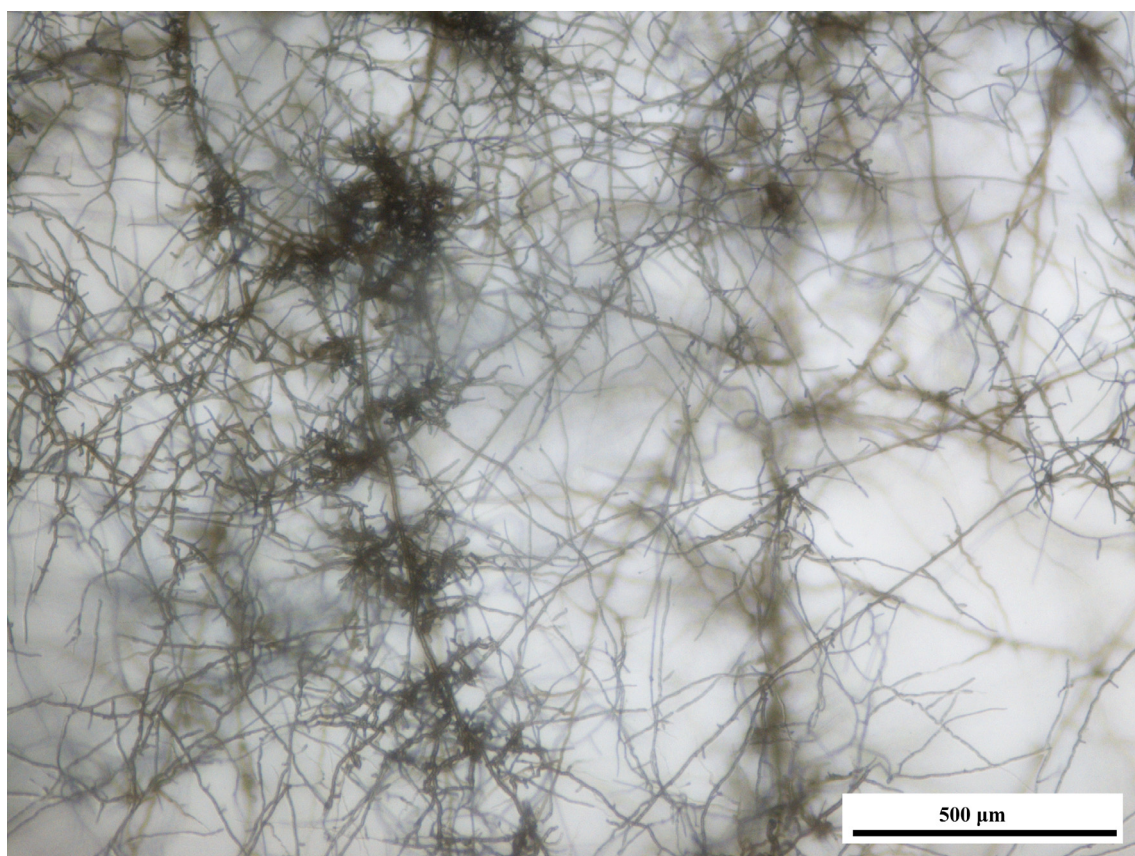
Obrázek 3.18. - houba FU-6 na médiu ČA bez fytohormonů



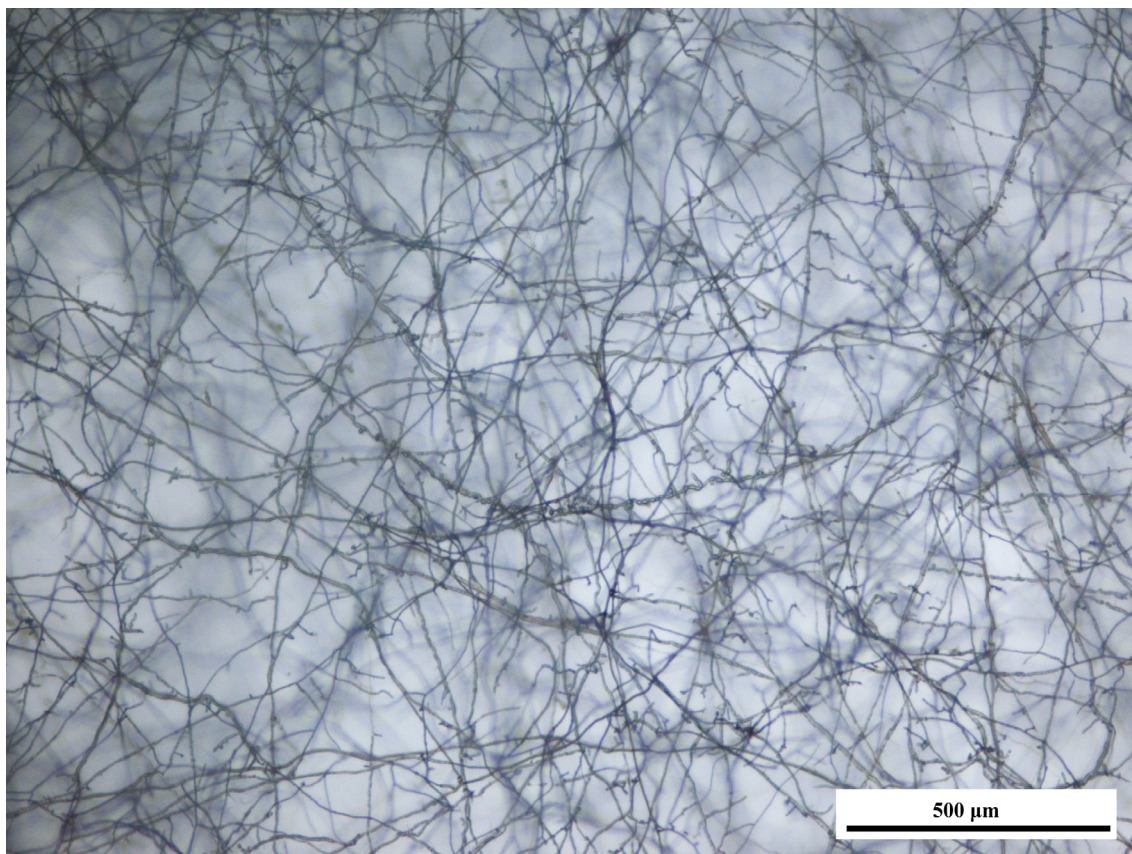
Obrázek 3.19. - houba FU-6 na médiu ČA s 1 mg/l NAA



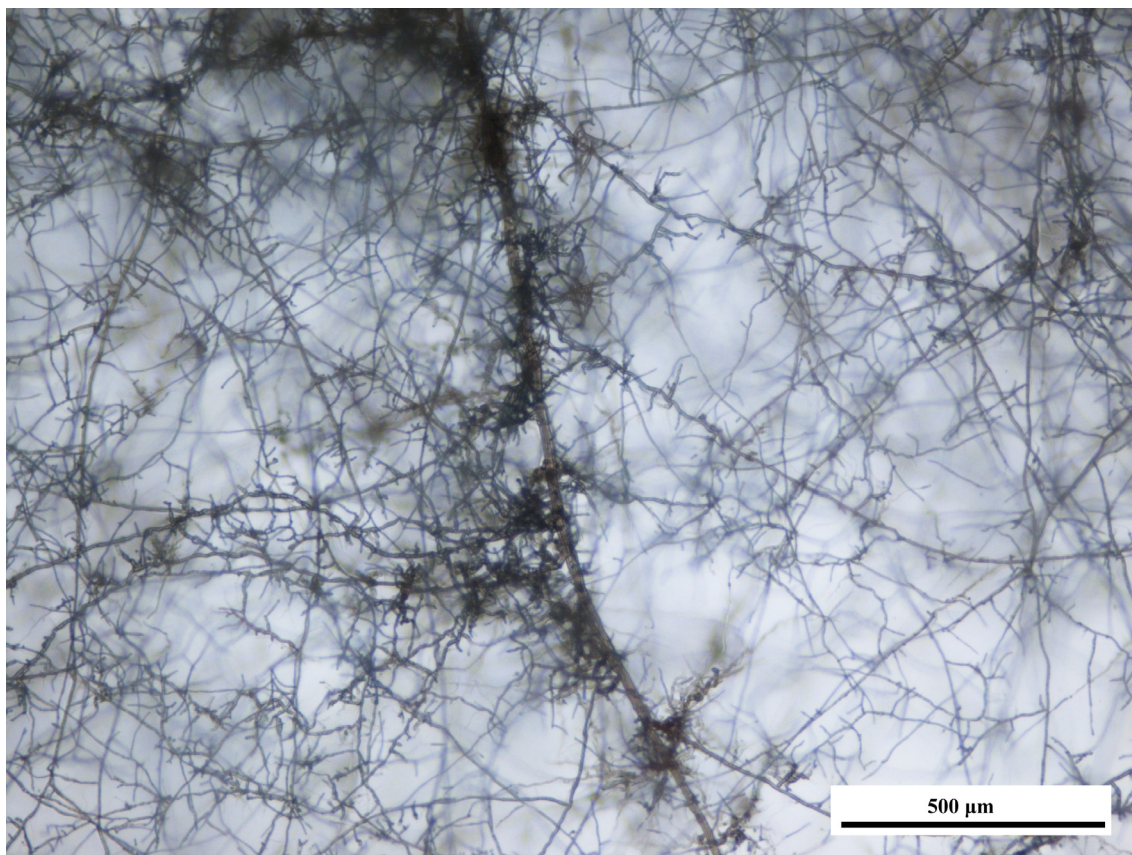
Obrázek 3.20. - houba FU-6 na médiu ČA s 1 mg/l 2,4-D



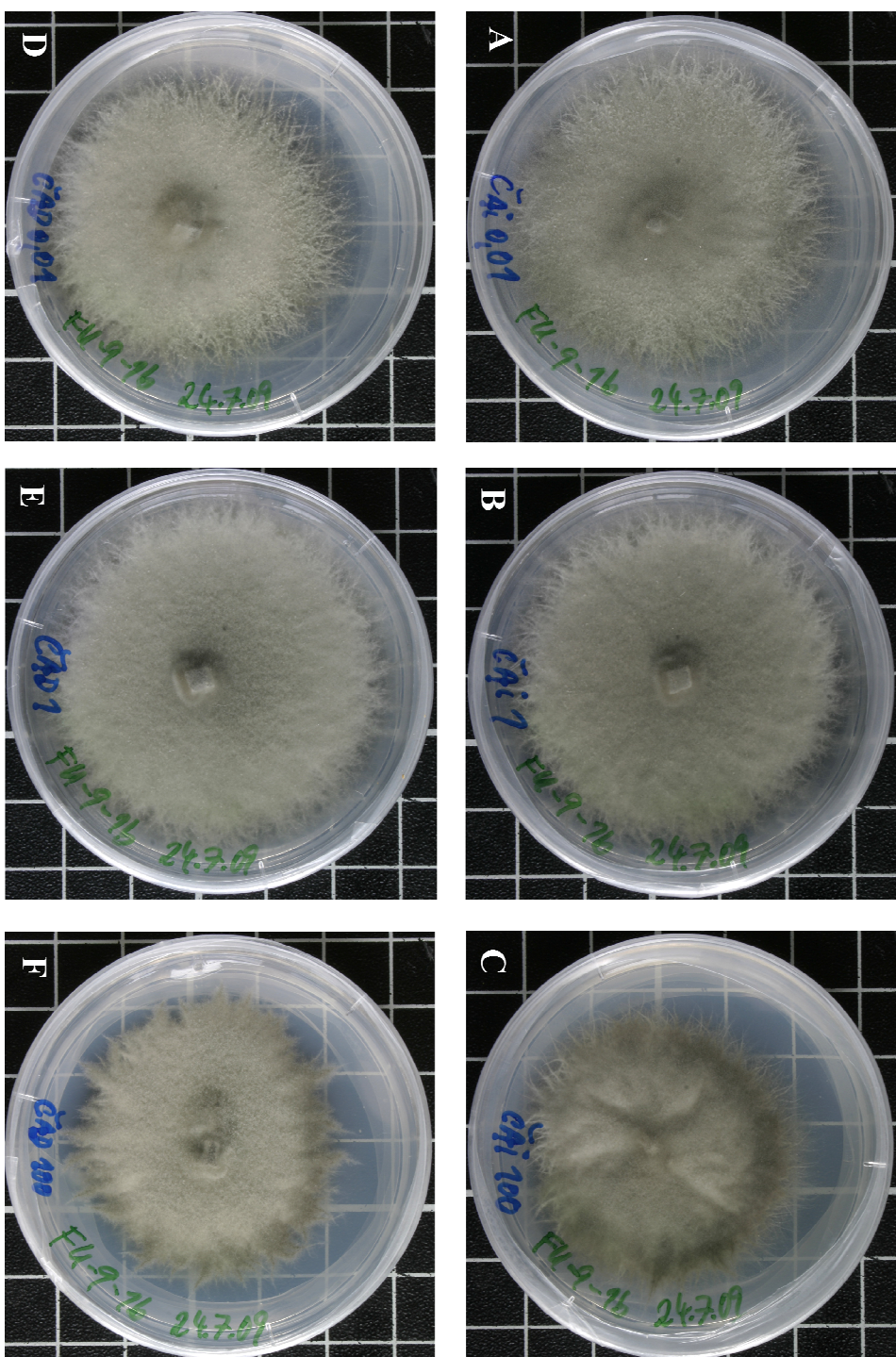
Obrázek 3.21. - houba FU-6 na médiu ČA se 100 mg/l 2,4-D



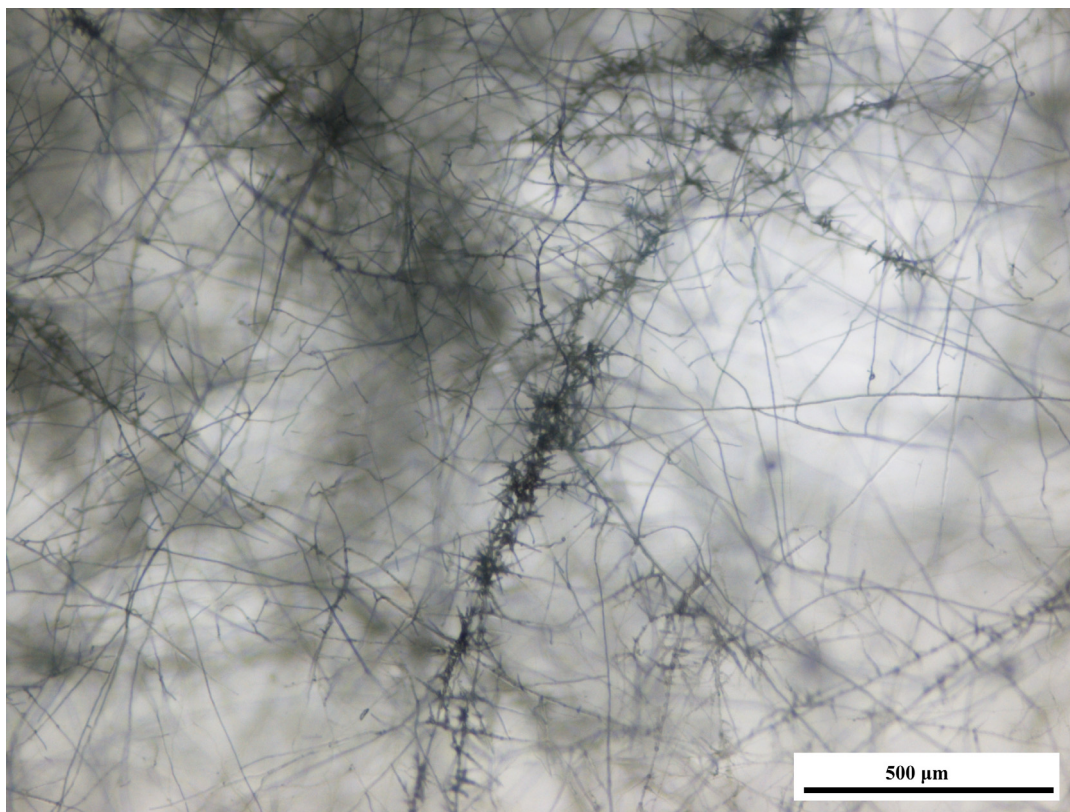
Obrázek 3.22. - houba FU-6 na médiu ČA s 10 mg/l IBA



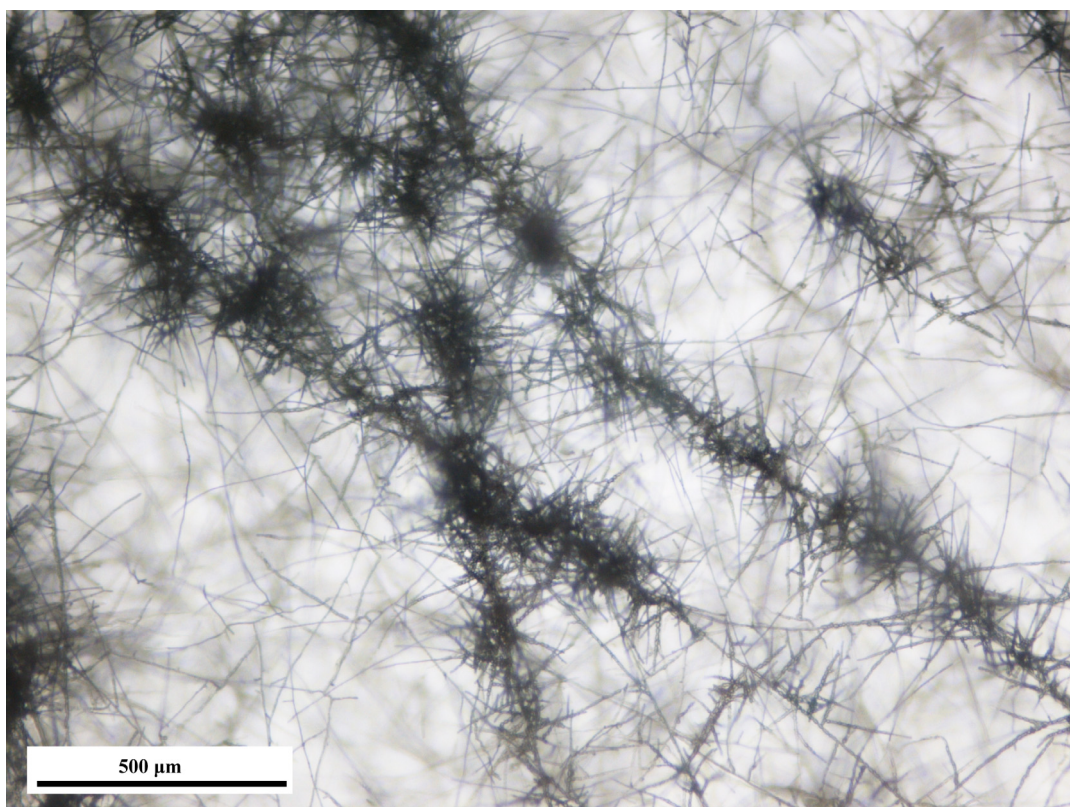
Obrázek 3.23. - houba FU-6 na médiu ČA se 100 mg/l IBA



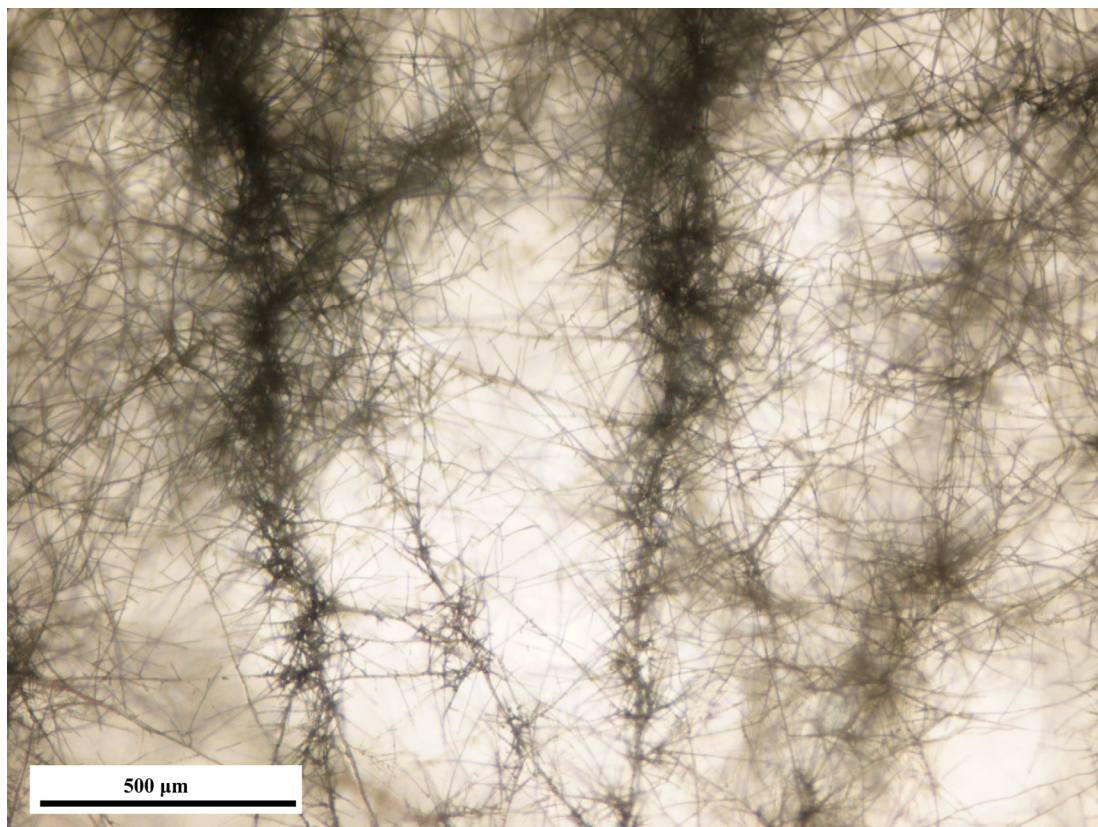
Obrázek 3.24. – Vliv auxinů na morfolologii kolonií houby FU-9-1b. Kolonie houbového izolátu FU-9-1b po 29 dnech kultivace na médiu ČA s různými koncentracemi fytohormonů. A: médium s 0,01 mg/l IBA. B: médium s 1 mg/l IBA. C: médium se 100 mg/l IBA. D: médium s 0,01 mg/l 2,4-D, E: médium s 1 mg/l 2,4-D, F: médium se 100 mg/l 2,4-D. Měřičko: strana podkladové mřížky 1 cm.



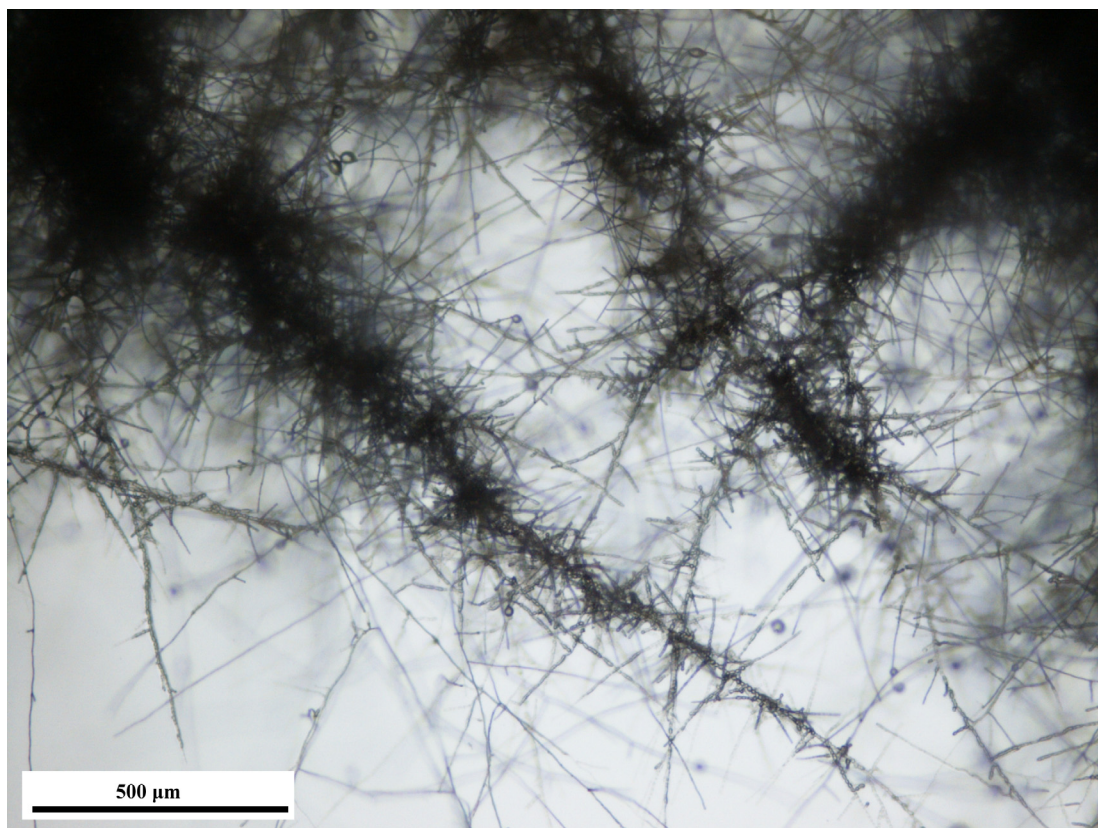
Obrázek 3.25. - houba FU-9-1b na médiu ČA bez fytohormonů



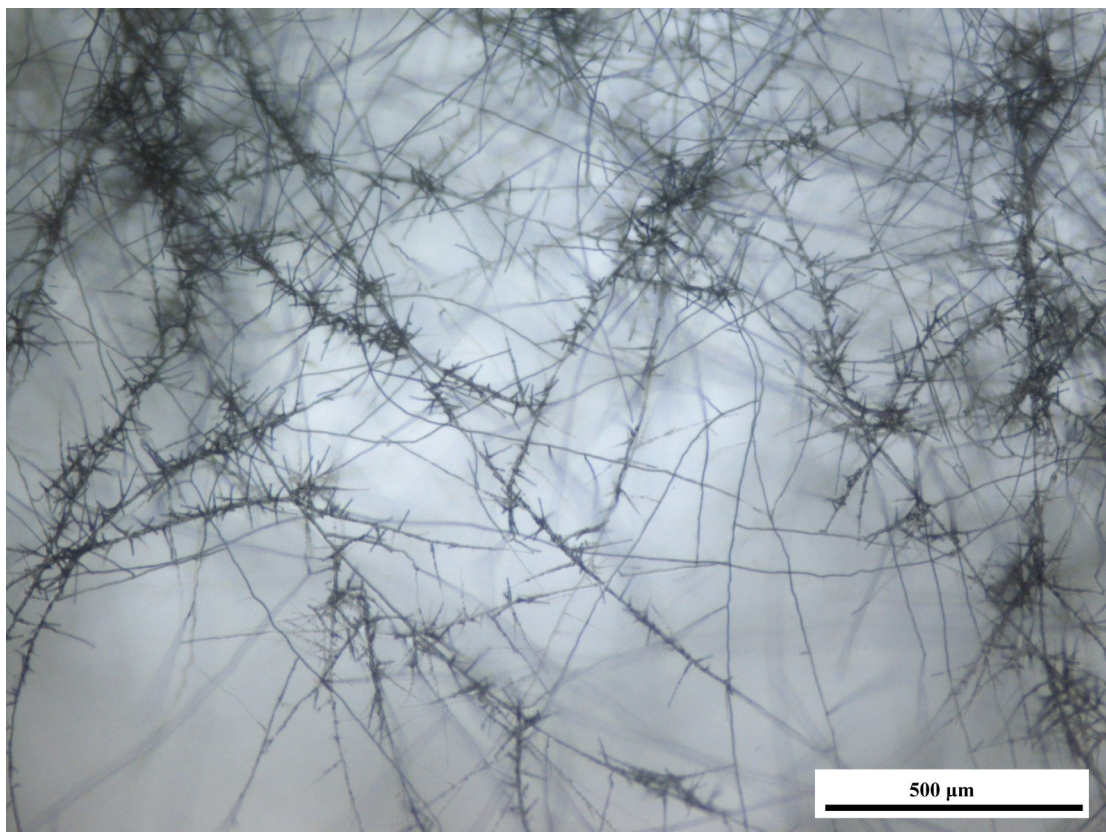
Obrázek 3.26. - houba FU-9-1b na médiu ČA s 1 mg/l NAA



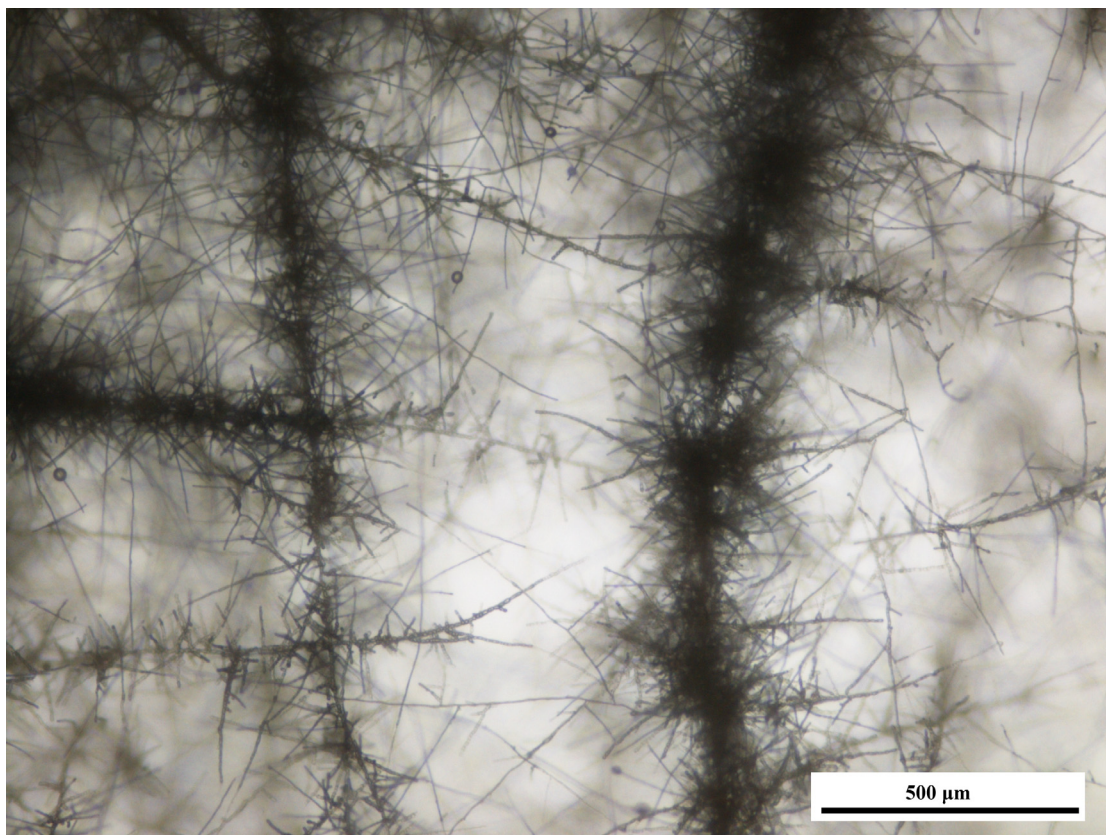
Obrázek 3.27. - houba FU-9-1b na médiu ČA s 1 mg/l 2,4-D



Obrázek 3.28. - houba FU-9-1b na médiu ČA se 100 mg/l 2,4-D



Obrázek 3.29. - houba FU-9-1b na médiu ČA s 1 mg/l IBA



Obrázek 3.30. - houba FU-9-1b na médiu ČA se 100 mg/l IBA

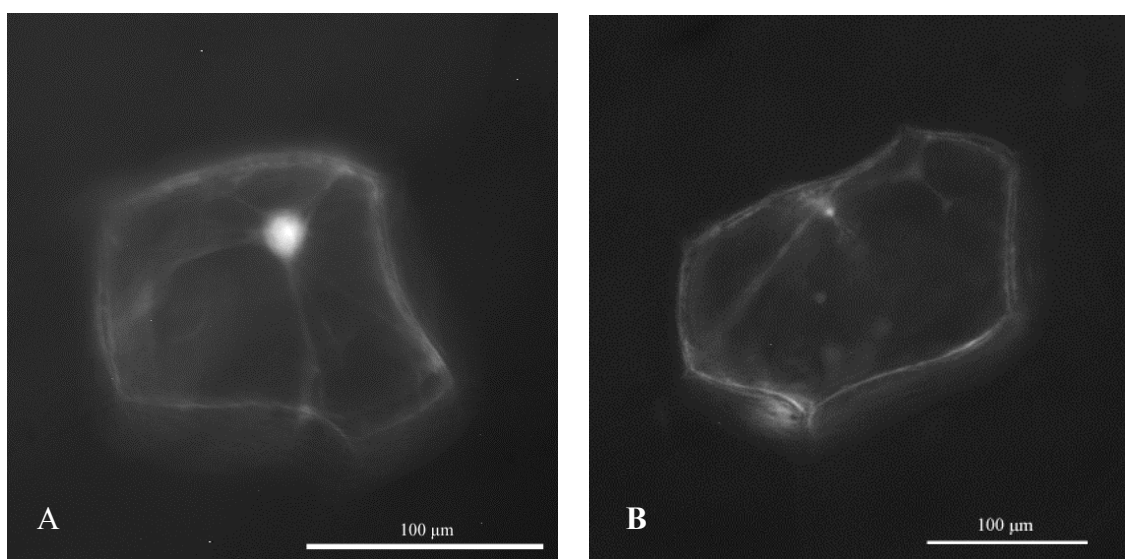
3.6. Stabilní transformace *Dactylorhiza fuchsii*

Pro lepší charakterizaci účinku auxinů a potvrzení hypotéz, vyplývajících z předchozích experimentů, byly připraveny transgenní rostliny *Dactylorhiza fuchsii* nesoucí gen pro GFP pod kontrolou auxinem indukovaného promotoru DR5. Tyto rostliny by měly umožnit vizualizaci míst zvýšené endogenní koncentrace auxinů. Jelikož však dosud není mnoho dostupných informací o transformaci orchidejí, byla nejprve ověřena možnost transientní exprese GFP a následně celého konstrukt DR5rev::GFP.

3.6.1. Transientní exprese 35S::GFP

Cílem experimentu bylo ověřit možnost exprese GFP v orchidejích podčeledi *Orchidoideae*. K prvotnímu ověření možnosti exprese GFP byl použit 1 list *Disa x Watsonii* (kultivace v Botanické zahradě Hl. m. Prahy) a vektor PCP60 s konstruktem 35S::GFP. Náboje s konstruktem 35S::GFP byly získány od Dr. J. Petráška již hotové. Transformace byla provedena nástřelem.

Po jednom dni kultivace od nastřelení nebyly v listu pozorovány žádné GFP exprimující buňky. Po 4 dnech od nastřelení byly u *Disa x Watsonii* pozorovány 3 buňky svítící jasně zelenou fluorescencí. Většina nábojů tu zůstala v povrchových vrstvách listu (pozorovány, jako tmavé kontrastní tečky). Charakteristika rozložení fluorescenčního signálu odpovídala běžnému charakteru rostlinných buněk exprimujících GFP. Buňky jsou ilustrovány obrázkem 3.31..

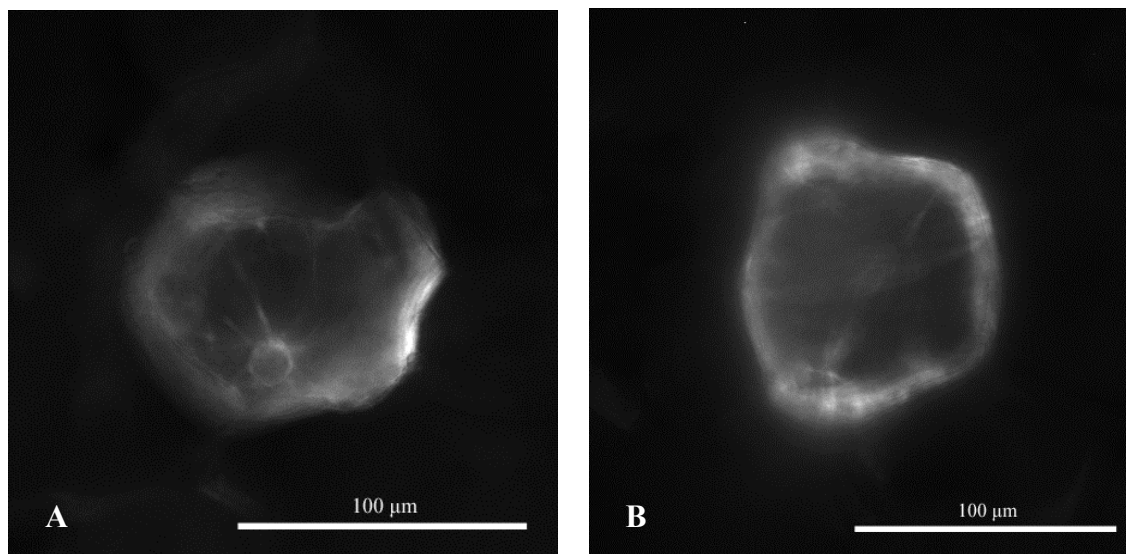


Obrázek 3.31. – Buňky listu *Disa x Watsonii* exprimující GFP. –A,B reprezentují 2 odlišné buňky téhož listu. Fluorescence excitovaná modrým světlem.

3.6.2. Transientní exprese DR5rev::GFP

Cílem experimentu bylo ověřit možnost exprese konstrukt DR5rev::GFP v orchidejích rodu *Dactylorhiza*. Listy tohoto rodu však nebyly dostupné v dostatečné kvalitě. K ověření konstrukt DR5rev::GFP byl proto využit blízkce příbuzný *Cynorkis uncinata* (původ A: Razafindratsira, Madagaskar; kultivace v Botanické zahradě Hl. m. Prahy). Byl využit binární vektor pVKH s konstruktem DR5rev::GFP. Náboje s tímto konstruktem byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 2.9.3.. Transformace byla provedena nástřelem.

Po jednom dni kultivace od nástřelení nebyly v listu pozorovány žádné GFP exprimující buňky. Po 4 dnech od nástřelení bylo u *Cynorkis uncinata* pozorováno 6 buněk svítících jasně zelenou fluorescencí. Tyto buňky byly rozmístěny okolo středové nekrotizované části nástřelu bez GFP fluorescenčního signálu. Charakter rozložení fluorescenčního signálu se zjevně nelišil od buněk exprimujících GFP pod promotorem 35S. Buňky jsou ilustrovány obrázkem 3.32..



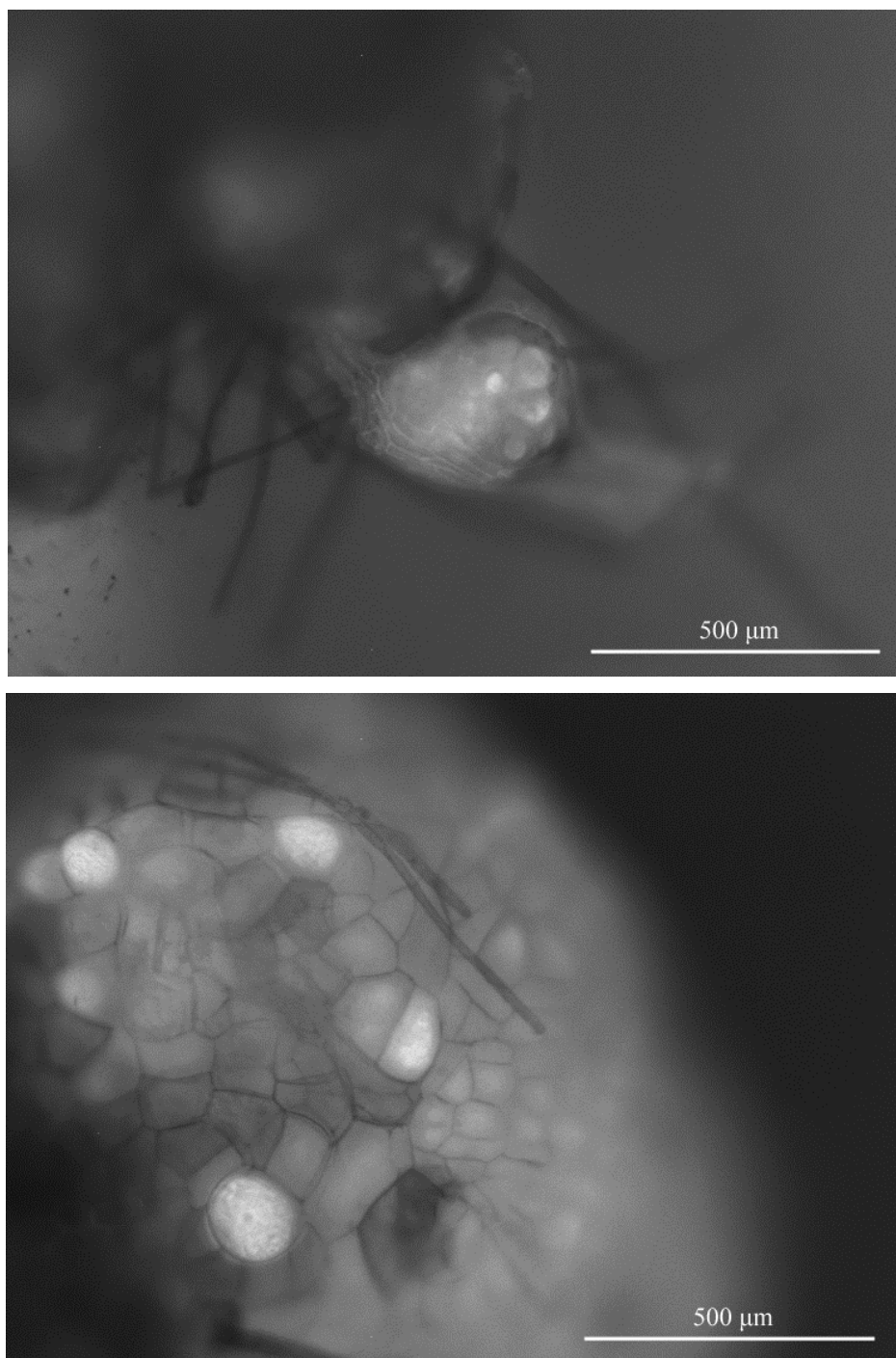
Obrázek 3.32. – Buňky listu *Cynorkis uncinata* exprimující konstrukt DR5rev::GFP. –A,B reprezentují 2 odlišné buňky téhož listu. Fluorescence excitovaná modrým světlem.

3.6.3. Vlastní transformace *Dactylorhiza fuchsii*

Cílem bylo připravit transgenní rostliny *Dactylorhiza fuchsii* exprimující GFP pod kontrolou auxinem indukovaného promotoru GFP. Rostliny DF1 byly transformovány postupem popsáním v kapitole 2.9.5..

Vzhledem k pomalému vývoji materiálu a jeho malému počtu je zatím jediným výstupem mikroskopické pozorování čerstvě transformovaných rostlin. Po kultivaci v tekutém SU4 médiu s claforanem a hygromycinem bylo v baňkách velké množství hnědnoucích hynoucích protokormů a několik světlých rostoucích menších útvarů podobných protokormům.

Po přesázení do Petriho misek byly tyto útvary pozorovány mikroskopem Olympus Provis AX70 s kostkou U-MNIBA a excitací modrým světlem. Toto pozorování ukázalo, že rostoucí útvary vykazují různou míru fluorescence, zatímco hynoucí nikoliv. Fluorescenci za uvedených podmínek nevykazovaly ani kontrolní netransformované protokormy DF1 pěstované paralelně ve stejném médiu SU4. Z uvedených pozorování se jeví velice pravděpodobné, že pozorovaná fluorescence byla způsobena expresí GFP. Fluorescence byla v některých útvarech rozmístěna rovnoměrně (obr. 3.33.A), v jiných bylo možné pozorovat jednotlivé buňky (či shluky několika málo buněk) svítící výrazněji, než okolní pletivo (obr. 3.33.B). Rostliny však byly získány teprve nedávno a hlubší charakterizace tohoto materiálu tak dosud nebyla možná.



Obrázek 3.33. – Útvary podobné protokormům *Dactylorhiza fuchsii* exprimující konstrukt DR5rev::GFP. -A,B reprezentují 2 odlišné útvary. Rostliny z výsevu DF1. Fluorescence excitovaná modrým světlem.

4. Diskuse

4.1. Sacharidy

Sacharidy byly dlouhou dobu chápány pouze jako zdroj energie a uhlíku pro rostlinný metabolismus. Výsledky novějších výzkumů však ukázaly také jejich významnou úlohu v signalizaci. Sacharidy přenášené v rámci mykorhiz tak nemusí znamenat pouze zdroj pro metabolismus, ale pravděpodobná je též jejich signální úloha v koordinaci chování hostitele a houby. O účinku různých sacharidů na chování orchidejí existuje poměrně málo informací. Pro pochopení signální úlohy sacharidů je zapotřebí nejprve charakterizovat jejich metabolismus a následně jej odlišit od vlastní signalizace. Dále se tedy zaměřím na využitelnost jednotlivých sacharidů orchidejemi, jako prvního předpokladu k pochopení možných interakcí. Další závěry však dosud zpravidla vyvozovat nelze.

4.1.1. Využití sacharidů orchidejemi

Dle dostupných literárních údajů by orchideje měly být schopné využívat glukózu, fruktózu i jejich oligosacharidy (LaGarde, 1929; Ernst et al., 1971; Knudson, 1924) V této práci rostly všechny testované orchideje nejlépe na médiích se sacharózou. Na médiích s glukózou a fruktózou byly reakce rozdílné. Protokormy *Ophrys eleonora* (OE1) rostly na médiu s glukózou velmi dobře, ale na médiích s fruktózou a kombinací fruktózy s glukózou byly v průměru výrazně menší, srovnatelné dokonce s velikostí protokormů na médiu bez sacharidů. Malá část protokormů tu však rostla výrazně více a dosáhla velikostí srovnatelných s variantami na glukóze či sacharóze. Tento jev by bylo možné vysvětlit inhibičním účinkem fruktózy v raných vývojových fázích vývoje semenáčků při a po vyklíčení. Semenáčky, které překonaly tuto inhibici, pak mohly zdárně pokračovat v růstu. U *Dactylorhiza majalis* (DM4 a DM3) se ukázala fruktóza i její kombinace s glukózou přibližně stejně vhodná, jako sacharóza. Glukóza samotná však již vedla k tvorbě menších protokormů a zřejmě i ke snížení klíčivosti. Fruktóza tedy u tohoto druhu případný inhibiční efekt na klíčení a rané fáze vývoje semenáčků nevykazuje, ale částečně může mít podobný inhibiční efekt glukóza. Podobný inhibiční účinek hexóz na klíčení semen byl již ukázán u *Arabidopsis thaliana* a je úzce spjatý se signalizační drahou kyseliny abscisové (Bossi et al., 2009; Huang et al., 2008; Xing et al., 2009). Klíčení semen *Dactylorhiza majalis* bylo inhibováno ABA a lze tedy

předpokládat podobný signalizační mechanismus. U *Oeceoclades decaryana* (ED1) nebyl pozorován průkazný rozdíl v průměru protokormů na médiích se sacharózou, fruktózou, glukózou a kombinací fruktózy s glukózou. Případný inhibiční efekt na klíčení tu tedy fruktóza ani glukóza nevykazuje. Předpoklad inhibičního účinku fruktózy u *Ophrys eleonora*e a glukózy u *Dactylorhiza majalis* nemusí být v rozporu s výše uvedenými literárními údaji. Citované práce se zabývají studiem tropických orchidejí podčeledi *Epidendroideae*. Do této podčeledi patří též zde zkoumaný *Oeceoclades decaryana*, který žádnou inhibici fruktózou ani glukózou nevykazoval. *Ophrys eleonora*e i *Dactylorhiza majalis* patří naproti tomu do podčeledi *Orchidoideae* a je tedy možné, že se v těchto skupinách rostlin uplatňují odlišné mechanismy regulace klíčení a časných fází vývoje semenáčků.

Disacharid maltózu zřejmě metabolizovaly všechny testované druhy jen částečně a neumožňovala jejich úspěšný růst. Naproti tomu LaGarde (1929) pozoroval u rodu *Cattleya* nejlepší růst semenáčků na médiích s maltózou a velmi dobrý růst na maltóze pozorovali též Ernst et al. (1971) u semenáčků rodu *Phalaenopsis*. Oba tyto rody náležejí do podčeledi *Epidendroideae*, a jiné chování zde testovaných druhů podčeledi *Orchidoideae* tedy může poukazovat na rozdíly v metabolismu sacharidů mezi těmito skupinami. Zvláštní pak ale je, že na maltóze špatně rostly též semenáčky *Oeceoclades decaryana* z podčeledi *Epidendroideae*. Tento rozpor lze vysvětlit buď tím, že v rámci podčeledi *Epidendroideae* není schopnost růstu na maltóze evolučně konzervována, nebo jiným uspořádáním experimentů. Výše citované experimenty s rody *Cattleya* a *Phalaenopsis* byly prováděny na světle, zatímco semenáčky v této práci byly kultivovány ve tmě. Naskýtá se tedy možnost, že pro dobré využití maltózy je třeba funkční fotosyntéza. Bez dalších experimentů však nelze rozhodnout, která z těchto možností je správná.

Galaktóza a částečně též disacharid laktóza obsahující galaktózu mají na orchideje dle dostupných literárních údajů toxický účinek (Ernst, 1967; Ernst, 1971; Knudson, 1924; Quednow, 1930; Wynd, 1933). Všechny výsledky této práce toto tvrzení víceméně podporují. Na galaktóze nerostly ani *Ophrys eleonora*e (OE1), ani *Dactylorhiza majalis* (DM4). Analýza endogenních sacharidů navíc ukázala, že *Ophrys eleonora*e galaktózu nejspíše vůbec nemetabolizuje. Na médiích s laktózou však určité přírůstky pozorovány byly. Protokormy *Ophrys eleonora*e (OE1) v těchto podmínkách rostly lépe, než na maltóze. Protokormy *Dactylorhiza majalis* (DM4) byly srovnatelné s variantami na glukóze, rafinóze a sorbitolu. Pouze starší semenáčky *Dactylorhiza majalis* (DM1)

přirůstaly velice málo. Analýza endogenních sacharidů u *Ophrys eleonora* ukázala, že laktóza je alespoň částečně metabolizována a naznačuje to též analýza endogenních sacharidů semenáčků *Dactylorhiza majalis*. Tyto měly na médiu s laktózou přibližně stejný obsah endogenních sacharidů, jako na médiích s jinými metabolizovatelnými sacharidy. Na základě těchto experimentů se tedy jeví pravděpodobné, že laktóza je štěpena a za inhibiční efekt na růst je zodpovědná pravděpodobně vzniklá galaktóza. Na negativní závislost mezi podílem galaktózového zbytku v přidaném sacharidu a růstem semenáčků byla ostatně již pozorována u rodu *Phalaenopsis* (Ernst et al., 1971). V souladu s tím byl v této práci na médiích s rafinózou (obsahující také galaktózu, ale spolu s fruktózou a glukózou) pozorován přírůstek buď stejný s variantou na laktóze, nebo mezi hodnotami variant na laktóze a sacharóze. Tento předpoklad částečného využití laktózy je však v rozporu s tvrzením Knudsona (1924), že orchideje nejsou schopné využívat laktózu. Jeho práce však nebyly podpořeny analýzou endogenních sacharidů a nejspíše se tedy jedná o mylný závěr. Je pravděpodobné, že v jeho experimentech docházelo ke štěpení laktózy, ale zároveň inhibici růstu semenáčků vzniklými produkty.

Manitol nemá být podle dostupných literárních údajů orchidejemi využitelný (Smith, 1973; Purves et Hadley, 1976; Van Waes, 1984, Rasmussen, 1995) s jedinou známou výjimkou – orchidejí *Galeola septentrionalis* (Nakamura, 1982). Velmi malé přírůstky srovnatelné s kontrolní variantou bez sacharidů byly v této práci pozorovány na médiích s manitolem u protokormů *Ophrys eleonora* (OE1) i rostlin *Dactylorhiza majalis* (DM1). Pouze malých rozměrů pak na tomto médiu s manitolem dorostly protokormy *Dactylorhiza majalis* (DM4) a následně uhynuly. Analýza endogenních sacharidů *Ophrys eleonora* ukázala jednak na akumulaci manitolu v protokormech, jednak ale také jeho částečné využití. V protokormech byla detekována sacharóza, fruktóza, glukóza a dva jiné neidentifikované sacharidy. Manitol tedy alespoň u tohoto druhu částečně využíván je. Analýza endogenních sacharidů v rostlinách *Dactylorhiza majalis* dále ukázala výraznou akumulaci manitolu, který pak tvořil přes 60 % zastoupení všech endogenních sacharidů. Akumulace manitolu byla již u orchidejí jednou pozorována, a sice u listů *Bletilla striata* po jeho přidání zvenčí (Smith et Smith, 1973). Jelikož *Bletilla striata* patří do podčeledi *Epidendroideae* a *Ophrys eleonora* zkoumaný v této práci do podčeledi *Orchidoideae*, mohla by být schopnost akumulace manitolu v pletivech obecnější vlastností různých orchidejí.

Jelikož mnohé houby obsahují významná množství manitolu (Smith, 1966), dalo by se předpokládat, že orchideje budou schopné manitol využívat. Význam akumulace manitolu bez významné utilizace ve fyziologických podmínkách mykorhiz dosud není zřejmý.

O případném využití sorbitolu orchidejemi literární údaje dosud chybí. V této práci byla ukázána schopnost *Ophrys eleonora* (OE1) i *Dactylorhiza majalis* (DM1 a DM4) sorbitol alespoň částečně metabolizovat. Přírůstky sice nedosahovaly hodnot variant se sacharózou, ale byly větší, než na médiích bez sacharidů. Analýza endogenních sacharidů rostlin *Dactylorhiza majalis* na médiu se sorbitolem ukázala vyšší obsah celkových sacharidů, než u rostlin na médiu bez sacharidů, srovnatelný s rostlinami na médiu se sacharózou. Analýza endogenních sacharidů protokormů *Ophrys eleonora* pak jasně ukázala na přítomnost několika dalších cukrů včetně sacharózy, které u těchto rostlin kultivovaných od vyklíčení ve tmě musely být vytvořeny z utilizovaného sorbitolu. Tyto orchideje tedy sorbitol metabolizovat mohou. Naskytá se však otázka, zda mohou orchideje přijít do styku se sorbitolem v přirozených podmínkách. Houby totiž sorbitol zpravidla neobsahují.

Trehalóza by orchidejemi podle dostupných literárních údajů měla být využívána (Ernst et al., 1971; Jheng et al., 2006; Liu et al., 2006; Purves et Hadley, 1976; Smith, 1973; Smith et Smith, 1973). V této práci byl na médiu s trehalózou pozorován horší růst semenáčků *Dactylorhiza maculata* (DN1) oproti variantě se sacharózou, zato stejně dobrý růst protokormů *Dactylorhiza majalis* (DM3). Analýza endogenních sacharidů semenáčků *Dactylorhiza maculata* ukázala velice podobné spektrum a celkový obsah sacharidů v rostlinách na médiu s trehalózou, sacharózou i glukózou. Výrazně nižší obsah sacharidů pak vykazovaly rostliny na médiu bez sacharidů. Zřejmě tedy trehalózu mohou různou měrou využívat také tyto testované druhy. Větší množství trehalózy jsou dosud u rostlin známa pouze v případě rostlin vzkříšení (*Myrothamnus flabellifolia* a *Selaginella lepidophylla*; Liu et al., 2008; Moore et al., 2007).

4.1.2. Souvislost využití sacharidů s mykorhizou

Využití trehalózy, jako zdroje energie a uhlíku pro růst je v rámci cévnatých rostlin zcela ojedinělé. Schopnost její syntézy vykazují sice mnohé rostliny, ale obsahují ji v pouze velmi malých množstvích. Výzkumy poslední doby pak ukázaly, že v podobě trehalóza-6-fosfátu nejspíše plní významnou úlohu v signalizaci, ale není významná jako zdroj energie pro metabolismus (Paul et al., 2008). Orchideje jsou pak dnes

jedinými známými rostlinami, které trehalózu umí využívat jako majoritní zdroj energie a uhlíku. Význam tohoto uzpůsobení lze hledat ve způsobu výživy raných fází semenáčků orchidejí. Tyto jsou obligátně závislé na mykotrofii. Měly by tedy být schopné využívat sacharidy houbového původu. Trehalóza je pak obecně jedním z hlavních endogenních sacharidů hub a byla detekována též v orchideoidních mykorhizních houbách (Smith, 1966). V této práci byly analyzovány endogenní sacharidy třech mykorhizních hub orchidejí. Všechny obsahovaly kromě fruktózy a glukózy také menší množství sacharidu, který mohl být trehalózou, nebo sacharózou. Zvolený detekční systém bohužel nebyl schopen odlišit trehalózu od sacharózy, a tak lze pouze na základě podobnosti s jinými houbami usoudit, že se pravděpodobně jednalo spíše o trehalózu. S trehalózou tedy mohou orchideje přijít do styku prostřednictvím mykorhizy a je poté pochopitelné, že se musely vypořádat s její utilizací.

Všechny testované houby obsahovaly také manitol. Dvě v malém množství, srovnatelným se zmíněnou pravděpodobnou trehalózou, a třetí v množství výrazně větším. Tvořil tu skoro 50 % zastoupení všech sacharidů. Manitol byl již dříve detekován též v jiných orchideoidních mykorhizních houbách (Smith, 1966). Jeví se poté zvláštní, že orchideje umí využít manitol jen částečně a spíše ho akumulují ve vysokých koncentracích. Je možné, že v mykorhizách dochází k přenosu jen některých sacharidů. Je známa řada rostlin schopných uložení manitolu (např. ječmen, kukuřice, tabák; Cram, 1984). Akumulace manitolu v pletivech je pak častým jevem u řady rostlin zapříčiněným zřejmě nízkou specifitou transportérů polyolů. Možný význam tohoto jevu u rostlin obecně pak zůstává dodnes nejasný. Lze jen poukázat na pravděpodobnou roli polyolů v interakcích mezi rostlinou a patogenem (Jennings et al., 2002; Link et al., 2005).

Orchideje se ukazují schopné využít řady sacharidů s výjimkou galaktózy. Je pravděpodobné, že jejich schopnost využít trehalózy, a možná též dalších méně často metabolizovaných sacharidů, souvisí s obligátní závislostí na mykotrofii. Na tuto souvislost poukazuje také fakt, že jediná známá orchidej využívající efektivně manitol, *Galeola septentrionalis* (Nakamura, 1982), nefotosyntetizuje a je zcela závislá na mykorhize. Musí tedy dokázat efektivně využívat sacharidy poskytované mykorhizními houbami. Je možné, že pak dokáže lépe využívat i takové houby, které obsahují ve významném množství manitol.

4.2. Účinek fytohormonů na růst a vývoj orchidejí

Kromě přenosu sacharidů jako zdroje energie a uhlíku se v regulaci mykorhizních symbióz jeví významné fytohormony. Klasický přístup rostlinné fyziologie uvažuje především syntézu fytohormonů rostlinou a význam těchto látek v koordinování růstu a vývoje rostlinných částí. Literární údaje však ukazují, že fytohormony produkují nejen samotné rostliny, ale také mykorhizní houby (Barker et Tagu, 2000; Tsavkelova et al., 2006). Některé práce pak dokonce naznačují možnou roli fytohormonů v regulaci růstu a vývoje hub (Rypáček et Sladký, 1973; Sladký et Tichý, 1974; Vinklárková et Sladký, 1978). Teoreticky by se tedy alespoň některé fytohormony mohly uplatňovat ve vzájemném dialogu mezi houbou a rostlinou.

Růst a vývoj rostlin ovlivňují mnohé fytohormony ve velmi nízkých koncentracích a v regulaci řady vývojových pochodů se ukazují rozhodující jemné balance mezi jejich hladinami. Možný přísun fytohormonů z mykorhizní houby by poté mohl posouvat tuto rovnováhu a ovlivňovat tak chování rostliny (či alespoň její příslušné mykorhizní části). Manipulace s hladinami auxinů v rostlinách již ostatně byla ukázána jako významný krok při kolonizaci rostliny různými patogenními organismy a je možné, že se mezi rostlinnými patogeny jedná o obecněji využívaný fenomén (Chung et al., 2003; Grunewald et al., 2009; Shimada et al., 2000; Yurekli et al., 2003). Mykorhizní symbiózy jsou v podstatě velmi blízké patogenním interakcím mezi rostlinami a houbami. Oba partneři zřejmě vzájemně kontrolují své chování. V mykorhizách se zpravidla mění struktura jak rostlinných pletiv, tak houbových hyf. Dříve publikované výsledky, naznačující významnou úlohu fytohormonů, především auxinů, v regulaci chování rostliny mykorhizní houbou shrnuje kapitola 1.4.1.6.. Mykorhizní houby tedy zřejmě mohou být významným zdrojem fytohormonů pro mykorhizní část rostliny. V rámci cévnatých rostlin známe především mykorhizní asociace s kořeny, výjimečně pak též s částmi hlíz či oddenky. Specifikem heterotrofních rostlin obligátně závislých (alespoň v raných fázích svého vývoje po vyklíčení) na výživě mykorhizou je navíc tvorba mykorhizy již ve fázi malého útvaru vzniklého pouhým zvětšením kulovitěho nediferencovaného embrya obsaženého v semenech (Leake, 1994). Protokorm orchidejí nemá diferencované základy žádných orgánů ani meristému a svým vzhledem odpovídá nejlépe globulární fázi vývoje embrya ostatních rostlin. Již tento protokorm vytváří mykorhizu a nejspíše se tak dostává do konfrontace s přísunem fytohormonů houbového původu. Jelikož orchideoidní mykorhiza patří mezi endomykorhizy, lze předpokládat

přísun fytohormonů přímo do buněk mykorhizních částí. Protokormy orchidejí jsou však schopné normálního vývoje též *in vitro* na médiích bez fytohormonů. Lze tedy předpokládat existenci mechanismů umožňujících pufrovat změny v hladinách fytohormonů způsobené mykorhizou. Studiu této problematiky však dosud nebyla věnována pozornost.

Z toho, co bylo řečeno je zřejmé, že právě protokormy orchidejí by pro pochopení regulací mykorhiz fytohormony mohly být velice vhodným materiálem. Lze jich kultivovat velké množství v definovaných podmínkách *in vitro*, jejich vývoj je dobře charakterizovatelný (vedoucí především k založení meristému prýtu) a jsou zcela kompletní rostlinou v dané růstové fázi. Pro tento útvar zakládající polárně meristém může být rovnováha fytohormonů podstatná a snadno interpretovatelná. Orchideje mohu navíc vytvářet funkční mykorhizy také s houbami pro jiné rostliny patogenními (Downie, 1957; Hadley, 1963; Harvais et Hadley, 1967; Williamson et Hadley, 1970). Mechanismy omezující účinky houby by tu tedy měly být dosti efektivní.

Jednou z možností, jak omezit vliv houby na rostlinu může být lokalizace mykorhiz do určitých míst rostlinného těla. Pro protokormy orchidejí je typické polarizované prorůstání houbových hyf od bazálního pólu embrya. Tento pól nezakládá žádný meristém a slouží jako mykotrofní tkáň k zajištění výživy. Do opačného pólu protokormu houba neprorůstá a tento zakládá meristém pro vznik prýtu (viz. kapitola 1.3.2.2.). V případě přenosu fytohormonů z houby do rostliny tedy může být významným faktorem také lokalizace vzniklého signálu.

4.2.1. Účinek auxinů a cytokininů

Experimenty prezentované v této práci s výsevy semen na média s fytohormony poukazují na možné schéma regulace vývoje protokormu fytohormony. Na médiích s auxiny byla pozorována elongace bazální části a omezení růstu meristému prýtu. Pletivo, jehož růst v experimentech podporovaly auxiny, mělo velké buňky svým charakterem podobné pletivu bazální části protokormu. Odlišné chování vykazovaly protokormy na médiích s cytokininy. Bylo podpořeno celkové zvětšování meristému, zakládalo se větší množství meristemických vrcholů, někdy též ektopicky, a v některých případech docházelo až k větvení protokormů. Pletivo, jehož růst v experimentech podporovaly auxiny, mělo menší buňky svým charakterem podobné spíše buňkám pólu meristému prýtu neošetřených protokormů. Tyto výsledky by mohl vysvětlit model polární lokalizace fytohormonů v protokormu. Pokud by docházelo

k lokalizaci auxinů v bazální části, převážil by zde jejich efekt a stimulovaly by růst bazálního mykotrofního pletiva. Na opačném pólu protokormu by vlivem snížené endogenní koncentrace auxinů převážil signál cytokininů a tyto působily rozšiřování základního pletiva meristémů (vznik klasického hruškovitého tvaru) spolu s následnou diferenciací meristemického pólu. Na významnou úlohu cytokininů v regulaci vývoje protokormů ukazují také výsledky studia rodu *Cypripedium* (Harvais, 1972). Autor se domnívá, že cytokininy jsou významné pro určení orientace kořen/prýt s tím, že cytokininy podporují vznik prýtu (Harvais, 1972). Stimulační účinek cytokininů na růst prýtů byl pozorován u různých orchidejí v řadě dalších prací (viz. kapitola 1.5.2.2.). Navržený model se tedy jeví ve shodě s těmito literárními údaji.

Tento model podporují také výsledky z experimentů v tekutých médiích, kdy auxiny byly aplikovány na protokorm rovnoměrně ze všech stran. Zatímco na tuhých médiích se značnou pravděpodobností mohlo dojít ke tvorbě gradientu v endogenních hladinách auxinů, v třepaném tekutém médiu byly protokormy neustále omývány stejnou koncentrací auxinů ze všech stran. Pozorované změny tu byly velice razantní – protokormy v médiích s auxiny mohutně přirůstaly, avšak nediferencovaly vůbec meristemický pól. Při výsevu do tohoto média vznikaly nejprve poměrně velké kulaté protokormy, později již přirůstající nerovnoměrně až posléze vytvářející agregáty přirostlých kulovitých útvarů. Vzniklé pletivo mělo opět charakter velkých buněk mykotrofního pletiva bazální části neošetřených protokormů. Auxiny tu tedy opět podporují dělení bazální části, avšak víceméně rovnoměrně na celém povrchu protokormu v kontaktu s médiem. Navíc při vysoké koncentraci na celém povrchu protokormu neumožňují diferenciaci meristemického pólu. Naskýtá se zajímavá paralela s emryogenezí jiných rostlin. Zatímco tekutá média se pro proliferaci embryí jeví velice vhodná (Carneros et al., 2009), následné ustavení polarity je v tekutých médiích velice obtížné. Zpravidla je doporučována kultivace na tuhých médiích, kde může dojít k ustavení polarity. Předpokládá se, že je toto ustavení polarity závislé na vytvoření gradientu hladin endogenních auxinů (Gupta et Grob, 1995).

V souladu s tímto modelem je též dosud pouze orientační pozorování transformantů exprimujících GFP pod kontrolou auxinem indukovaného promotoru DR5. Při kultivaci v tekutém médiu s auxiny vykazovaly menší kulovité útvary rovnoměrné rozložení fluorescenčního signálu GFP (a tedy zřejmě též hladin endogenních auxinů). Některé větší útvary již neměly signál GFP rozložený rovnoměrně, ale lokalizovaný přednostně do povrchových buněk v místě intenzivněji rostoucích částí. Nejspíše tu tedy auxinové

maximum specifikuje dělení buněk, které však nediferencují v klasické meristemické části, ale mají charakter částí bazálních.

Výše popsaný model regulace fytohormony nejspíše platí po celou dobu trvání protokormu, jak naznačují experimenty s předpěstovanými protokormy, které po přesázení na tuhá média s auxiny reagovaly velmi podobným způsobem jako při přímém výsevu. Na protokormech se tvořily dlouhé útvary odpovídající svým charakterem bazální části. Při přesázení do tekutého média s auxiny pak zcela zanikal založený meristém prýtu a tvořila se mohutně rostoucí neorganizovaná hmota stejného charakteru, jako při přímém výsevu do tekutého média. Oba tyto výsledky naznačují na stejně fungující mechanismy též v pozdějších fázích vývoje protokormů.

4.2.1.1. Souvislosti s embryogenezí ostatních rostlin

Pokud výše popsaný model platí, naznačuje zajímavou paralelu. Při vývoji embrya *Arabidopsis thaliana* dochází v globulární fázi k polarizaci toku auxinů a tvorbě maxima jejich endogenních hladin v bazální části u suspensoru. Jedná se tu o aktivní proces provázený relokací auxinových přenašečů PIN1 a PIN7 (Friml et al., 2003). Výsledky této práce tedy naznačují, že v regulaci vývoje protokormů orchidejí se uplatňují podobné mechanismy lokalizace fytohormonů jako v globulárním stadiu embryí *Arabidopsis thaliana*. Embrya v semenech orchidejí jsou víceméně kulatým tvarem nediferencovaných buněk. Vznikají pouze několikerým dělením buněk zygoty, a jejich vývoj je tak jakoby zastaven ve fázi odpovídající právě globulární fázi vývoje embrya *Arabidopsis thaliana*. Další rozrůstání tohoto útvaru a především diferenciaci meristému se odehrává až po vyklíčení zcela nezávisle na mateřské rostlině.

Pro tuto paralelu v lokalizaci auxinů svědčí také chování mutantů *Arabidopsis thaliana* GNOM a čtyřnásobného mutantu pin1pin3pin4pin7. Oba tyto mutanty vedou k podobné poruše embryonálního vývoje. Ze zygoty vzniká dělením globulární embryo, které však není schopné diferencovat základy orgánů, a vznikne tak pouze větší koule. Mutant Gnom je defektní v ARF GTP/GDP výměnném faktoru potřebném pro správnou lokalizaci proteinů PIN (Geldner et al., 2009). Mutant pin1pin3pin4pin7 je defektní ve všech proteinech PIN potřebných pro správnou lokalizaci auxinu v embryu (Friml et al., 2003; Friml, pers.com.). Oba tyto mutanty tedy nejsou schopné efektivního transportu auxinu a díky tomu nedokáží polarizovat globulární embryo. Velmi podobná reakce byla pozorována při kultivaci protokormů orchidejí v tekutém médiu s auxiny (kapitola 3.4.1.6.). Opět vznikaly kulovité útvary neschopné diferencovat meristemický pól.

Pravděpodobně je tedy pro diferenciaci meristemického pólu potřebné snížení hladiny endogenních auxinů, což umožní projev signálu cytokininů. Aplikace auxinů v tekutém médiu pak podobně jako zmíněné mutanty *Arabidopsis thaliana* defektní v transportu auxinu gnom a pin1pin3pin4pin7 znemožňuje vytvoření tohoto minima, a tedy diferenciaci meristému prýtu.

V souladu s tímto modelem je dále skutečnost, že ke tvorbě mykorhizy dochází řízeně na bazálním pólu embrya. Právě auxiny se ukazují klíčové v regulaci mykorhizních symbióz (viz. kapitola 1.4.1.7.). Pokud je tedy houba zdrojem auxinů také v orchideoidních mykorhizních symbiózách, může docházet vlivem mykorhizy ke zvýšení obsahu endogenních auxinů v buňkách bazálního pólu protokormu. Toto zvýšení by podle navrženého modelu nepůsobilo výraznější poruchy ve vývoji protokormu. Došlo by k podpoře dělení buněk bazální části. Ta by se nejspíše prodlužovala a v dostatečné vzdálenosti od zdroje auxinů (tedy mykorhizní části) vytvořila prýt. Navržený model je tedy v souladu s pozorovaným průběhem mykorhizní kolonizace protokormů.

4.2.1.2. Možné souvislosti s evolucí obligátní mykotrofie

Za předpokladu platnosti tohoto modelu lze poté uvažovat o možné evoluci typicky malých semen orchidejí. Semena s malým embryem bez diferencovaných základů orgánů mohla vzniknout buď zastavením vývoje ve fázi odpovídající globulárnímu embryu s dokončením vývoje až po vyklíčení, nebo redukcí dalších vývojových fází embrya s následnou sekundární diferenciací po vyklíčení. Pokud se tedy uplatňují stejné mechanismy v regulaci vývoje globulárního embrya *Arabidopsis thaliana* a protokormu orchidejí, jeví se velice pravděpodobné, že u orchidejí došlo k zastavení vývoje embrya v této fázi a rané fáze vývoje semenáčků orchidejí odpovídají pozdějším fázím embryogeneze jiných rostlin.

V kontextu těchto úvah je zajímavé, že podobná miniaturní semena se vyvinula nezávisle u většiny obligátně mykotrofních rostlin (Leake, 1994). Bylo by tedy velice zajímavé zjistit, zda se i v těchto případech uplatňují podobné mechanismy. Pokud by tomu tak bylo, jeví se velice pravděpodobné, že pokaždé došlo k zastavení embryonálního vývoje v příslušné fázi. Pokud by se podařilo odhalit odlišné mechanismy regulace vývoje semenáčků těchto rostlin po vyklíčení, mohl by takový způsob vývoje nejspíše vznikat též jinými cestami.

4.2.1.3. Účinek kombinace NAA a BAP

Na význam rovnováhy mezi auxiny a cytokininy ukazují také výsledky experimentu, kdy byly protokormy pěstovány na médiích s různými koncentracemi NAA a BAP. Na médiích s 10 mg/l NAA a 0,01 mg/ BAP byl stále patrný inhibiční efekt přílišné koncentrace auxinů na růst protokormů. Vznikaly pouze malé protokormy se zbytněným pletivem bazální části. Pokud byl ale k 10 mg/l NAA přidán BAP ve vyšší koncentraci 1 mg/l, dorůstaly protokormy větších rozměrů a některé vytvářely též zvláštní protáhlé útvary. Inhibiční účinek vysoké koncentrace NAA tu může být oslaben přidáním BAP. Nejspíše je tedy pro správný vývoj potřebná souhra obou auxinů i cytokininů. Na médiích s vyrovnanou koncentrací NAA i BAP (1 a 1 mg/l) docházelo ke tvorbě zvláštních útvarů. Protáhlých, z původního protokormu polárně rostoucích částí protokormů. Jejich charakter byl však jakoby mezi klasickým prýtem a elongovaným protokormem na médiích s auxiny. Na vrcholu vytvářely meristemickou strukturu menších buněk, posléze však sílící v širší útvar tvořený velkými buňkami typickými pro bazální část protokormu. Nereagovaly tak ale všechny protokormy, u značné části docházelo pouze k částečnému prodloužení širokého protokormu a růst zmíněných protáhlých útvarů začínal na různě velkých protokormech různou dobu po vyklíčení. Takové chování lze nejspíše vysvětlit rozdílnou distribucí NAA a BAP v protokormu. I při zvýšení hladiny auxinů se tyto nejspíše mohou v protokormu polárně transportovat do bazálních částí. Pokud je tedy přítomen v dostatečném množství také cytokinin, může snadno dojít k převážení jeho účinku v apikální části protokormu, kde dá podle výše navrženého modelu vznik meristému. Vysoká hladina endogenních auxinů však může působit na buňky blíže bazální části, které tímto dostanou signál k diferenciaci v typické velké buňky bazální části protokormu. Potvrzení tohoto vysvětlení však bude vyžadovat ještě další experimenty.

4.2.2. Účinek ABA a GA₃

Další testované fytohormony, ABA a GA₃ nevykazovaly výrazný vliv na morfologii semenáčků. ABA samotná inhibovala klíčení semen. Inhibiční vliv na klíčení semen vykazovala u *Dactylorhiza majalis* již při koncentracích 0,01 a 0,1 mg/l a od koncentrace 1 mg/l byl již vývoj mladých protokormů inhibován zcela, zatímco u *Anacamptis papilionacea* s.s. byl inhibiční efekt zřetelně pozorovatelný od koncentrace 0,1 mg/l a úplná inhibice nastala až na koncentraci 10 mg/l. Tyto výsledky

jsou ve shodě s literárními údaji, kdy ABA inhibovala klíčení *Dactylorhiza maculata* (Van Waes, 1984) a semena tohoto druhu obsahovala nižší množství endogenní ABA, než semena obtížněji klíčícího druhu *Epipactis helleborine* (Van der Kinderen, 1987).

Naproti tomu sporé literární údaje značí, že GA₃ klíčení orchidejí nepodporuje, jak je to časté u jiných rostlin (Borris et Voigt, 1986; Van Waes et Debergh, 1986; Wilkinson et al., 1994). V této práci experimenty s *Dactylorhiza majalis* a *Anacamptis papilionacea* s.s. neprokázaly rozdíl ve velikosti protokormů brzy po vyklíčení. Uspořádání experimentů však neumožňovalo hodnocení klíčivosti, ale pouze vývoje semenáčků, takže možný účinek na stimulaci klíčení jinak dormantních semen nemohl být testován. Z provedených experimentů však vyplývá, že klíčení neurychluje.

U *Dactylorhiza majalis* byl po další době kultivace pozorovatelný plynulý pokles velikosti protokormů se vzrůstající koncentrací GA₃ v médiu. Protokormy však nevykazovaly zjevné morfologické změny. Možné vysvětlení skýtá paralela s účinky GA₃ u jiných, lépe prozkoumaných rostlin. Gibereliny obecně fungují v regulaci řady dějů jako signál pro přechod do další vývojové fáze (Viktor Žárský, pers.com.). Pokud by tomu tak bylo též u protokormů orchidejí, signalizoval by GA₃ pro ukončení fáze růstu protokormu a přechod do fáze tvorby prýtu. Je-li tato další fáze závislá na jiných faktorech, mohl by tento model vysvětlit pozorované zmenšení velikosti protokormů. Tento model je ve shodě s literárními údaji, kdy GA₃ podporoval růst prýtů u *Catasetum fimbriatum* (Suzuki et al., 2004) a semenáčků rodu *Dactylorhiza* (Borris et Albrecht, 1969; Gruenschneder, 1973). Jiný giberelin, GA₄, podporoval růst prýtů *Cypripedium calceolus* (Borris, 1969).

4.3. Účinek fytohormonů na houby

Při tvorbě mykorhizy je ovlivněno jak příslušné pletivo rostliny, tak hyfy houby. Předpokládá se tedy obousměrná signalizace mezi houbou a rostlinou. Dosavadní výsledky naznačují, že významnou roli v signalizaci houby rostlině mohou hrát fytohormony, především auxiny (viz. kapitola 1.4.1.7.). O signalizaci v opačném směru, tedy rostliny houbě, však informace chybí. Jelikož houby dokáží syntetizovat fytohormony, byl by možný účinek těchto látek také na jejich růst a vývoj. Existují ojedinělé starší práce zabývající se účinkem fytohormonů na růst hub v poměrně vysokých koncentracích – řádově stovky mg/l (Rypáček et Sladký 1972; Rypáček et Sladký, 1973; Sladký et Tichý, 1974; Vinklárková et Sladký, 1978). Vzhledem

k obvyklým účinným koncentracím fytohormonů v rostlinách se jeví dosti pravděpodobné, že takto vysoké koncentrace fytohormonů se ve fyziologických podmínkách regulace mykorhiz neuplatňují. Ostatně výsledky této práce ukázaly, že takto vysoké koncentrace auxinů a cytokininů jsou již pro orchideje letální. V této práci byl tedy proveden také experiment zabývající se účinky nižších koncentrací vybraných fytohormonů na růst a vývoj dvou mykorhizních hub. Cytokinin BAP nevyvolával zřetelné změny, ale všechny testované auxiny (2,4-D, IBA, NAA) změny vyvolávaly. Při koncentracích 100 mg/l byla pozorována mohutná odezva spočívající především ve zvýšeném větvení hyf. Podobné změny však bylo možno pozorovat již při nižších koncentracích 1 a 10 mg/l a v některých případech již 0,1 mg/l. Při odpovídajících koncentracích fytohormonů v médiu jsou již protokormy orchidejí schopné růstu a na koncentraci 0,1 mg/l již i celkem normálního vývoje. Je tedy možné, že auxiny hrají roli též v komunikaci ve směru rostlina houbě.

Při tvorbě orchideoidních mykorhiz dochází v rostlinných buňkách ke vzniku smotků větvených hyf – pelotonů (viz. Gryndler et al., 2004). Změny pozorované v této práci na myceliu hub kultivovaných na vyšších koncentracích auxinu vedou ke vzniku shluků větvených hyf, jež částečně připomínají tyto pelotony. Naskytá se tedy možnost, že v orchideoidních mykorhizních symbiózách regulují auxiny také vývoj houby. Signalizace auxiny by pak mohla vytvářet složitou síť vzájemných regulací, kdy tyto ovlivňují růst a vývoj obou partnerů mykorhizní asociace navzájem.

5. Závěry

Studium raných fází vývoje semenáčků vybraných orchidejí a mykorhizních hub vedlo k následujícím závěrům:

- Semenáčky zkoumaných orchidejí mohou využívat jako výhradní zdroj energie a uhlíku sacharidy fruktózu, glukózu, maltózu, rafinózu, sorbitol, sacharózu a trehalózu. V malé míře je metabolizována též laktóza.
- Semenáčky *Dactylorhiza majalis* mohou přijímat manitol z média a akumulovat ho ve vysokých koncentracích. Nejspíše je také okrajově využitelný.
- Semenáčky *Ophrys eleonora* mohou přijímat manitol z média, akumulovat ho a jen v malé míře utilizovat.
- Trehalóza může být využívána orchidejemi rodu *Dactylorhiza* jako výhradní zdroj uhlíku a energie. Zatímco pro semenáčky *Dactylorhiza majalis* je trehalóza rovnocenným zdrojem se sacharózou, semenáčky *Dactylorhiza maculata* ssp. *maculata* ji metabolizují, avšak přirůstají výrazně méně oproti sacharóze.
- U *Ophrys eleonora* má fruktóza inhibiční účinek na vývoj raných fází semenáčků či přímo klíčení.
- U *Dactylorhiza majalis* má glukóza nejspíše inhibiční účinek na vývoj raných fází semenáčků či přímo klíčení.
- Semenáčky *Ophrys eleonora* nemetabolizují galaktózu a pro orchideje obecně má silně inhibiční až toxický účinek.
- Semena orchidejí obsahují menší množství rozpustných sacharidů. U *Anacamptis papilionacea* s.s., *Dactylorhiza incarnata*, *Dactylorhiza majalis*, *Himantoglossum robertianum*, *Orchis purpurea* i *Sobralia dichotoma* je hlavním sacharidem v semenech sacharóza.
- Analyzované mykorhizní houby orchidejí obsahují především glukózu, fruktózu a manitol.
- Kinetin a kinetin ribosid inhibují vývoj raných fází semenáčků *Dactylorhiza majalis* až v koncentraci 100 mg/l. Médium s koncentrací těchto fytohormonů 10 mg/l umožňuje zdárný vývoj semenáčků.

- Auxiny výrazně neinhibují klíčení semen *Dactylorhiza fuchsii* ani v koncentracích 100 mg/l média.
- Vývoj protokormů orchidejí je řízen auxiny a cytokininy
- ABA inhibuje klíčení *Dactylorhiza majalis* i *Anacamptis papilionacea*.
- GA₃ neurychluje klíčení *Dactylorhiza majalis* ani *Anacamptis papilionacea*.
- V orchidejích podčeleďi *Orchidoideae* bylo dosaženo exprese GFP pod kontrolou promotoru 35S i DR5rev.
- Orchidej *Dactylorhiza fuchsii* byla transformována pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Příloha 1 - použité chemikálie

(±)-ABA	Sigma, Plant Cell Culture Tested, app. 99%, A1049
1-NAA	Serva, p.a., analytical grade, 30080
2,4-D	Sigma, Plant Cell Culture Tested, min. 95%, D-8407
6-BAP	Serva, reinst – research grade, 14812
agar	Sigma, Plant Cell Culture Tested, A 1296
Agarose electrophoresis grade	GibcoBRL (Life Technologies™), 15510
aktivní uhlí	Sigma, Cell Culture Tested, C-9157
Ca(OCl) ₂	Chlorové vápno na desinfekci – Spolana a.s. Neratovice
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Lachema
CaCl ₂	Lachema, purum
casein enz. hydrolyzát	Sigma, Plant Cell Culture Tested, C-7290
claforan	Ceftax
CoCl ₂	Lachema
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Penta
D-(+)-galactose	Sigma, min. 99%, G0750
D-(+)-raffinose pentahydrate	Fluka (BioChemika), for microbiology, >99% (HPLC), 83400
D-fructosa	Lachema, p.a., 40419
D-mannit	Lach-Ner, p.a., Kat.č. 30635
D-sorbit	Serva, Research grade for bacteriology and pharmacology, >99% (HPLC), 35230
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Lachema, p.a.
GA ₃	Sigma, Plant Cell Culture Tested, min. 90% of total gibberellins, G7645
glukóza	Penta, p.a.
Glycerol (plant)	Serva, 23176
glycin	Sigma, Plant Cell Culture Tested, G-6143
H ₂ SO ₄	Lachema, p.a.
hygromycin	Sigma
IBA	Lachema
K ₂ HPO ₄	Lachema, p.a., 30540
kanamycin	Sigma
KCl	Lach-Ner, p.a.
KH ₂ PO ₄	Lachema, p.a.
KI	Lachema
kinetin	Serva, p.a. – analytical grade, 27190
kinetinribosid	Serva, p.a., analytical grade, 27195
KNO ₃	Lachema, p.a.
kyselina citronová	Penta, bezvodá, p.a.
kyselina nikotinová	Serva, research grade, 30320
lactosa	
maltose monohydrate	Duchefa Biochemie, Prod.No M0811, Lot.No: 001590.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Lach-Ner, p.a., 30807
MnSO ₄ ·H ₂ O	Merck, p.a., 6963
myo-inositol	Sigma, min. 99%, I5125

Na ₂ EDTA·2H ₂ O	Lach-Ner, p.a.
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Lachema, p.a.
NaNO ₃	Lachema, p.a.
NH ₄ NO ₃	Penta, p.a.
pangamin	FF Servis, PargaVit – Originál, L001165
pepton	Roth, Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, Charge 40790950
pyridoxin – HCl	Sigma, Plant Cell Culture Tested, P-8666
rifampicin	Sigma
sacharóza	Penta, p.a.
Savo [®]	Biochemie Bohumín
thiamin – HCl	Sigma, Plant Cell Culture Tested, T-3902
trehalóza	Duchefa Biochemie, >99%, T1395, Lot.No:006169.02
Tween [®] 20	Serva, pure, 37470
yeast extract	Serva, Yeast extract Servabacter [®] powder, 24540
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Lachema, p.a.

Příloha 2 – kultivační média**zásobní roztoky pro přípravu médií****Zásobní roztoky solí****Mo**

objem	1 l
KH ₂ PO ₄	2,8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,8 g
CaCl ₂	2,0 g
skladován v chladničce	

MS-A

objem	1 l
NH ₄ NO ₃	33 g
KNO ₃	38 g
CaCl ₂	6,62 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,4 g
KH ₂ PO ₄	3,4 g
skladován v chladničce	

MS-B

objem	500 ml
KI	0,083 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,69 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,860 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5 mg
CoCl ₂	1,3 mg
skladován v chladničce	

Fe

objem	500 ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3,73 g

Obě složky byly rozpuštěny odděleně ve 200 ml destilované vody, zahřáty v mikrovlnné troubě na cca 80°C, poté byl roztok FeSO₄·7H₂O pozvolna přilít za stálého míchání k roztoku Na₂EDTA·2H₂O, stále mícháno až do vychladnutí, doplněno destilovanou vodou na objem 500 ml.

zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)

MS-D

objem	500 ml
inositol	10 g
kyselina nikotinová	50 mg
pyridoxin – HCl	50 mg
thiamin – HCl	50 mg
glycin	0,2 g
zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)	

RAM3_A

objem	1l
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g
skladován v chladničce	

Zásobní roztoky vitamínů**DAGR**

objem	500 ml
inositol	10 g
kyselina nikotinová	50 mg
pyridoxin (HCl)	50 mg
thiamin (HCl)	10 mg
glycin	0,2 g
zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)	

vtn

objem	100 ml
thiamin (HCl)	0,002 g
pyridoxin (HCl)	0,002 g
kyselina nikotinová	0,01 g
glycin	0,06 g
zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)	

ananas

K přípravě roztoku byl používán ananas zakoupený v běžné obchodní síti. Kuchyňským nožem byl rozkrájen na plátky, z nich okrájeny širší okraje, ty dále zpracovány pro tento roztok. Vlastní středová část byla použita k jiným (kulinářským) účelům. Okraje byly nakrájeny na kostičky cca 2 x 2 cm, vloženy do plátěného sáčku, tento maximálně komprimován stlačováním a stáčením v rukách nad širší mísou, do níž byla jímána vylisovaná kapalina. Tato byla následně rozpipetována po 5 a 10 ml do plastových nádobek a skladována do použití při -80°C.

Zásobní roztoky fytohormonů

kinetin

- roztok 10 mg/ml
rozpuštěno v čistém ethanolu
- roztok 0,5 mg/ml
naředěno z roztoku 10 mg/ml

sterilizováno filtrací, skladováno při -20°C, přidáváno po klávození

BAP

- roztok 10 mg/ml
108 mg rozpuštěno v 5 ml 1M NaOH, doplněno demineralizovanou vodou
- roztok 0,5 mg/ml
naředěno z roztoku 10 mg/ml

skladováno při +4°C, přidáváno před klávozením

IBA

- roztok 10 mg/ml
rozpuštěno v čistém ethanolu
- roztok 0,5 mg/ml
naředěno z roztoku 10 mg/ml

sterilizováno filtrací, skladováno při -20°C, přidáváno po klávození

2,4-D

- roztok 10 mg/ml
rozpuštěno v čistém ethanolu
- roztok 0,5 mg/ml
10-20 mg rozpuštěno v 500 µl 1M NaOH, doplněno demineralizovanou vodou

skladováno při +4°C, přidáváno před klávozením

NAA

- roztok 10 mg/ml
95 mg rozpuštěno ve 4 ml 1M NaOH, doplněno demineralizovanou vodou
- roztok 0,5 mg/ml
naředěno z roztoku 10 mg/ml

skladováno při +4°C, přidáváno před klávozením

kinetin riboside

- roztok 10 mg/ml
rozpuštěno v čistém ethanolu
- roztok 0,5 mg/ml
naředěno z roztoku 10 mg/ml

sterilizováno filtrací, skladováno při -20°C, přidáváno po klávození

ABA

- roztok 10 mg/ml
24 mg rozpuštěno ve 2 ml 1M KOH, doplněno demineralizovanou vodou
- roztok 0,5 mg/ml
naředěno z roztoku 10 mg/ml

sterilizováno filtrací, skladováno při -20°C, přidáváno po klávování

GA₃

- roztok 10 mg/ml
69 mg rozpuštěno ve 4 ml 1M KOH, doplněno demineralizovanou vodou
- roztok 0,5 mg/ml
naředěno z roztoku 10 mg/ml

skladováno při +4°C, přidáváno před klávováním

Zásobní roztoky antibiotik

kanamycin

roztok 50 mg/ml

rozpuštěno v destilované vodě, sterilizováno filtrací, skladováno při +4°C, přidáváno po klávování (1 ml na litr média)

hygromycin

roztok 18 mg/ml

rozpuštěno v destilované vodě, sterilizováno filtrací, skladováno při +4°C, přidáváno po klávování (1 ml na litr média)

rifampicin

roztok 10 mg/ml

rozpuštěno v methanolu, skladováno při -20°C, přidáváno po klávování (10 ml na litr média)

claforan

roztok 100 mg/ml

rozpuštěno v destilované vodě, sterilizováno filtrací, skladováno při -20°C, přidáváno po klávování (2,5 ml na litr média)

kultivační média**1/4-2 (modifikované médium Murashige a Skoog (1962))**

objem	1l
MS-A	12,5 ml
MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
MS-D	1,25 ml
pangamin	0,45 g
casein enz. hydrolyzát	1 g
ananas	20 ml
sacharóza	15 g
aktivní uhlí	0,5 g
kinetin	2 mg
agar	7g
pH 5,8	

ČA „Czapkûv-Doxûv agar“ (dle Czapek, 1903; Dox, 1909)

objem	1l
sacharóza	30 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
NaNO ₃	3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
agar	15 g
pH 7,3	

LB

objem	1l
pepton	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
agar	17,5 g
pH neupravováno (7,0)	

FM

objem	1l
MS-A	12,5 ml
MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
MS-D	1,25 ml
casein enz. hydrolyzát	2 g
kyselina citronová	0,15 g
sacharóza	20 g
glukóza	10 g
aktivní uhlí	0,5 g
agar	7g

pH 5,8

s přidavkem fytohormonů v koncentracích 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg/l:

označení	fytohormon
FMN	NAA
FMD	2,4-D
FMK	kinetin
FMR	kinetin ribosid
FMB	BAP
FMG	GA3
FMA	ABA
FMM	kombinace (viz. kap.2.2.6.1.)
FMO	bez fytohormonů

Michl (modifikováno dle Michl, 1988)

Objem	1l
KH ₂ PO ₄	0,216 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,246 g
KCl	0,15 g
CaCl ₂	0,022 g
kyselina citronová	0,192 g
yeast extract	0,5 g
casein enz. hydrolyzát	0,5 g
glukóza	10 g
sacharóza	20 g
pyridoxin – HCl	1 mg
thiamin – HCl	1 mg
niacinamid	1 mg
kyselina listová	1 mg
agar	8 g
pH 5,8	

Mo2

objem	1l
MS-A	1 ml
MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
MS-D	1 ml
Mo	25 ml
pangamin	0,9 g
yeast extract	1,4 g
casein enz. hydrolyzát	1 g
ananas	20 ml
sacharóza	10 g
aktivní uhlí	0,5 g
kinetin	2 mg
agar	7g
pH 5,8	

SM

objem	1l
RAM3_A	20 ml
MS-B	2 ml
Fe	2 ml
MS-D	2 ml
casein enz. hydrolyzát	2 g
kyselina citronová	0,15 g
aktivní uhlí	0,5 g
agar	7g
pH 5,8	
s přidavkem sacharidů:	

označení	cukr	koncentrace
SMMA	maltose monohydrate	50 mM
SMSB	D-sorbitol	100 mM
SMG	D-glucosa	100 mM
SMMN	D-manit	100 mM
SMF	D-fructosa	100 mM
SMR	D(+) raffinose pentahydrate	33,3 mM
SMGAL	D(+) galactose	100 mM
SMS	sacharóza	50 mM
SMT	trehalóza	50 mM
SML	lactosa	50 mM
SMFG	gluóza + fruktóza	50 + 50 mM
SMSG	sacharóza + glukóza	viz.kap. 2.2.5.5.

STEMON (modifikované H1 médium - Clements et al., 1986, Rasmussen et al., 1990)

objem	1l
MS-A	5 ml
yeast extract	0,1 g
ovesná mouka	4 g
sacharóza	2 g
agar	10g
pH neupravováno (pH 6,0)	

SU2

objem	1l
MS-A	12,5 ml
MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
MS-D	1,25 ml
yeast extract	0,5 g
casein enz. hydrolyzát	2 g
sacharóza	15 g
pH 5,8	

SU3

objem	1l
MS-A	12,5 ml
MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
MS-D	1,25 ml
yeast extract	0,5 g
casein enz. hydrolyzát	2 g
sacharóza	15 g
NAA	1 mg
2,4-D	1 mg
pH 5,8	

SU4

objem	1l
MS-A	12,5 ml
MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
MS-D	1,25 ml
yeast extract	0,5 g
casein enz. hydrolyzát	2 g
sacharóza	15 g
glukóza	5 g
NAA	1 mg
2,4-D	1 mg
pH 5,8	

YEB

objem	1l
pepton	10 g
yeast extract	1 g
sacharóza	5 g
MgSO ₄	0,5 g
agar	17,5 g
pH neupravováno (7,0)	

YEB+MgSO₄

objem	1l
pepton	10 g
yeast extract	1 g
sacharóza	5 g
MgSO ₄	0,5 g
pH neupravováno (7,0)	

YEB recovery

objem	1l
pepton	10 g
yeast extract	1 g
sacharóza	68,5 g
NaCl	5,8 g
KCl	1,86 g
MgCl ₂	9,52 g
MgSO ₄	12,0 g
pH neupravováno (7,0), sterilizováno filtrací	

Příloha 3 – výsevy rostlin

kód	druh	původ	datum sběru	datum výsevu	Ca(OCl) ₂ [min]
AP1	<i>Anacampris papilionacea</i> s.s.	Albania, Bistrică	6.5.2009	12.7.2009	9
DF1	<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	ČR, Rádlo u Jablonce	2008	30.11.2008	10
DF2	<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	ČR, Rádlo u Jablonce	2008	29.5.2009	10
DI1	<i>Dactylorhiza incarnata</i>	v kultuře	6.7.2008	6.8.2008	6
DM1	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Rádlo u Jablonce	2008	18.7.2008	10
DM2	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Rádlo u Jablonce	2008	23.10.2008	7
DM3	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Rádlo u Jablonce	2008	15.4.2009	9
DM4	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Rádlo u Jablonce	2008	26.4.2009	9
DM5	<i>Dactylorhiza majalis</i>	v kultuře	5.7.2008	13.5.2009	10
DM6	<i>Dactylorhiza majalis</i>	v kultuře	21.6.2009	1.7.2009	9
DM7	<i>Dactylorhiza majalis</i>	v kultuře	21.6.2009	4.7.2009	9
DM8	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Kokořínsko	5.7.2009	8.7.2009	9
DM9	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Kokořínsko	5.7.2009	8.7.2009	9
DM10	<i>Dactylorhiza majalis</i>	ČR, Kokořínsko	5.7.2009	12.7.2009	9
DN1	<i>Dactylorhiza maculata</i> ssp. <i>maculata</i>	v kultuře	3.7.2008	6.8.2008	6
ED1	<i>Oeceoclades decaryana</i>	v kultuře	20.3.2008	29.4.2009	10
HR1	<i>Himantoglossum robertianum</i>	Ελλάδα, Μεσσωοθνι	7.5.2009	11.7.2009	9
OE1	<i>Ophrys eleonarae</i>	Italia, Puglia, Mattinata	18.5.2006	26.4.2009	10
SF1	<i>Stenoglottis fimbriata</i>	v kultuře	23.11.2008	27.2.2009	10
SF2	<i>Stenoglottis fimbriata</i>	v kultuře	15.12.2007	26.4.2009	10

6. Seznam použité literatury

- Albert V.A.: In situ, fluorochrome-mediated visualization of nuclear and cytoplasmic DNA. II. Extra-embryonal nuclei in *Cypripedium acaule* seeds: Persistent evidence of endosperm failure – *Lindleyana* 9: 115-132, 1990.
- Alexander C., Alexander I.J., Hadley G.: Phosphate Uptake by *Goodyera repens* in Relation to Mycorrhizal Infection – *New Phytologist* 97 (3): 401-411, 1984.
- Alexander C., Hadley G.: Carbon Movement between Host and Mycorrhizal Endophyte During the Development of the Orchid *Goodyera repens* Br – *New Phytologist* 101 (4): 657-665, 1985.
- Alexander C., Hadley G.: The Effect of Mycorrhizal Infection of *Goodyera repens* and its Control by Fungicide – *New Phytologist* 97 (3): 391-400, 1984.
- Alvarez M.R.: Quantitative changes in nucleus DNA accompanying postgermination embryonic development in *Vanda* (Orchidaceae) – *American Journal of Botany* 55 (9): 1036-1041, 1968.
- Arditti J., Ghani A.K.A.: Tansley Review No. 110, Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications – *New Phytologist* 145: 367-421, 2000.
- Arditti J.: Factors affecting the germination of orchid seeds – *The Botanical Review* 33 (1): 1-97, 1967.
- Baláž M.: Srovnání orchideoidní mykorrhizy s jinými typy mykorrhiz z hlediska látkových přenosů – IN: *Interorchid 2001*, Sborník referátů, ed. L.Jankovský, J.Matoušková, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 2001.
- Barker S.J., Tagu D.: The Roles of Auxins and Cytokinins in mycorrhizal Symbioses – *Journal of Plant Growth Regulation* 19 (2): 144-154, 2000.
- Barroso J., Neves H.Ch., Pais M.S.: Production of Indole-3-Ethanol and Indole-3-Acetic Acid by the Mycorrhizal Fungus of *Ophrys lutea* (Orchidaceae) – *New Phytologist* 103 (4): 745-749, 1986.
- Barroso J., Pais M.S.: Coated vesicles in the cytoplasm of the host cells in *Ophrys lutea* Cav. Mycorrhizas (Orchidaceae) – *New Phytologist* 105: 67-70, 1987.
- Barthlott W., Ziegler B.: Über ausziehbare helicale Zellwandverdickungen als Haft-Apparat der Samenschalen von *Chiloschista lunifera* (Orchidaceae) - *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 93: 391-403, 1980.
- Bateman R.M., Hollingsworth P.M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A.M., Chase M.W.: Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae) - *Botanical Journal of the Linnean Society* 142 (1): 1-40, 2003.
- Bayman P., González E.J., Fumero J.J., Tremblay R.L.: Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field – *Journal of Ecology* 90: 1002-1008, 2002.
- Beer J.G.: Beiträge zur Morphologie und Biologie der Familie der Orchideen – Carl Gerold's Sohn, Wien, 1863.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J.: Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common module for Plant Organ Formation – *Cell* 115: 591-602, 2003.
- Berliner M.D.: Hormone effects on *Cosmarium botrytis* cell division – *Cytobios* 30 (118): 89-99, 1981 – IN: Tsavkelova et al., 2006.
- Bermudes D., Benzing D.H.: Fungi in neotropical epiphyte roots – *BioSystems* 23: 65-73, 1989.

- Bernard N.: Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydées – Annales des Sciences Naturelle Paris 14 (9): 221, 1911.
- Bidartondo M.I., Bruns T.D.: Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure – Molecular Ecology 10 (9): 2285-2295, 2001.
- Bidartondo M.I., Bruns T.D.: Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups – Molecular Ecology 11 (3): 557-569, 2002.
- Bidartondo M.I., Bruns T.D.: On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development – Molecular ecology 14 (5): 1549-1560, 2005.
- Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T.D., Read D.J.: Changing Partners in the Dark: Isotopic and Molecular Evidence of Ectomycorrhizal Liaisons between Forest Orchids and Trees – Proceedings Royal Society London: Biological Sciences 271 (1550): 1799-1806, 2004.
- Birger S.: Om Tuber Salep – Arkiv för Botanik 6 (13), K. Svenska Vetenskapsakademien i Stockholm, 1907.
- Borris H., Albrecht L.: Rationelle Samenvermehrung and Anzucht europäischer Erdorchideen – Gartenwelt 69: 511-513, 1969 – IN: Rasmussen, 1995.
- Borris H., Voigt T.: Symbiotische und asymbiotische Samenkeimung von *Orchis mascula* – Ein Beitrag zum Problem der Spezifität der Orchideenpilze – Die Orchidee 37: 222-226, 1986 – IN: Rasmussen, 1995.
- Borris H.: Samenvermehrung und Anzucht europäischer Erdorchideen – IN: Proceedings of the 2nd European Orchid Congress: 74-78, Paris, 1969 – IN: Rasmussen, 1995.
- Bossi, F., Cordoba, E., Dupre, P., Mendoza, M.S., Roman, C.S., Leon, P.: The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling - Plant Journal 59 (3): 359-374, 2009.
- Bougoure J., Brundrett M., Brown A., Grierson P.F.: Habitat characteristics of the rare underground orchid *Rhizanthella gardneri* – Australian Journal of Botany 56 (6): 501-511, 2008.
- Brown A.E., Hamilton J.T.G.: Indole-3-ethanol produced by *Zygorrhynchus moelleri*, an indole-3-acetic-acid analog with antifungal activity – Mycological Research 96: 71-74, 1992.
- Burgeff H.: Die Anzucht Tropischer Orchideen aus Samen – Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1911.
- Burgeff H.: Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen – Verlag von Gustav Fischer, Jena, Germany, 1936.
- Burgeff H.: Saprophytismus und Symbiose. Studien an tropischen Orchideen – Verlag von Gustav Fischer, Jena, Germany, 1932.
- Burges A.: The Defensive Mechanism in Orchid Mycorrhiza – New Phytologist 38 (3): 273-283, 1939.
- Butcher D., Marlow S.A.: Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids – IN: Modern methods in orchid conservation: 31-38, ed. H.W.Pritchard, Cambridge University Press, 1989.
- Cameron D.D., Preiss K., Gebauer G., Read D.J.: The chlorophyll-containing orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through photosynthesis – New Phytologist 183: 358-364, 2009.

- Campanella J.J., Smith S.M., Leib D., Wexler S., Ludwig-Müller J.: The Auxin Conjugate Hydrolase Family of *Medicago truncatula* and Their Expression During the Interaction with Two Symbionts – *Journal of Plant Growth Regulation* 27 (1): 26-38, 2008.
- Carey P.D.: Modelling the spread of *Himantoglossum hircinum* (L.) Spreng. at a site in the south of England – *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 159-171, 1998.
- Carlson M.C.: Formation of the seed of *Cypripedium parviflorum* – *Botanical Gazette* 102 (2): 295-301, 1940.
- Carneros, E., Celestino, C., Klimaszevska, K., Park, Y.S., Toribio, M., Bonga, J.M.: Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis - *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 98 (2): 165-178, 2009.
- Clements M.A., Muir H., Cribb P.J.: A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids – *Kew Bulletin* 41: 437-445, 1986 – IN: Rasmussen et al., 1990.
- Clements M.A.: Reproductive biology in relation to phylogeny of the Orchidaceae especially the tribe Diurideae – Ph.D. thesis, The Australian National University, Canberra 1995 – IN: Pridgeon et al., 1999.
- Colli S., Kerbauy G.B.: Direct root tip conversion of *Catasetum* into protocorm-like bodies. Effect of auxin and cytokinin - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 39-44, 1993.
- Cox K.D., Layne D.R., Scorza R., Schnabel G.: *Gastrodia* anti-fungal protein from the orchid *Gastrodia elata* confers disease resistance to root pathogens in transgenic tobacco – *Planta* 224: 1373-1383, 2006.
- Cram, W.J.: Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cells - *Plant Physiology* 61: 396-404, 1984.
- Cribb P.J., Chase M.W.: Proposal to conserve the name *Dactylorhiza* Necker ex Nevski over *Coeloglossum* Hartm. (Orchidaceae) – *Taxon* 50 (2): 581-582, 2001.
- Czapek F.: Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen - *Beitr. Chem. Physiol. u. Pflanzl.*, 3; 47-66, 1903.
- Danneberg G., Latus C., Zimmer W., Hundeshagen B., Schneiderpoetsch H., Bothe H.: Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.) – *Journal of Plant Physiology* 141 (1): 33-39, 1993.
- Deb C.R., Temjensangba: In vitro regenerative competence of *Cleisostoma racimeferum* (Orchidaceae) aerial roots – *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 14 (2): 201-204, 2005.
- Deblaere R., Bytebier B., Degreve H., Deboeck F., Schell J., Vanmontagu M., Leemans J.: Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene-transfer to plants - *Nucleic Acids Research* 13: 4777-4788, 1985.
- Delforge P.: *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*, 3rd edition - A&C Black Publishers Ltd., London, England, 2006.
- Devey D.S., Bateman R.M., Fay M.F., Hawkins J.A.: Friends or Relatives? Phylogenetics and Species Delimitation in the Controversial European Orchid Genus *Ophrys* - *Annals of Botany* 101: 385-402, 2008.
- Dietze J., Blau A., Willmitzer L.: *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*) - IN: Potrykus I., Spangenberg G. (eds.): *Gene Transfer to Plants*. Springer-Verlag, Berlin, 24-29, 1995.

- Ditengou F.A., Raudaskoski M., Lapeyrie F.: Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globosus* ssp *bicostata* root hairs – *Planta* 218: 217-225, 2003.
- Downie D.G.: *Corticium solani* – orchid endophyte – *Nature* 179 (4551): 160, 1957.
- Dox A.W.: Intracellular enzymes of lower fungi, especially those of *Penicillium camemberti* – *Journal of Biological Chemistry* 6: 461-467, 1909.
- Dressler R.L.: Phylogeny and classification of the orchid family – Cambridge University Press, England, 1993.
- Eiberg H.: Asymbiotisk frøspiring og kulturforsøg hos nogle europæiske jordorkideer – MSc thesis, University of Copenhagen: Plant Physiological Laboratory, 1970 – IN: Rasmussen, 1995.
- Ernst R., Arditti J., Haley P.L.: The nutrition of orchid seedlings – *American Orchid Society Bulletin* 39: 559-565, 691-700, 1970.
- Ernst R., Arditti J., Healey P.L.: Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides – *American Journal of Botany* 58 (9): 827-835, 1971.
- Ernst R.: Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed – *American Orchid Society Bulletin* 36: 1068-1073, 1967.
- Ernst R.: Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae) – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 273-275, 1994.
- Fast G.: Vermehrung und Anzucht – IN: *Orchideenkultur, Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen*: 207-223, ed. G.Fast, Stuttgart, Ulmer 1982 – IN: Rasmussen, 1995.
- Fisch M.H., Brigitta H.F., Arditti J.: Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol – *Phytochemistry* 12: 437-441, 1973.
- Fitze D., Wiepning A., Kaldorf M., Ludwig-Müller J.: Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize – *Journal of Plant Physiology* 162: 1210-1219, 2005.
- Fonnesbech M.: Growth hormones and propagation of *Cymbidium* in vitro – *Physiologia Plantarum* 27: 310-316, 1972a.
- Fonnesbech M.: Organic Nutrients in the Media for Propagation of *Cymbidium* in vitro – *Physiologia Plantarum* 27: 360-364, 1972b.
- Friml J., Vieten A., SAuer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G.: Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* – *Nature* 426: 147-153, 2003.
- Fritzemeier K.H., Kindl H.: 9,10-Dihydrophenanthrenes as Phytoalexins of Orchidaceae. Biosynthetic Studies in vitro and in vivo Proving the Route from L-Phenylalanine to Dihydro-m-coumaric Acid, Dihydrostilbene and Dihydrophenanthrenes – *European Journal of Biochemistry* 133: 545-550, 1983.
- Garbay D.J., London J.F.: The Ascophyllum Polysiphonial Mycosphaerella symbiosis. 5. Fungal infection protects *A-nosodum* from desiccation – *Botanica Marina* 38 (6): 529-533, 1995.
- Garbay D.J., MacDonald K.A.: The Ascophyllum Polysiphonia Mycosphaerella symbiosis. 4. Mutualism in the Ascophyllum Mycosphaerella interaction – *Botanica Marina* 38 (3): 221-225, 1995.
- Gaumann E., Kern H.: Über chemische Abwehrreaktionen bei Orchideen – *Phytopathologische Zeitschrift* 39: 1-26, 1959.

- Gaumann E., Nüesch J., Rimpau R.H.: Weitere Untersuchungen über die chemische Abwehrreaktionen der Orchideen - *Phytopathologische Zeitschrift* 38: 274-308, 1960.
- Gay G., Gea L.: Role of fungal IAA in ectomycorrhiza formation – *Acta Botanica Gallica* 141 (4): 491-496, 1994.
- Gay G., Normand L., Marmeisse R., Sotta B.: Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity – *New Phytologist* 128: 645-657, 1994.
- Gea L., Normand L., Vian B., Gay G.: Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi – *New Phytologist* 128: 659-670, 1994.
- Gehlert R., Kindl H.: Induced formation of dihydrophenanthrenes and bibenzyl synthase upon destruction of orchid mycorrhiza – *Phytochemistry* 30: 457-460, 1991.
- Geldner N., Richter S., Vieten A., Marquardt S., Torres-Ruiz R.A., Mayer U., Jürgens G.: Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis* – *Development* 131 (2): 389-400, 2004.
- Girlanda M., Selosse M.A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., Loreto F., Cozzolino S., Perotto S.: Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae – *Molecular Ecology* 15: 491-504, 2006.
- Gow W.P., Chen J.T., Chang W.C.: Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids – *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 507-512, 2008.
- Grange O., Bärtschi H., Gay G.: Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* on in vitro rooting of micropropagated cuttings of arbuscular mycorrhiza-forming *Prunus avium* and *Prunus cerasus* – *Trees* 12: 49-56, 1997.
- Gruenschneder A.: Protocorm Proliferation von *Dactylorhiza maculata* – eine Möglichkeit zur Massenvermehrung und rationelle Anzucht – *Die Orchidee* 24: 249-250, 1973.
- Grunewald W., Cannoot B., Friml J., Gheysen J.: Parasitic Nematodes Modulate PIN-Mediated Auxin Transport to Facilitate Infection – *PloS Pathogens* 5 (1): e1000266, 2009.
- Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J., Vosátka M.: Mykorhizní symbióza, O soužití hub s kořeny rostlin – *Academia*, Praha, 2004.
- Gryndler M.: The ecological role of mycorrhizal symbiosis and the origin of the land plants – *Czech Mycology* 46: 93-98, 1992.
- Gunze C.M.B., Hennessy C.M.R.: Effect of host-applied auxin on development of endomycorrhiza in cowpeas – *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74: 247-251, 1980 – IN: Dutra et al., 1996.
- Gupta P.K., Grob J.A.: Somatic embryogenesis in conifers – IN: Jain, S., Gupta, P.K., Newton, R.J. (eds.): *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 1. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 81–98, 1995.
- Hadley G., Johnson R.P.C., John D.A.: Fine structure of the host –fungus interface in orchid mycorrhiza – *Planta* 100: 191-199, 1971.
- Hadley G., Perombelon M.: Production of Pectic Enzymes by *Rhizoctonia solani* and Orchid Endophytes – *Nature* 200: 1337, 1963.
- Hadley G., Williamson B.: Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza – *New Phytologist* 70: 445-455, 1971.

- Hadley G.: Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza – *New Phytologist* 68: 933-939, 1969.
- Hadley G.: Organization and fine structure of orchid mycorrhiza – IN: *Endomycorrhizas: 335-351*, ed. F.E.Sanders, B.Mosse, P.B.Tinker, London Academic Press, 1975.
- Hadley G.: Uptake of [¹⁴C]glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms – *New Phytologist* 96: 263-273, 1984.
- Harbeck M.: Einige Beobachtungen bei der Aussat verschiedener europäischer Erdorchideen auf sterilem Nährboden – *Die Orchidee* 14: 58-65, 1963.
- Harrison C.R., Arditti J.: Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae) – *Botanical Gazette* 139: 180-189, 1978.
- Harrison Ch.R.: Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae) – *Botanical Gazette* 138 (1): 41-45, 1977.
- Harvais G., Hadley G.: The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza – *New Phytologist* 66: 205-215, 1967.
- Harvais G., Raitsakas A.: On the physiology of a fungus symbiotic with orchids – *Canadian Journal of Botany* 53: 144-155, 1975.
- Harvais G.: An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically – *Canadian Journal of Botany* 60: 2547-2555, 1982.
- Harvais G.: Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture – *Canadian journal of Botany* 51: 327-332, 1973.
- Harvais G.: notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts – *Canadian Journal of Botany* 52: 451-460, 1974.
- Harvais G.: The development and growth requirements of *Dactylorhiza purpurella* in asymbiotic cultures – *Canadian Journal of Botany* 50: 1223-1229, 1972.
- Herrmann S., Oelmüller R., Buscot F.: Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis – *Journal of Plant Physiology* 161 (5): 509-517, 2004.
- Hong P.I., Chen J.T., Chang W.C.: Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of *maudiae* type slipper orchid – *Acta Physiologiae Plantarum* 30 (5): 755-759, 2008.
- Horáková V.M.: *Tubera salep* (Farmakologická studie) – *Časopis českého lékařnictva* 63: 301-307, 1950.
- Hu Z., Huang Q.: Induction and accumulation of the antifungal protein in *Gastrodia elata* – *Acta Botanica Yunnanica* 16: 169-177, 1994.
- Hu Z., Yang Z., Wang J.: Isolation and partial characterization of an antifungal protein from *Gastrodia elata* corm – *Acta Botanica Yunnanica* 10: 373-380, 1988.
- Huang L.C., Lin C.J., Kuo C.I., Huang B.L., Murashige T.: *Paphiopedilum* cloning in vitro – *Scientia Horticulturae* 91: 111-121, 2001.
- Huang, Y., Li, Ch.Y., Biddle, K.D., Gibson S.I.: Identification, cloning and characterization of *sis7* and *sis10* sugar-sensitive mutants of *Arabidopsis* - *BMC Plant Biology* 8:104, 24 pp, 2008.
- Hudák J., Lux A., Masarovičová E.: Plastid ultrastructure and carbon metabolism of the saprophytic species *Neottia nidus-avis* – *Photosynthetica* 33 (3-4): 587-594, 1997.
- Chang C., Chang W.C.: Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* – *Plant Cell Reports* 17: 251-255, 1998.

- Charvet-Candela V., Hitchin S., Ernst D., Sandermann H., Marmeisse R., Gay G.: Characterization of an Aux/IAA cDNA Upregulated in *Pinus pinaster* Roots in Response to Colonization by the Ectomycorrhizal Fungus *Hebeloma cylindrosporum* – *New Phytologist* 154 (3): 769-777, 2002a.
- Charvet-Candela V., Hitchin S., Reddy M.S., Cournoyer B., Marmeisse R., Gay G.: Characterization of a *Pinus pinaster* cDNA encoding an auxin up-regulated putative peroxidase in roots – *Tree Physiology* 22 (4): 231-238, 2002b.
- Chase M.W., Hills H.G.: Orchid Phylogeny, Flower Sexuality, and Fragrance-Seeking – *BioScience* 42 (1): 43-49, 1992.
- Chase M.W., Phippen J.S.: Seed Morphology in the Oncidiinae and Related Subtribes (Orchidaceae) – *Systematic Botany* 13 (3): 313-323, 1988.
- Chen J.T., Chang W.C.: Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae) – *Plant Science* 160 (2160): 87-93, 2000b.
- Chen J.T., Chang W.C.: Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium Sweet Sugar* - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 95-100, 2000a.
- Chen J.T., Chang W.C.: TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 315-320, 2004.
- Chen Y., Piluek Ch.: Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis* – *Plant Growth Regulation* 16: 99-101, 1995.
- Chen Y.C., Chang C., Chang W.C.: A Reliable Protocol for Plant Regeneration from Callus Culture of *Phalaenopsis* – *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 36 (5): 420-423, 2000.
- Chung K.R., Shilts T., Erturk U., Timmer L.W., Ueng P.P.: Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus – *FEMS Microbiology Letters* 226 (1): 23-30, 2003.
- Jambois A., Lapeyrie F.: Jasmonates, together with zeatin, induce hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* – *Symbiosis* 39 (3): 137-141, 2005.
- Jennings, D.B., Daub. M.E., Pharr, D.M., Williamson, J.D.: Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Plant Journal* 32: 41-49, 2002.
- Jentschel K., Thiel D., Rehn F., Ludwig-Müller J.: Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization – *Physiologia Plantarum* 129: 320-333, 2007.
- Jheng F., Do Y., Liauh Y., Chung J., Huang P.: Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium 'Gower Ramsey'* by adjusting carbohydrate sources – *Plant Science* 170: 1133-1140, 2006.
- Johansen D.A.: *Plant Embryology, Embryogeny of the Spermatophyta* – *Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A., 1950.*
- Karasawa K., Saito K.: A revision of the genus *Paphiopedilum* (Orchidaceae) – *Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden* 5: 1-69, 1982 – IN: Arditti et Ghani, 2000.
- Khosravi A.R., Kadir M.A., Kazemin S.B., Zaman F.Q., De Silva A.E.: Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium cv. Serdang Beauty* – *African Journal of Biotechnology* 7 (22): 4093-4099, 2008.
- Knudson L.: Further observations on nonsymbiotic germination of orchid seeds – *The Botanical Gazette* 77 (2): 212-219, 1924.

- Knudson L.: La Germinación no simbiótica de las semillas de orquídeas – Extracto del Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Tomo XXI: 250-260, Madrid, 1921.
- Knudson L.: Physiological investigations on orchid seed germination – Proceedings of the International Congresses of Plant Science 2: 1183-1189, 1929.
- Kostenyuk I., Oh B.J., So I.S.: Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak in vitro – Plant Cell Reports 19: 1-5, 1999.
- Kretzschmar H., Eccarius W., Dietrich H.: The Orchid Genera Anacamptis, Orchis, Neotinea. Phylogeny, Taxonomy, Morphology, Biology, Distribution, Ecology, Hybridisation – EchinoMedia, Bürgel, Germany, 2007.
- Kreutz C.A.J.: Kompendium der Europäischen Orchideen / Catalogue of European Orchids – Kreutz Publishers, Landgraaf, Netherlands, 2004.
- Kusano S.: *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea* – Journal of the College of Agriculture, Imperial University of Tokyo 4: 1-66, 1911.
- LaGarde R.V.: Non-symbiotic germination of orchids – Annals of the Missouri Botanical Garden 16: 499-514, 1929.
- Laurans F., Pepin R., Gay G.: Fungal auxin overproduction affects the anatomy of *Hebeloma cylindrosporum*-*Pinus pinaster* ectomycorrhizas – Tree Physiology 21 (8): 533-540, 2001.
- Leake J.R.: The Biology of Myco-Heterotrophic ('Saprophytic') Plants – New Phytologist 127 (2): 171-216, 1994.
- Leroux G., Barabe D., Vieth J.: Comparative morphogenesis of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) protocorms cultivated in-vitro with or without sugar - Canadian Journal of Botany 73 (9): 1391-1406, 1995.
- Lewis D.H., Smith D.C.: Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants I. distribution, physiology and metabolism – New Phytologist 66 (2): 143-184, 1967.
- Lin Y.H., Chang C., Chang W.C.: Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid - Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62: 21-25, 2000.
- Lindén B.: Aseptic germination of seeds of northern terrestrial orchids – Annales Botanici Fennici (17): 174-182, 1980.
- Lindén B.: Two new methods for pretreatment of seeds of Northern orchids to improve germination in axenic culture – Annales Botanici Fennici 29: 305-313, 1992.
- Link, T., Lohaus G., Heiser, I., Mendgen K., Hahn, M., Voegelé, R.T.: Characterization of a novel NADP⁺ dependent D-arabitol dehydrogenase from the plant pathogen *Uromyces fabae*. Biochemical Journal 389: 289-295, 2005.
- Liu T.A., Lin J., Wu R.: The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies – Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86: 125-129, 2006.
- Liu, M.S., Chien, C.T., Lin, T.P.: Constitutive components and induced gene expression are involved in the desiccation tolerance of *Selaginella tamariscina* - Plant and Cell Physiology 49 (4): 653-663, 2008.
- Magrou J.: A propos du pouvoir fungicide des tubercules d'Ophrydées – Annales des Sciences Naturelle Paris 6: 265, 1924.
- Malmgren S.: Asymbiotic fröförökning i stor skala av *Anacamptis*, *Ophrys*, *Orchis* och andra orkideer med runda rotknölar - Svensk Botanic Tidskrift 87: 221-234, 1993 - IN: Rasmussen, 1995
- Manning J.C., Van Staden J.: The Development and Mobilisation of Seed Reserves in Some African Orchids – Australian Journal of Botany 35 (3): 343-353, 1987.

- Marchisio V.F., Berta G., Fontana A., Mannina F.M.: Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization – *New Phytologist* 100: 623-641, 1985.
- McCormac A.C., Elliott M.C., Chen D.F.: A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation - *Molecular Biotechnology* 9: 155–159, 1998.
- McKendrick S.L., Leake J.R., Read D.J.: Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections – *New Phytologist* 145: 539-548, 2000 b.
- McKendrick S.L., Leake J.R., Taylor D.L., Read D.J.: Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi – *New Phytologist* 145: 523-537, 2000 a.
- Mei-Sheng T., Fu-Xiong W., Nan-Fen Q., An-Ci S.: In vitro seed germination and developmental morphology of seedling in *Cymbidium ensifolium* – *Acta Botanica Sinica* 27: 455-459, 1985.
- Meixner C., Ludwig-Müller J., Miersch O., Gresshoff P., Staehelin Ch., Vierheilig H.: Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007 – *Planta* 222: 709-715, 2005.
- Midgley D.J., Jordan L.A., Saleeba J.A., McGee P.A.: Utilisation of carbon substrates by orchid and ericoid mycorrhizal fungi from Australian dry sclerophyll forests – *Mycorrhiza* 16: 175-182, 2006.
- Michl J.: Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny II. – *Živa* 3: 89-91, 1988.
- Miyoshi K., Mii M.: Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture - *Scientia Horticulturae* 35: 127-130, 1988.
- Molvray M., Kores P.J.: Character analysis of the seed coat in *Spiranthoideae* and *Orchidoideae*, with special reference to the *Diurideae* (*Orchidaceae*) – *American Journal of Botany* 82 (11): 1443-1454, 1995.
- Montfort V.C., Küsters G.: Saprophytismus und Photosynthese I. Biochemische und physiologische Studien an Humus-Orchideen – *Botanisches Archiv* 40: 571-633, 1940.
- Moore, J.P., Hearshaw, M., Ravenscroft, N., Lindsey, G.G., Farrant, J.M., Brandt, W.F.: Desiccation-induced ultrastructural and biochemical changes in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* - *Australian Journal of Botany* 55 (4): 482-491, 2007.
- Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobago tissue cultures – *Physiologia Plantarum* 15: 473-497, 1962.
- Murren C.J., Ellison A.M.: Seed dispersal characteristics of *Brassavola nodosa* (*Orchidaceae*) – *American Journal of Botany* 85 (5): 675-680, 1998.
- Nagel A.K., Schnabel G., Petri C., Scorza R.: Generation and characterization of transgenic plum lines expressing the *Gastrodia* antifungal protein – *Hortscience* 43 (5): 1514-1521, 2008.
- Nagl W.: Evidence of DNA amplification in the orchid *Cymbidium* in vitro – *Cytobios* 5: 145-154, 1972.
- Nakamura S.I., Hamada M.: On the seed dispersal of an achlorophyllous orchid, *Galeola septentrionalis* – *The Journal of Japanese Botany* 53: 260-263, 1978.

- Nakamura S.I.: Einige Experimente zur Samenkeimung einer chlorophyllfreien Erdorchidee *Galeola septentrionalis* Reichb.f. – *Memoirs of the College of Agriculture, Kyoto, University Botany* 4, 86: 1-48, 1964 – IN: Rasmussen, 1995.
- Nakamura S.J.: Nutritional conditions required for the non-symbiotic culture of an achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis* – *New Phytologist* 90: 701-715, 1982.
- Nayak N.R., Rath S.P., Patnaik S.: In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. And *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation – *Scientia Horticulturae* 71: 243-250, 1997.
- Niemi K., Vuorinen T., Ernstsén A., Haggman H.: Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro – *Tree Physiology* 22 (17): 1231-1239, 2002.
- Niewdorp J.: Some observations with light and electron microscope on the endotropic mycorrhiza orchids – *Acta Botanica Neerlandica* 21: 128-144, 1972.
- Nocarova E., Fischer L.: Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression – *BMC Plant Biology* 9: 44, 2009.
- Nowak J., Sonaike B., Lawson G.W.: Auxin-induced stress tolerance in algae – *Environmental Pollution* 51 (3): 213-218, 1988.
- Ogura-Tsujita Y., Gebauer G., Hashimoto T., Umata H., Yukawa T.: Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena* – *Proceedings of the Royal Society B* 276: 761-767, 2009.
- Ogura-Tsujita Y., Yukawa T.: *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan – *Mycorrhiza* 18: 331-338, 2008.
- Paek K.Y., Yeung E.C.: The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N⁶-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes in vitro - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24: 65-71, 1991.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Zhang, Y.H.: Trehalose metabolism and signaling - *Annual Review of Plant Biology* 59: 417-441, 2008.
- Pedersen H. Æ., Faurholdt N.: *Ophrys, the Bee Orchids of Europe* - Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, England, 2007.
- Pereira O.L., Rollemberg Ch.L., Borges A.C., Matsuoka K., Kasuya M.C.: *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil – *Mycoscience* 44: 153-155, 2003.
- Peres L.E.P., Amar S., Kerbauy G.B., Salatino A., Zaffari G.R., Mercier H.: Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds – *Journal of Plant Physiology* 155 (4-5): 551-555, 1999.
- Peterson R.L., Bonfante P., Faccio A., Uetake Y.: The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells – *Canadian Journal of Botany* 74: 1861-1870, 1996.
- Peterson R.L., Farquhar M.L.: *Mycorrhizas: Integrated Development between Roots and Fungi* – *Mycologia* 86 (3): 311-326, 1994.
- Peterson R.L., Uetake Y., Zelmer C.: Fungal symbioses with orchid protocorms – *Symbiosis* 25: 29-55, 1998.

- Pillon Y., Fay M.F., Hedrén M., Bateman, R.M., Devey D.S., Shipunov A.B., van der Bank M., Chase M.W.: Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae) - *Taxon* 56 (4): 1185–1208, 2007.
- Ponert J.: *Bletilla Reichenbach* f. – *Orchidea* 17 (1): 26-30, 2006.
- Ponert J.: *Dactylorhiza* v kultuře (*Dactylorhiza Necker ex Nevski* (1937) – prstnatec) – *Orchidea* 19 (1): 13-17, 2008.
- Sekerka P., Obdržálek J., Ponert J.: *Orchideje na zahradě* – Grada Publishing, Praha, 2006.
- Ponert J.: *Himantoglossum Spreng.* 1826 (jazýček) – *Orchidea* 18 (1): 2-8, 2007.
- Ponert J.: Terestrické orchideje – *Orchidea* 16 (1): 13-17, 2005.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase, M.W., Rasmussen F.: *Genera Orchidacearum: Volume 1: General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae* - Oxford University Press, New York, United States, 1999.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase, M.W., Rasmussen F.: *Genera Orchidacearum: Volume 2: Orchidoideae (Part 1)* - Oxford University Press, New York, United States, 2001.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase, M.W., Rasmussen F.: *Genera Orchidacearum: Volume 3: Orchidoideae (Part 2), Vanilloideae* - Oxford University Press, New York, United States, 2003.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase, M.W., Rasmussen F.: *Genera Orchidacearum: Volume 4: Epidendroideae (Part 1)* - Oxford University Press, New York, United States, 2005.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase, M.W., Rasmussen F.: *Genera Orchidacearum: Volume 5: Epidendroideae (Part 2)* - Oxford University Press, in prep.
- Procházka F., Velisek V.: *Orchideje naší přírody* – Academia, Praha, 1983.
- Prusty R., Grisafi P., Fink G.R.: The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (12): 4153-4157, 2004.
- Prutsch J., Schardt A., Schill R.: Adaptations of an orchid seed to water uptake and – storage - *Plant Systematics and Evolution* 220: 69-75, 2000.
- Purves S., Hadley G.: The physiology of symbiosis in *Goodyera repens* – *New Phytologist* 77 (3): 689-696, 1976.
- Quednow K.G.: Beiträge zur Frage der Aufnahme gelöster Kohlenstoffverbindungen durch Orchideen und andere Pflanzen – *Bot. Arch.* 30: 51-108, 1930 – IN: Ernst et al., 1971.
- Raghavan V., Goh C.J.: DNA synthesis and mRNA accumulation during germination of embryos of the orchid *Spathoglottis plicata* – *Protoplasma* 183: 137-147, 1994.
- Ramsbottom J.: *Orchid mycorrhiza* – *Proceedings of the International Congress Plant Science* 2: 1676-1687, 1929 – IN: Rasmussen, 1995.
- Rasmussen H.N., Andersen T.F., Johanin B.: Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus – *Plant, Cell and Environment* 13 (2): 171-177, 1990.
- Rasmussen H.N., Rasmussen F.N.: *Orchid mycorrhiza: implications of a mycophygous life style* – *Oikos* 118: 334-345, 2009.
- Rasmussen H.N., Whigham D.F.: Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy – *New Phytologist* 154: 797-807, 2002.

- Rasmussen H.N., Whigham D.F.: Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids – *American Journal of Botany* 80 (12): 1374-1378, 1993.
- Rasmussen H.N.: Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb.f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro – *New Phytologist* 116: 137-147, 1990.
- Rasmussen H.N.: Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of mycorrhiza – *Physiologia Plantarum* 86: 161-167, 1992.
- Rasmussen H.N.: *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant* – Cambridge University Press, Great Britain, 1995.
- Reddy S.M., Hitchin S., Melayah D., Pandey A.K., Raffier C., Henderson J., Marmeisse R., Gay G.: The auxin-inducible GH3 homologue Pp-GH3.16 is downregulated in *Pinus pinaster* root systems on ectomycorrhizal symbiosis establishment – *New Phytologist* 170: 391-400, 2006.
- Reinecke T., Kindl H.: Characterization of bibenzyl synthase catalysing the biosynthesis of phytoalexins of orchids – *Phytochemistry* 35 (1): 63-66, 1994.
- Richardson K.A., Peterson R.L., Currah R.S.: Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae) – *Canadian Journal of Botany* 70: 291-300, 1992.
- Roy J., Naha S., Majumdar M., Banerjee N.: Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae) – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90:31-39, 2007.
- Rücker W.: Einfluss von Cytokininen auf Wachstum und Differenzierung in vitro kultivierter Protokorme von *Cymbidium* – *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 72: 338-351, 1974.
- Rupp L.A., Mudge K.W.: Ethephon and auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ cultures of Mugo pine – *Physiologia Plantarum* 64: 316-322, 1985.
- Rypáček V., Sladký Z.: Character of endogenous growth regulators in course of development in fungus *Lentinus tigrinus* – *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 46 (1): 65, 1972 – IN: Sladký et Tichý, 1974.
- Rypáček V., Sladký Z.: Relation Between the Level of Endogenous Growth Regulators and the Differentiation of the Fungus *Lentinus tigrinus* Studied in a Synthetic Medium – *Biologia Plantarum* 15 (1): 20-26 1973.
- Sa Q., Wang Y., Li W., Zhang I., Sun Y.: The promoter of an antifungal protein gene from *Gastrodia elata* confers tissue-specific and fungus inducible expression patterns and responds to both salicylic acid and jasmonic acid – *Plant Cell Reports* 22: 79-84, 2003.
- Salzer P., Hager A.: Effect of auxins and ectomycorrhizal elicitors on wall-bound proteins and enzymes of spruce (*Picea-abies* (L) Karst) cells – *Trees – Structure and Function* 8 (1): 49-55, 1993.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Second Edition - Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Sekerka P., Obdržálek J., Ponert J.: *Plejonky a další chladnomilné orchideje* – Grada Publishing, Praha, 2007.
- Selosse M.A. Le Tacon F.: The land flora: a phototroph-fungus partnership? - *Trends in Ecology & Evolution* 13 (1): 15-20, 1998.

- Selosse M.A., Weiss M., Jany J.L., Tillier A.: Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* and neighboring tree ectomycorrhizae – *Molecular Ecology* 11: 1831-1844, 2002.
- Sezik E.: Destroying of *Ophrys* species using to obtain salep in Turkey – abstract, European Orchid Conference, *Ophrys 2005*, Chios, Greece, <http://www.chios.gr/ophrys2005/conf-papers.htm>, 2005
- Shimada A., Takeuchi S., Nakajima A., Tanaka S., Kawano T., Kimura Y.: Phytotoxicity of indole-3-acetic acid produced by the fungus, *Pythium aphanidermatum* – *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64 (1): 187-189, 2000.
- Shun-xing G., Jin-tang X.: 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, 1990.
- Sim G.E., Goh C.J., Loh C.S.: Induction of in vitro flowering in *Dendrobium Madame Thong-In* (Orchidaceae) seedlings is associated with increase in endogenous N⁶-(Δ 2-isopentenyl)-adenine (iP) and N⁶-(Δ 2-isopentenyl)-adenosine (iPA) levels – *Plant Cell Reports* 27: 1281-289, 2008.
- Simon L., Bousquet J., Lévesque R.C., Lalonde M.: Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants – *Nature* 363 (6424): 67-69, 1993.
- Sladký Z., Tichý V.: Stimulation of the Formation of Fruiting Bodies of the Fungus *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. by Growth Regulators – *Biologia Plantarum* 16 (6): 436-443, 1974.
- Smith D., Muscatine L., Lewis D.H.: Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis – *Biological Reviews* 44: 17, 1969 – IN: Smith et Smith, 1973.
- Smith D., Muscatine L., Lewis D.H.: Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis – *Biological Reviews* 44 (1): 17-85, 1969.
- Smith S.E., Smith F.A.: Uptake of glucose, trehalose and mannitol by leaf slices of the orchid *Bletilla hyacinthina* – *New Phytologist* 72 (5): 957-964, 1973.
- Smith S.E.: Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin – *New Phytologist* 72 (3): 497-499, 1973.
- Smith S.E.: Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas – *New Phytologist* 66 (3): 371-378, 1967.
- Smith S.E.: Physiology and ecology of orchid macorrhizal fungi with reference to seedling nutrition – *New Phytologist* 65 (4): 488-499, 1966.
- Steele W.K.: Large Scale Seedling Production of North American *Cypripedium* Species – IN: North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production: 11-26, Conference Proceedings, ed. C. Allen, The North American Native Terrestrial Orchid Conference, 1996.
- Strauss M.S., Reisinger D.M.: Effects of naphthaleneacetic acid on seed germination – *American Orchid Society Bulletin* 45: 722-723, 1976.
- Studnička M.: Život orchidejí, sbírkou exotů s botanikem – Santal, Liberec, 1997.
- Sudmoon R., Sattayasai N., Bunyatratkata W., Chaveerach A., Nuchadomrong S.: Thermostable mannose-binding lectin from *Dendrobium findleyanum* with activities dependent on sulfhydryl content – *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 40 (9): 811-818, 2008.
- Suzuki R.M., Kerbauy G.B., Zaffari G.R.: Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum* – *Journal of Plant Physiology* 161: 929-935, 2004.

- Swamy B.G.L.: Embryological Studies in the Orchidaceae. II. Embryogeny – American Midland Naturalist 41 (1): 202-232, 1949.
- Swamy B.G.L.: Embryology of Orchidaceae – Current Science 12: 13-17, 1943.
- Swamy B.G.L.: On the Life –History of *Vanilla planifolia* – Botanical Gazette 108 (3): 449-456, 1947.
- Szlachetko D.L.: Systema Orchidaliium – Fragmenta Floristica et Geobotanica, Supplementum 3 - W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland, 1995.
- Tagu D., Palin B., Balestrini R., Gelhaye E., Lapeyrie F., Jacquot J.P., Sautière P.E., Bonfante P., Martin F. : Characterization of a symbiosis- and auxin-regulated glutathione-S-transferase from *Eucalyptus globosus* roots – Plant Physiology and Biochemistry 41: 611-618, 2003.
- Taylor D.L., Bruns T.D.: Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (9): 4510-4515, 1997.
- Taylor D.L., Bruns T.D.: Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana* – Molecular Ecology 8: 1719-1732, 1999.
- Tranvan H., Habricot Y., Jeannette E., Gay G., Sotta B.: Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster* – Tree Physiology 20 (2): 123-129, 2000.
- Traub M.: Notes sur l'embryogénie de quelques Orchidées – Verhandelingen der Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen, Afdeling Natuurkunde 19: 1-50, 1879 – IN: Pridgeon et al., 1999.
- Trojanová L.: Fungicidy jako prostředek k získání orchidejí s potlačenou mykorhizou – diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, 2008.
- Tsavkelova E.A., Bömke Ch., Netrusov A.I., Weiner J., Tudzynski B.: Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain – Fungal Genetics and Biology 45: 1393-1403, 2008.
- Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I.: Phytohormones production by fungi associated with orchids – Микология и Фитопатология (Mikologiya i Fitopatologiya) 37 (5): 75-83, 2003.
- Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I.: Microbial producers of plant growth Stimulators and their practical use: A review – Applied Biochemistry and Microbiology 42 (2): 117-126, 2006.
- Ueda H., Torikata H.: Organogenesis in the meristem cultures of cymbidiums III. Histological studies on the shoot formation at the rhizome-tips of cymbidium *goeringii* Reichb.f. cultured in vitro –園芸學會雜誌 (Journal of the Japanese Society for Horticultural Science) 38 (3): 262-266, 1969b.
- Ueda H., Torikata H.: Organogenesis in the meristem cultures of cymbidiums V. Anatomical and histochemical studies on phagocytosis in the mycorrhizome of *Cymbidium goeringii* Reichb.f. (*C. virescens* Lindl.) –園芸學會雜誌 (Journal of the Japanese Society for Horticultural Science) 39 (3): 256-260, 1970.
- Ueda H., Torikata H.: Organogenesis in the meristem tissue cultures of Cymbidiums. II Effects of growth substances on the organogenesis in dark culture –園芸學會雜誌 (Journal of the Japanese Society for Horticultural Science) 38 (2): 188-193, 1969a.

- Van Damme E.J.M., Balzarini J., Smeets K., Van Leuven F., Peumans W.J.: The monomeric and dimeric mannosebinding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities - *Glycoconjugate Journal* 11: 321-332, 1994.
- Van der Kinderen G.: Abscisic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination – *Lindleyana* 2: 84-87, 1987.
- Van Waes J.: In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideën – thesis, Rijksuniversiteit Gent, 1984 – IN: Rasmussen, 1995.
- Van Waes J.M., Debergh P.C.: In vitro germination of some Western European orchids – *Physiologia Plantarum* 67: 253-261, 1986.
- Vejsadová H.: Factors Affecting Seed Germination and Seedling Growth of Terrestrial Orchids Cultured In Vitro – *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48 (1): 109-113, 2006.
- Veyret Y.: Development of the Embryo and the Young Seedling Stages of Orchids – IN: *The Orchids: Scientific Studies*: 223-265, ed. C.L. Withner, John Wiley & Sons, New York, 1974
- Vinklarkova K., Sladky Z.: Exogenous regulators in mycelium of *Pleurotus ostreatus* after exogenous application – *Folia Microbiologica* 23 (1): 55-59, 1978.
- Wahrlich W.: Beiträge zur Kenntnis der Orchideen Wurzelpilze – *Botanische Zeitung* 44: 480-488, 1886 – IN: Gryndler et al., 2004.
- Wang H., Wang Z., Zhang F., Liu J., He X.: A cytological study on the nutrient-uptake mechanism of a saprophytic orchid *Gastrodia elata* – *Acta Botanica Sinica* 39: 500-958, 1997.
- Wang X., Bauw G., Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Chen Z., Van Montagu M., Angenon G., Dillen W.: Gastrodin-like mannose-binding proteins: a novel class of plant proteins with antifungal properties – *The Plant Journal* 25 (6): 651-661, 2001.
- Warcup J.H.: Mycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera* – *New Phytologist* 110: 227-231, 1988.
- Warcup J.H.: *Rhizanthella gardneri* (Orchidaceae), its *Rhizoctonia* endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* (Myrtaceae) in Western Australia – *New Phytologist* 99: 273-280, 1985.
- Watkinson J.I., Welbaum G.E.: Characterization of gene expression in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* incubated with a mycorrhizal fungus – *Elegant Science in Floriculture*, 26th International Horticultural Congress, *Acta Horticulturae* 624: 463-470, 2003
- Wilkinson K.G., Dixon W., Sivasithamparan K., Ghisalberti E.L.: Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria – *Plant and Soil* 159 (2): 291-295, 1994.
- Williamson B., Hadley G.: DNA content of nuclei in orchid protocorms symbiotically infected with *Rhizoctonia* – *Nature* 222: 582-583, 1969.
- Williamson B., Hadley G.: Penetration and infection of orchid protocorms by *Tanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates – *Phytopathology* 60: 1092-1096, 1970.
- Wodrich K.H.K.: *Growing South African Indigenous Orchids* – A.A. Balkema, 1997.
- Wotavová-Novotná K., Vejsadová H., Kindlmann P.: Effect of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species – *Biologia Plantarum* 51 (1): 198-200, 2007.

- Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D.Y.: Flora of China. Vol. 25 (Burmanniaceae through Orchidaceae). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis - In Preparation:
http://hua.huh.harvard.edu/china/mss/volume25/Orchidaceae_finalizing.htm, 2009.
- Wynd F.L.: Sources of carbohydrate for germination and growth of orchid seeds – *Annals of the Missouri Botanical Garden* 20: 569-581, 1933.
- Xing, Y., Jia, W.S., Zhang, J.H.: AtMKK1 and AtMPK6 are involved in abscisic acid and sugar signaling in *Arabidopsis* seed germination - *Plant Molecular Biology* 70 (6): 725-736, 2009.
- Xu Q., Liu Y., Wang X., Gu H., Chen Z.: Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata* – *Plant Physiology and Biochemistry* 36 (12): 899-905, 1998.
- Yang S.H., Yu H., Goh C.J.: Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene DSCXX1 in *Dendrobium* orchid – *Plant Molecular Biology* 51: 237-248, 2003.
- Yeung E.C., Law S.K.: Embryology of *Calypso bulbosa*. II. Embryo development – *Canadian Journal of Botany* 70 (3): 461-468, 1992.
- Yoder J.A., Zettler L.W., Stewart S.L.: Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycoheterotrophy – *Plant Science* 156: 145-150, 2000.
- Yurekli F., Geckil H., Topcuoglu F.: The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinus sajor-caju* under different culture conditions – *Mycological Research* 107: 305-309, 2003.
- Zaretsky M., Kagan-Zur V., Mills D., Roth-Bejerano N.: Analysis of mycorrhizal associations formed by *Cistus incanus* transformed root clones with *Terfezia boudieri* isolates – *Plant Cell Reports* 25 (1): 62-70, 2006.
- Zelmer C.D., Currah R.S.: Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae) – *Canadian Journal of Botany* 73: 862-866, 1995.
- Zhang N.G., Yong J.W.H., Hew C.S., Zhou X.: The production of cytokinin, abscisic acid and auxin by CAM orchid aerial roots – *Journal of Plant Physiology* 147 (3-4): 371-377, 1995.
- Ziegler H.: Mikromorphologie der Orchideensämen unter Berücksichtigung taxonomischer Aspekte – Ph.D. thesis, Ruprecht Karls Universität, Heidelberg – IN: Pridgeon et al., 1999.
- Zimmer K., Meyer C., Gebauer G.: The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco-heterotroph – *New Phytologist* 178: 395-400, 2008.