

Středoškolská odborná činnost

04. Biologie

**Asymbiotický výsev
středoevropských
orchidejí**

Stanislav Vosolsobě

4. ročník

**Gymnázium, U Balvanu 16, Jablonec nad Nisou
Liberecký kraj**

2004 / 2005

Téma jsem zpracoval samostatně dle uvedené literatury, terénních poznatků a výsledků vlastních pokusů.

21.6.2005, Na Vršku 4, Jablonec nad Nisou

Abstrakt

Práce se zabývá generativním množením středoevropských druhů orchidejí prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó), prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerhayes), pětiprstky žežulníku (*Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.) a vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb.) asymbiotickými výsevy *in vitro* prováděnými s jednoduchým vybavením. Náplní pokusů bylo prověřit realizovatelnost asymbiotických výsevů a porovnat klíčivost uvedených druhů. U prstnatce Fuchsova došlo k úspěšnému klíčení, proto byl dále sledován růst semenáčků a zjišťován vliv obsahu agaru a sacharosy v živném médiu na růst a hnědnutí rostlin. Experiment byl ukončen přenosem semenáčků *ex vitro*. Jako substrát byla použita minerální plst' Rockwool bez přítomnosti dospělých rostlin, které se jinak často používají k infikování sterilních semenáčků mykorhizní houbou. Souběžně byl prováděn pokus o kultivaci symbiotické houby z kořenů prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*), který vedl k získání čisté kultury tří druhů hub *in vitro*.

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Literární přehled	10
2.1	Biologický úvod	10
2.1.1	Mykorhizní symbióza	10
2.1.2	Klíčení a následná ontogeneze orchidejí	11
2.2	Kultivace orchidejí	12
2.2.1	Historie.....	12
2.2.2	Metody asymbiotického výsevu	13
3	Materiál a metody	17
3.1	Úvod.....	17
3.2	Technické zařízení pro provedení výsevů.....	17
3.2.1	Desinfekce semen	17
3.2.2	Příprava živné půdy a kultivační nádoby.....	18
3.2.3	Výsev semen	18
3.3	První pokus o kultivaci prstnatce Fuchsova.....	19
3.3.1	Výsev	19
3.3.2	Kultivace <i>in vitro</i>	20
3.3.3	Přenos semenáčků <i>ex vitro</i>	21
3.4	Srovnávací výsev prstnatců Fuchsova a májového, pětiprstky a vemeníku	21
3.4.1	Výsevy semen	22
3.4.2	Klíčení <i>in vitro</i>	23
3.5	Růst semenáčků prstnatce Fuchsova na různých živných půdách.....	24
3.5.1	Živná média	24
3.5.2	Kultivace semenáčků	25
3.6	Vliv desinfekce semen a obsahu sacharosu na klíčení prstnatce májového.....	25
3.6.1	Výsev semen	26
3.6.2	Kultivace výsevů.....	27
3.7	Kultivace symbiotických hub.....	27
3.7.1	Založení kultury	27
3.7.2	Kultivace hub	28
4	Pozorování a výsledky	29
4.1	První výsev prstnatce Fuchsova	29
4.1.1	Průběh klíčení do přesazení	29
4.1.2	Vývoj po přesazení	29
4.1.3	Hnědnutí semenáčků.....	30
4.1.4	Přenos semenáčků <i>ex vitro</i>	31
4.2	Srovnávací výsevy orchidejí	31
4.2.1	Výsev prstnatce májového, vemeníku a pětiprstky	31
4.2.2	Výsev prstnatce Fuchsova.....	31
4.3	Růst semenáčků prstnatce Fuchsova	32

4.3.1	Průběh růstu	32
4.4	Vliv desinfekce na klíčení prstnatce májového.....	33
4.4.1	Klíčení prstnatce májového.....	33
4.5	Kultivace symbiotických hub.....	33
4.5.1	Růst hub	34
4.5.2	Struktura hub.....	34
5	Diskuse.....	35
6	Právní ošetření pokusu.....	39
7	Literatura.....	40
8	Přílohy.....	41

1 Úvod

Orchideje tvoří pozoruhodnou rostlinnou čeleď, s více než 30000 druhy, které se vyznačují mnoha zvláštnostmi a specialitami oproti ostatním rostlinám.

Obrovské množství druhů je důkazem malého stáří čeledi, která se nachází ve stádiu velkého evolučního rozvoje. Rozdíly mezi taxony nebývají velké a proto se často vzájemně kříží za vzniku hybridních populací. Na lokalitách s příbuznými druhy tak vzniká škála intermediárních jedinců se znaky obou původních druhů, a občas mohou být původní druhy zcela „pohlčeny“ hybridními. Z takovýchto obtížně taxonomicky zařaditelných populací nakonec mohou vznikat i nové druhy a není to jen záležitostí tropů. Značná variabilita a odštěpování nových taxonů je typické i pro naše orchideje, kterých je celkem asi 60 druhů. Například roku 1989 byl z blat u Jestřebí u Máchova jezera popsán prstnatec český (*Dactylorhiza bohemica*) (BUSINSKÝ, 1989), který je naším endemitem vzniklým pravděpodobně opakovaným křížením prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), plamatého (*D. maculata*) a pleťového (*D. incarnata*), které mají lokality v blízkém okolí. Nově vzniklé druhy mívají malý areál rozšíření a úzké ekologické vyhranění. Silná ekologická specializace je obecným znakem všech druhů čeledi. Po údobí jejich populačního rozmachu může následovat stejně rychlé vymírání zapříčiněné drobnou změnou podmínek.

Životní strategie orchidejí obecně spočívá v rychlém osídlování stanovišť s malou konkurencí ostatních druhů (velká část našich vstavačovitých vyhledává například luční stanoviště, která se však v kdysi převážně lesnaté krajině bez vlivu člověka vyskytovala jen vzácně a krátkodobě po požárech a podobně). K úspěchu v této strategii však musí být rostliny dobře vybaveny. U orchidejí je pozoruhodné přizpůsobení k využívání celé řady činitelů v životním prostředí ke svému prospěchu.

Vhodných stanovišť je omezený počet, u orchidejí se však vyvinula tvorba obrovského množství mikroskopických semen, která takřka zaplavují celý svět jsou dokonale uzpůsobena k rozšiřování větrem zredukováním své hmotnosti až na minimum, neboť obsahují pouze zárodek bez jakýchkoli zásobních látek. Semena by však nemohla samostatně vyklíčit, nebýt dalšího přizpůsobení. Orchideje vkládají úspěch rozmnožování do silného mykorrhizního vztahu s půdními houbami, ze kterých klíčící zárodek čerpá potřebné organické látky.

U některých druhů dosahuje mykorrhiza takové úrovně, že i u dospělých rostlin hraje autotrofní výživa jen podřadnou roli a mnohdy jsou zcela heterotrofní (korálice trojklaná (*Corallorhiza trifida*), hlístník hnízdák (*Neottia nidus-avis*)). Takto jsou přizpůsobeni k růstu na stinných, avšak úživných lesních stanovištích kde se nemusí

potýkat s konkurencí. Jindy orchidejím mykorrhiza usnadňuje pronikání na místa s neúrodnou kamenitou půdou, jako jsou například podmáčené bývalé lomy (vstavače, hlízovec Loeselův (*Liparis loeselii*)) nebo okraje cest (kruštík širolistý (*Epipactis helleborine*)), či naopak na kyselé horské a podhorské rašelinné louky a lesní prameniště (prstnatec).



Obr. 1: Prstnatec Fuchsův

Další velmi silnou ekologickou vazbu můžeme pozorovat mezi vstavačovitými rostlinami a hmyzími opylovači. K opylení velkého počtu semen je nutný účinný způsob přenosu pylu. U orchidejí je pyl přenášen ve velkém množství slepený v brylky, které se opylujícímu hmyzu přichytí na sosák či hlavu a při návštěvě dalšího květu se brylky uchytí na blizně. K přilákání opylovače, který má v životě vstavačovitých podstatnou roli, neboť jen ve 2 % případů dochází k samoopylení, jsou rostliny specializovány velice pozoruhodnými způsoby. Tradiční je lákání vůní, barvou a nektarem, vyvinuly se však i druhy, které tvorbu nektaru pouze předstírají, hmyz tedy nemá z návštěvy žádný zisk a často mu může být i osudná, jako například motýlům, kteří nemohou sosák s utkvělými brylkami svinout do původní polohy. Nejpozoruhodnější způsob opylování se vyseletoval u tořičů (*Ophrys* sp.). Jejich květy dokonale předstírají tvarem,

povrchem, barvou i vůní samičky určitých druhů hmyzu. Opylení pak zprostředkovávají samečci, pokoušející se s květy pářit.

Nakonec nesmíme opomenout ani významem dnes zcela rozhodující vztah orchidejí a člověka. V historii prošel několika vývojovými etapami. Významně se počíná projevovat ve starověku s rozvojem zemědělství. Rozšiřují se plochy bezlesí, což především v lesních oblastech mírného pásu razantně mění tvář krajiny. Plochy obhospodařované extenzivní pastvou a primitivní orbou se stávají vhodným stanovištěm lučních orchidejí, neboť je zde omezená konkurence ostatních rostlinných druhů. Mnoho druhů s těžištěm výskytu v mediteránní oblasti (například vstavače a tořiče) se proto rozšiřuje na sever a heliofilní vysokohorské druhy sestupují do nižších poloh.

Úbytek lesních druhů způsobený odlesňováním krajiny se projevuje pomaleji, významněji až ve středověku. K radikální změně poměrů však dochází v novověku, nejzřetelněji v uplynulém století. Probíhá intenzifikace zemědělství na polích, v pastvě i lesích a orchideje začínají mizet jak ze stanovišť vytvořených lidskou rukou, tak z přirozených. Luční stanoviště byla rozorána a meliorována, citlivé mykorhizní houby nesnesly používání umělých hnojiv a chemické ošetřování plodin a na přehnojených okrajích polí se současně rozmohla konkurence nitrofilní vegetace. Používáním insekticidů hyne hmyz, na kterém jsou orchideje úzce závislé (viz např. tořiče). Silně specializované druhy mizí nejrychleji. Lesní orchideje poškodilo přetváření lesů v monokultury a obhospodařování těžkou mechanizací a nakonec u dekorativních druhů, jako například střevíčník pantoflíček (*Cypripedium calceolus*), se přidalo i trhání a vyrývání.

Člověk tedy působí na evoluci orchidejí silným tlakem. Mnoho druhů jen těžko odolává a podléhá selekci, jsou však druhy, které i dnes úspěšně využívají nová prostředí. Jsou to zejména ruderalní stanoviště naspů a opuštěných lomů. Zde je nejúspěšnější kruštík širolistý (*Epipactis helleborine*). Ze všech nalezišť, kde jsem tento druh objevil, připadá více než polovina na okraje lesních cest i silnic, kde má minimální konkurenci. Přímo na okraji asfaltu málo frekventované silnice mezi Kořenovem a Jizerkou v Jizerských horách jsem (kromě několika kruštíků) dokonce našel i jeden prstnatec Fuchsův (*Dactylorhiza fuchsii*), který se na uvedené místo dostal zřejmě z několik set metrů vzdálené početné lokality u samoty Václavíkova Studánka. Ruderalní stanoviště nevádí ani korálici trojklanné (*Corallorhiza trifida*), s jejíž lokalitou jsem se setkal v květnu 2003 v Obřím dole v Krkonoších. Asi dvacet jedinců zde rostlo v rozdrobeném okraji silničky, v místech, kde cesta překonává morénu.

Kromě osídlování člověkem vytvořených biotopů, mohou však orchideje profitovat i z aktivního působení člověka na zástupce této čeledi. Příčinou tohoto působení je zájem člověka využít některé vlastnosti orchidejí, původně vzniklé evolucí ke zcela odlišnému účelu. Už dávno se lidem zalíbily překrásné květy tropických druhů, produkt vztahu orchidejí a hmyzu. Zpočátku (a v jisté míře je tomu tak i dnes) znamenala tato záliba pro orchideje smrtelné nebezpečí. Okrasné druhy byly ve velkém drancovány a převáženy do Evropy. Transport rostlin byl zatížen velikými ztrátami a obtížné bylo i jejich pěstování v umělých kulturách, neboť člověk neznal složité symbiotické vztahy orchidejí s houbami, tudíž je nedokázal úspěšně množit. Obrat nastal počátkem 20. století, kdy byl Noëlem Bernardem objeven princip mykorhizy a zanedlouho učinili Knudson a Burgeff první úspěšné pokusy s výsevy orchidejí.

Zájem člověka byl zprvu pro orchideje nevýhodný, postupně se však (dílem i působením ekonomických zájmů) dospělo k novým objevům, které mohou být pro orchideje pozitivní. Po vypracování metod umělého generativního množení již nemusí být rostliny odebírány z přírody a hlavně se zde otevřel prostor jejich dalšího evolučního vývoje šlechtěním. Orchideje díky přednostem získaným při evoluci vztahu se hmyzem, jsou schopny, podobně jako další kulturní rostliny, navázat „symbiózu“ s člověkem a osídlit zcela nové typy stanovišť (skleníky, květináče apod.), kam se dnes dokonce přeneslo těžiště výskytu mnohých v přírodě mizejících druhů. Orchideje tedy takto dokáží „čelit“ současné redukci přírodních biotopů na této planetě.

Toto se však týká především tropických druhů. Vstavačovitě mírného zeměpisného pásma jsou dnes stále kultivovány jen minimálně. Je to dáno malým komerčním zájmem o ně (květy mají skromnější) a jejich většími pěstebními nároky díky komplikovaným symbiotickým vztahům. Avšak právě záhady a pozoruhodnosti jejich života mohou přispět k jejich vlastní záchraně, neboť jsou výzvou pro mnohé vědce i ochránce. Dokladem pokusu orchidejí „využít“ zájem člověka je i tato práce.

Letošní práci navazují na předloňský „Pokus o asymbiotický výsev prstnatce Fuchsova“. Předcházející práce si kladla za cíl zjistit, zda je možné s prostým vybavením úspěšně provést in vitro výsev středoevropské orchideje prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*). Nynější práce se dále zabývá přenosem vypěstovaných sterilních semenáčků na přirozený půdní substrát a popisuje další výsev zmíněného druhu, orientační výsevy dalších orchidejí - prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), pětiprstky žežulníku (*Gymnadenia conopsea*) a vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*) a kultivaci symbiotických hub, jež hrají významnou roli na přirozených stanovištích.

Asymbiotický výsev je nejšetnějším způsobem odvození studijních hrnkových kultur, které jsou důležité ke zkoumání zákonitostí života orchidejí, neboť možnosti pokusů s přírodními rostlinami jsou vzhledem k jejich ohrožení omezené. Řešení otázek kultivace přispívá k pochopení způsobu života orchidejí a je tedy i krokem k záchraně mizejících druhů.

2 Literární přehled

2.1 Biologický úvod

2.1.1 Mykorhizní symbióza

S mykorhizními symbiózami, jež vznikly přeměnou parazitizmu houby na oboustranně prospěšný vztah, se můžeme setkat u většiny vyšších rostlin, liší se však mírou interakce houbových vláken s kořeny rostlin.

Při ektomykorhize se vytváří plášť houbových vláken na koncích mladých kořenů, přebírá funkci kořenového vlášení a usnadňuje rostlině příjem vody a rozpuštěných živin. Vláknata hub pronikají i do nitra kořenů, kde tvoří tzv. Hartigovu síť, intracelulární infekce je však zanedbatelná. Podobným typem jako ektomykorhiza je ektendomykorhiza, hyfy se však vyskytují i v buňkách kořenů. Oba typy symbióz se hojně vyskytují u lesních dřevin, houby jsou z tříd stopkovýtrusé (*Basidiomycetes*) a vřeckaté (*Ascomycetes*).

Mnohem větší provázanost rostliny s houbou nalzáme u endomykorhizních interakcí. Nevytváří se sice plášť na povrchu kořenů, ale hyfy se rozvíjí uvnitř buněk, kde vytváří klubíčka, stromečky (arbuskuly) či měchýřky (vezikuly).

Nejrozšířenějším druhem endomykorhizy je vezikulo-arbuskulární mykorhiza (VAM). Z intracelulárních hyf přijímá rostlina fosforečné ionty a naopak poskytuje houbě uhlikaté látky.

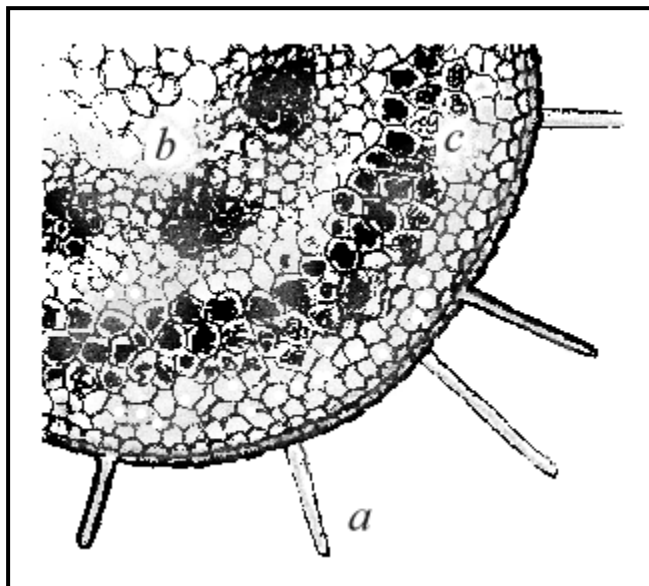
U vřesovcotvarých rostlin (*Ericales*), rostoucích na rašelinných půdách, kde je většina živin vázána v nerozpustné organické formě v odumřelých stélkách rašeliníku se vyskytuje erikoidní druh endomykorhizy. Hyfy hub (vřeckaté (*Ascomycetes*)) v tomto případě rostlina rozkládá a přijímá fosfor, dusík, stopové prvky i některé organické látky (vitamíny, hormony).

Nakonec u čeledi hnilákovité (*Monotropaceae*) slouží mykorhiza jako výhradní zdroj organických látek, neboť u těchto rostlin neprobíhá fotosyntetická asimilace. Uhlíkaté látky vlastně proudí z okolních zelených rostlin, neboť s nimi vytváří tatáž houba také mykorhizní vztah.

Podobným druhem endomykorhizy je orchideoidní mykorhiza, vývojově sice nejmladší, avšak mírou specializovanosti nejpozoruhodnější. Mykorhizní symbióza umožnila orchidejím osídlit stanoviště s malou konkurencí jiných rostlinných druhů, které tam nenachází vhodné podmínky, neboť orchideje mohou mykotrofní výživou kompenzovat nedostatek minerálních látek (při růstu na chudých horských, rašelinných či písčitých půdách) nebo omezenou možnost autotrofní výživy (v zapojených lesních porostech s minimem slunečního záření).

Hyfy stopkovýtrusých hub (*Basidiomycetes*), například rody *Thanatephorus*, *Caratobasidium*, *Ypsilonoidum*, *Xerotus*, či *Armillaria*, pronikají do takzvaných hostitelských buněk v primární kůře kořene vstavačovité rostliny, kde se zprvu rozrůstají ve spirály a pelotony, později se však rozpadají a jsou rostlinou stráveny. Orchidej takto přijímá jak anorganické látky (vodu, fosforečné sloučeniny), tak i

ústrojné sacharidy, bílkoviny, vitamíny a mnoho dalších látek. Míra heterotrofní výživy je u jednotlivých druhů vstavačovitých odlišná. Obligátně mykotrofní jsou nezelené druhy, u nás častější hlístník hnízdák (*Neottia nidus-avis*), vzácná korálice trojklaná (*Corallorhiza trifida*) a téměř vyhynulý sklenobýl bezlistý (*Epipogium aphyllum*) a



Obr. 2: Řez kořenem orchideje
 a – kořenové vlášení
 b – cévní svazky
 c – hyfy v hostitelských buňkách

hnědenec zvrhlý (*Limodorum abortivum*). Naopak plně autotrofní jsou v dospělosti z celkového počtu 60 druhů pouze střevíčník pantoflíček (*Cypripedium calceolus*) a bradáček vejčitý (*Listera ovata*). Větší závislost na mykorrhize mají většinou lesní druhy, autotrofní výživa naopak převládá u druhů výslunných stanovišť.

2.1.2 Klíčení a následná ontogeneze orchidejí

Zcela klíčovou roli sehrála mykorrhiza při evoluci rozmnožování a rozšiřování orchidejí. Semeno orchideje se redukovalo pouze na nepatrné embryo chráněné osemením bez zásobních látek. Díky minimální velikosti (délka nejvýše 1 mm) a nepatrné hmotnosti mohou tak semena využívat v maximální míře výhody rozšiřování větrem na velké vzdálenosti a obsadit potenciální stanoviště. Klíčení semen je však úspěšné pouze za přítomnosti vhodných hub. Ve vlhku semeno nabobtná, praskne osemení a ke klíčícímu embryu jsou chemicky přilákány hyfy, které pronikají do jeho spodní části. Po krátkém parazitování začnou být infikující hyfy zárodkem stravovány. Následujících několik měsíců se klíčící rostlina žíví pouze heterotrofně a semeno se přeměňuje v 1 – 2 mm velký kulovitý útvar, tzv. protokorm. Poté raší první kořenové vlásky, zakládá se list a protokorm přebírá funkci zásobní hlízky. Později se rozvíjí adventivní kořeny a vytváří se pravá hlíza. Vývoj je velice pomalý, dosažení reprodukčního stáří může trvat až deset let.

Malou šanci setkání semena se symbiotickou houbou kompenzují orchideje tvorbou obrovského počtu semen. V jedné tobolce jich bývá průměrně několik tisíc a statná rostlina může vyprodukovat až sto tisíc semen. Přesto z celého množství klíčí nepatrný zlomek semen. Mnohdy se orchideje nemnoží ani na chráněných lokalitách,

příčinou může být kompaktní travní drn, který neumožní kontakt semen s půdou a klíčení drobných rostlinek.

2.2 Kultivace orchidejí

2.2.1 Historie

První kultivační snahy se týkaly tropických orchidejí. V 19. století začaly evropské expedice pronikat hlouběji do tropických pralesů, odkud přivážely mnoho nových druhů pozoruhodných rostlin, především orchidejí, které se staly módními a oblíbenými okrasnými květinami. Velká poptávka však nemohla být uspokojována množением rostlin v Evropě, které, kromě vegetativních postupů, nebylo úspěšné, neboť klíčení probíhá pouze za přítomnosti vhodné symbiotické houby, což není při běžném výsevu zajištěno. Proto pocházela většina prodávaných rostlin z dovozu, což vedlo k exploataci tropických pralesů. Například jen v roce 1875 vyvezl Benedikt Roezl z Mexika 100 000 orchidejí získaných levně od domorodců. Mnoho rostlin transport nepřežilo (HOFFMANNOVÁ, 1993).

Pěstitelé snažící se získat semenné potomstvo pěstovaných orchidejí, které by kromě účinného množení přinášelo i možnost šlechtění, posléze zjistili, že semena klíčí při výsevech k mateřským rostlinám rostoucím ve starých sklenících, kde je již půda dostatečně infikována houbami. Příčinu objasnil Francouz Noel Bernard (1899), když objevil závislost klíčící rostlinky na mykorhize. Současně se mu podařilo získat první semenáčky výsevem semen hlístníku hnízdáku (*Neottia nidus-avis*) na umělou kulturu mykorhizní houby získané z kořenů rostliny. Na jeho pokusy navázal německý badatel Hans Burgeff který takto vyséval vstavač mužský (*Orchis mascula*) a vstavač vojenský (*Orchis militaris*). Tento způsob nazývaný symbiotický výsev se stal první možností generativního množení orchidejí. Jeho úspěšnost je však omezena obtížnou udržitelností rovnováhy mezi houbou a orchidejí a většina semenáčků odumírá.

Významný krok ve výzkumu množení orchidejí učinil ve 20. letech Američan L. Knudson, když zjistil, že hlavními látkami, které získávají orchideje symbiózou s houbou, jsou sacharidy. Knudson poté prvně získal semenáčky tropických orchidejí aseptickým výsevem semen na agarovou živnou půdu s obsahem maltózy, která nahradila přítomnost hub. Proto je metoda nazývána asymbiotický výsev. Asymbiotický výsev je v současnosti hojně využíván k množení tropických orchidejí (zvláště při získávání nových hybridů křížením, jinak se okrasné tropické druhy množí ve velké míře vegetativně explantátovými kulturami). Výsevy vstavačovitých mírného zeměpisného pásu jsou záležitostí pouze vědeckých ústavů v rámci výzkumných prací neboť tyto druhy nemají komerční uplatnění. Nejlepších výsledků je dosahováno s prstnatci (*Dactylorhiza majalis*, *fuchsii*, *maculata*), pětiprstkou (*Gymnadenia*), vemeníky (*Platanthera*) a vstavači (*Orchis morio*, *militaris*, *mascula*). Bez úspěchů však zůstávají pokusy s kruštíky (*Epipactis*), okroticí (*Cephalanthera*) apod., pravděpodobně pro jejich silnější mykorhizní závislost.

2.2.2 Metody asymbiotického výsevu

Postup asymbiotického výsevu orchidejí lze shrnout do několika základních kroků. První fází je sběr semen ve vhodném stádiu zralosti a jejich desinfekce. Následuje příprava a sterilizace živné agarové půdy a poté vlastní výsev, který je nutné provádět v přísně aseptických podmínkách. Pak probíhá několikaměsíční kultivace *in vitro*, během které semena vyklíčí v zatím nezelené protokormy, které dále dorůstají v semenáčky. Když rostlinky dosáhnou dostatečné velikosti, přenáší se na přirozený substrát do hrnků, což je provázeno mnohými ztrátami a obtížemi. Získání květoschopných semenáčků zabere minimálně čtyři roky.

Sběr a desinfekce semen

V literatuře se uvádí vysévat jak semena zralá, tak i semena nezralá, ve $\frac{2}{3}$ celkové zralosti, tedy asi 4 – 6 týdnů po opylení. Vhodnost použití nezralých semen je zdůvodňována menší vyvinutostí testy chránící semeno, která zpomaluje hydrataci semen a opoždí vyklíčení. Na kvalitu semen mají velký vliv také klimatické podmínky při zrání, proto je nutné posuzovat nejvhodnější období individuálně. Pro dlouhodobější uchování se doporučuje semena vysušit a uschovat v chladu či zmrazit.

Výrazný vliv na úspěšnost klíčení má postup desinfekce semen. Účelem je v první řadě odstranění choroboplodných zárodků z povrchu semen, které by jinak infikovaly agarovou živnou půdu plísněmi. V druhé řadě usnadňuje desinfekce klíčení díky narušení odolné testy agresivními látkami, odplavení kyseliny abscisové a odstraněním suberinu ze semen. V průběhu desinfekce se zvláště zralá semena zřetelně odbarví. Základními desinfekčními prostředky jsou nejčastěji 70%-95% ethanol, který slouží jako smáčedlo, často s přísadou detergentu, a přípravky uvolňující molekulární kyslík jako je chlornan sodný (NaOCl) nebo vápenatý (Ca(OCl)_2) obsažený v chlorovém vápně. MICHL (1988) používal nezralá semena a univerzální desinfekční proces sestávající se z protřepávání semen v ethanolu (1 min), promytí sterilizovanou vodou a pětiminutovým třepáním v nasyceném roztoku (28 g na 100 ml) chlorového vápna, který třikrát opakoval. VLAŠÍNOVÁ (1990) používá pouze 7% roztok chlornanu a navíc několikadenní máčení v rašelinném výluhu, který má díky obsahu huminových látek odstraňovat dornanci semen. LÁTALOVÁ (2000) desinfikovala semena 40 – 80 minut v 7% Ca(OCl)_2 . Koncentraci a dobu působení desinfekčního roztoku je nutné přizpůsobit zralosti a velikosti semen.

Živné médium

Podobně jako postupy desinfekce, liší se i uváděné receptury pro přípravu živných půd. Základem všech půd je agar v koncentracích 8 – 16 g/l. Například MICHL (1988) používá odlišnou hustotu půdy pro výsev (8 g/l) a následný růst (15 g/l). Další skupinu tvoří anorganické minerální soli zajišťující příjem iontů NO_3^- , NH_4^+ , K^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} a mikroprvků. Srovnání receptur několika autorů uvádí tabulka 1. Orchideje zřejmě vykazují vůči minerálním složkám média širokou valenci. Dokládá to MICHL (1988),

jenž uvádí, že nepozoroval ovlivnění klíčení zvýšením ani snížením koncentrace solí v rozmezí téměř jednoho řádu. Určitou pozornost je nutné věnovat formě dodávaného dusíku. Dle Bularda a Mearda (LÁTALOVÁ, 2000) je anorganický dusík pro klíčící orchideje nevhodný, neboť ho nejsou schopny přijímat, což může souviset s adaptací na mykotrofní výživu (Dijk et Eck, 1995 podle LÁTALOVÁ, 2000). Často je proto do živných médií přidáván dusík ve formě organické (extrakt z kvasnic, pepton nebo přímo aminokyseliny).

Zásadní složkou živné půdy, která umožňuje klíčení semen vstavačovitých, jsou sacharidy. Nahrazují mykotrofní výživu rostlin. Nejčastěji jsou používány monosacharidy glukosa a fruktosa a disacharid sacharosa v množstvích od 10 do 20 g/l. MICHL (1988) uvádí dobré výsledky s výsevni půdou obsahující 10 g glukosu. Pro následný růst používá živnou půdu s 20 g sacharosu. LÁTALOVÁ (2000) srovnávala klíčivost semen při použití sacharosu a glukosu (10 g/l) a u vstavače kukačky (*Orchis morio*) prstnatce plamatého (*Dactylorhiza maculata*) nezjistila významné rozdíly. K podobným výsledkům došli i Purves a Hadley (1976) při kultivaci smrkovníku plazivého (*Goodyera repens*) na médiích s 10 g sacharosu, glukosu, fruktosu nebo trehalosu. Některé druhy, jako například vstavač kukačka, mohou klíčit dokonce i v čisté vodě, sacharidy však klíčení stimulují a jsou nezbytné pro další vývoj. Na druhou stranu inhibičně se mohou projevit zvýšené koncentrace sacharidů. Na prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*) tak působí sacharosa již nad 16 g/l (Rasmussenová, 1995 podle LÁTALOVÉ, 2000). Důvodem je vysoká osmotická aktivita média. Při koncentracích nad 50 g/l dochází u semenáčků k inhibici fotosyntézy a rostliny se stávají obligátně heterotrofní (PROCHÁZKA et VELÍSEK, 1983).

Tab. 1: Přehled minerálního složení některých půd

Molární koncentrace minerálních živin (mmol.dm ⁻³)				
Receptura	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	K ⁺
Burgeff Eg 1 1936	4,03	9,80	3,28	4,71
Knudson C 1946	8,06	9,80	1,84	1,84
Fast 1978	0,81	10,35	0,19	0,82
Michl 1988	1,60	2,01	1,60	2,00

Další přísadou živné půdy, která zlepšuje výsledky kultivace je aktivní uhlí v množstvích 1 – 5 g/l. Podle LÁTALOVÉ (2000) funguje jako adsorbent toxických látek vzniklých během růstu, jejichž oxidace jinak zapříčiňuje hnědnutí a odumření kultur, adsorbent fytotoxického 5-hydroxymethylfurfuralu, který vzniká dehydratací glukosu při autoklavování v kyselém prostředí a jako aerační přísada, která také způsobuje přirozenější tmavou barvu média, což může stimulovat kořenové špičky k růstu. Hnědnutí rostlin, které způsobuje oxidace polyfenolických látek na chinoidní struktury, může dále zpomalovat přísada redukčních činidel jako je kyselina citronová či askorbová. Kyseliny zároveň upravují pH na doporučovanou hodnotu 5,0 – 5,8.

Nakonec bývají do živných půd přidávány látky vitamínové a hormonální povahy jako například biotin, pyridoxin, thiamin, niacinamid, inositol, kyselina listová, auxiny, cytokininy a nejrůznější extrakty (kokosové mléko, ananasová šťáva, mrkvový,

bramborový a kvasniční extrakt), které v některých případech stimulují vývoj semenáčků.

Hotová živná média jsou plněna do kultivačních nádob a sterilizována při 120°C a zvýšeném tlaku po dobu 20 minut. Termolabilní látky (vitamíny apod.) je nutné sterilizovat mikrofiltrací a teprve poté přidávat do média. Jako kultivační nádoby se používají zkumavky (pro výsev) či skleněné lahve objemu okolo 100 ml. Zátka by měla být přístupná pro plyny, tedy například vatová obalená alobalem.

Výsev a kultivace

Výsev je nezbytné provádět naprosto asepticky. Nejjednodušeji ho lze realizovat v páře nad hrncem s vroucí vodou (DUŠEK et KŘÍSTEK, 1986), lepší je použití sterilních boxů buď s filtrací vzduchu a germicidní zářivkou či desinfikovaných chemicky (kyselina peroctová, Desident).

Následné klíčení probíhá ve tmě při teplotě 20 – 25°C. Světlo klíčení inhibuje. Po vyklíčení bývají protokormy velikosti 1,5 – 2,5 mm přesazovány a nadále kultivovány na světle, ne však přímém slunečním, při 18 – 23°C. Druhy mírného pásma přizpůsobené ročnímu střídání teplot vyžadují pravidelné zchlazování kultur na 2 – 4°C po dobu 2 – 3 měsíce. Hlavním problémem *in vitro* výsevů orchidejí je spontánní hnědnutí rostlin, které často končí až totálním úhynem semenáčků. Z tohoto důvodu je obtížné získat například vyspělejší semenáčky prstnatce bezového (*Dactylorhiza sambucina*) (MICHL, 1988). Hnědnutí zřejmě podporuje sluneční světlo a vysoká teplota, vysoká koncentrace sacharidů a oxidačně působící substance jako je Fe³⁺ a banánová emulze. Hnědnutí lze mimo přídavku redukčních činidel do média zmírnit údajně také zchlazením kultury a přesazením na chudší půdu (VLAŠINOVÁ, 1990). Vývoj semenáčků od vyklíčení do velikosti umožňující přenos na přirozený substrát (při délce listů alespoň 3 cm a rozvinutém kořenovém systému) trvá minimálně rok v závislosti na konkrétním druhu.

Přenos semenáčků ex vitro

Dostatečně vyvinuté semenáčky je nutné přenést z *in vitro* kultury na přirozený substrát, který umožní jejich další růst. Přesazení semenáčků ztěžuje několik problémů, které způsobují velké procento úhynu. Zaprvé je to nedostatečná vyvinutost listových orgánů během růstu *in vitro*, které postrádají epikutikulární vosk na povrchu a jsou tedy náchylné k přeschnutí. Dále je možné, že rostliny rostoucí na sacharidové živné půdě nevykazují dostatečnou fotosyntetickou aktivitu díky částečně heterotrofnímu způsobu výživy a listy představují spíše zásobní orgány (NOVÁK, 1990). Druhým problémem je závislost orchidejí na mykorrhizní symbióze. Nejproblematictější je převod silně mykotrofních druhů, které musejí být rychle inokulovány hyfami hub, snadnější je přesazování v dospělosti zcela autotrofních druhů, jako je střevec pantoflíček (*Cypripedium calceolus*) a podobně. Semenáčky pocházející ze sterilních kultur jsou navíc náchylné k infekcím parazitickými houbami. MICHL (1988) a další doporučují jako nejúspěšnější způsob vysadit semenáčky do květináče k dospělé rostlině pocházející z přírody, která je již infikována symbiotickými houbami. Při vysazení na čistý substrát či do samotné hlíny z lokality bez orchidejí zaznamenal kompletní úhyn

semenáčků. Naproti tomu dr. Baláž (ústní sdělení, 2003) zaznamenal jako nejlepší způsob vysazení rostlinek do čistého dobře hydratovaného Rockwoolu (čedičová vata používaná k zateplování budov) bez infekce houbou, která se může u malých rostlin z *in vitro* výsevů projevit paraziticky, načež musejí být udržovány ve stínu a dostatečné vlhkosti. K mykorhizní infekci má dojít samovolně vzdušnými spory.

Dospělé rostliny se poté můžeme pokusit přesadit na přírodní stanoviště, buď do zahrady, nebo se můžeme pokusit o posílení populací na stávajících lokalitách. Tyto pokusy se však stále nesečkávají s dlouhodobějšími úspěchy. Například BURGEFF (1954) popisuje osud rostlin vstavače mužského (*Orchis mascula*) a vojenského (*O. militaris*) vysazených na různé lokality v údolí Mohanu mezi léty 1939 – 1953. Z několika set rostlin prakticky všechny uhynuly.

3 Materiál a metody

3.1 Úvod

Asymbiotickými výsevy orchidejí se zabývám počínaje rokem 2001. Tehdy jsem řešil převážně technické záležitosti výsevů – způsob desinfekce semen, konstrukci Haszlerovy skříně umožňující aseptický výsev semen, přípravu živného média, kultivační nádoby... V létě 2001 jsem vysel malé množství semen prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*). Ač jsem si za cíl pokusu kladl především sterilní provedení pokusu a nedoufal v lepší výsledek, dostavil se úspěch v podobě vyklíčených protokormů (prosinec 2001). Koncem roku 2002 jsem semenáčky rozsadil do větších nádob a pěstoval je *in vitro* až do září 2003, kdy jsem celkem 34 semenáčků přenesl po 25 měsících od výsevu na přirozený substrát. 5 rostlinek se ujalo a roste dodnes.

Souběžně s tímto „průkopnickým“ pokusem jsem prováděl další výsevy zaměřené na optimalizování postupu a porovnání klíčivosti prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) a dalších druhů, prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), pětiprstky žežulníku (*Gymnadenia conopsea*) a vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*), které jsem vyséval v průběhu léta 2003.

Na protokormech získaných výsevem prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) (asi 200 ks) jsem poté zjišťoval vliv obsahu sacharosy a agaru v živné půdě na rychlost růstu a hnědnutí semenáčků. Kultivace prstnatce Fuchsova na umělém médiu probíhá doposud.

Výsevy ostatních druhů neměly uspokojujivé výsledky, proto jsem roku 2004 zopakoval výsev prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), přičemž jsem použil různou koncentraci sacharidů v médiu a několik způsobů desinfekce semen.

Od roku 2002 také pěstuji v kultuře *in vitro* symbiotickou houbu získanou kultivací z kořenů prstnatce Fuchsova.

3.2 Technické zařízení pro provedení výsevů

3.2.1 Desinfekce semen

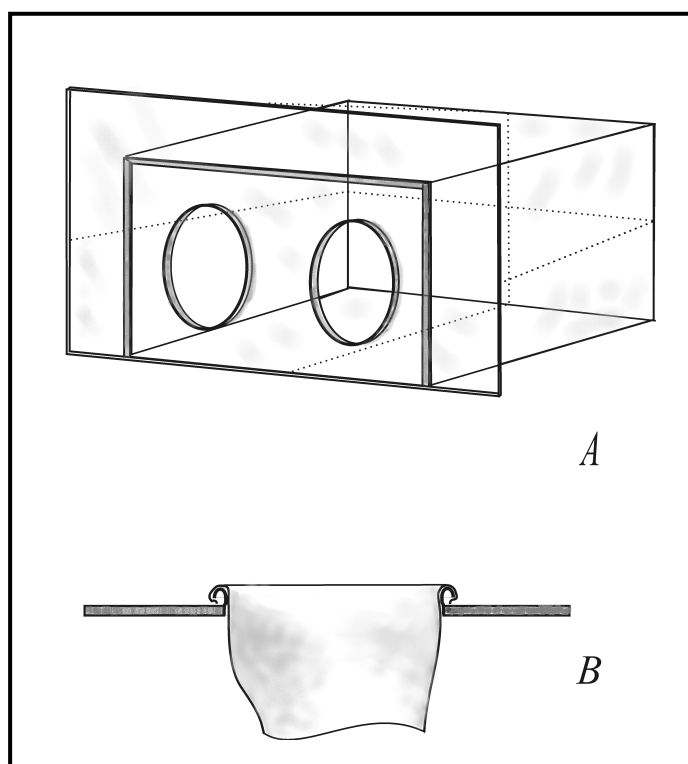
Během desinfekce semen operujeme s velkým množstvím nepatrných semen, která plavou na vodě a navlhčená se velice snadno přichytávají na manipulační nástroje a stěny nádob, potřebujeme tedy speciální vybavení aby mohla být desinfekce provedena jednoduše a bezztrátově. Metodiku desinfekce jsem převzal od Zdeňka Ježka (JEŽEK, 1996). Semena (pro snadné plnění a vypouštění injekce raději menší množství) se naplní do injekční stříkačky s jemnou jehlou (použil jsem jehlu o průměru 0,5 mm, kterou neprojdou semena) a do injekce se střídavě nasávají desinfekční roztoky. Nakonec se již ve sterilním výsevním boxu vyjme píst injekce a semena se mohou vysít. K desinfekci používám syntetický líh a čerstvý nasycený 22% roztok $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ připravený přelitím chlorového vápna destilovanou vodou a zfiltráním suspenze.

3.2.2 Příprava živné půdy a kultivační nádoby

Všechny substance živné půdy (uvedené u konkrétních výsevů) rozpustím ve vodě a poté vařím v kádince do rozvaření agaru. Hotovou ještě teplou půdu nalévám po důkladném zamíchání, aby se neusazovalo aktivní uhlí, do kultivačních nádobek a poté sterilizuji 20 minut v tlakovém hrnci. Jako kultivační nádoby používám skleničky od jogurtu (objem 290 ml). Zátky jsem prorazil hřebíkem a otvor utěsnil kostičkou molitanu z důvodu umožnění výměny plynů v nádobě. Molitan nepropustí spory plísní (JEŽEK, 1996). Během tuhnutí půdy po sterilizaci nádobkami kroužím, aby se opět neusazovalo aktivní uhlí.

3.2.3 Výsev semen

Pro výsev je nutné zhotovit si sterilní box, který umožní přenos desinfikovaných semen na živnou půdu bez zanesení plísňové infekce, která by výsev znehodnotila. Nejjednodušším prostředkem je Haszlerova skříň. Zhotovil jsem ji z akvária o rozměrech 35 × 21 × 16 × cm (lepší by však bylo větší), které jsem položil na bok. Nezasklenou stěnu jsem zakryl deskou z plexiskla, do níž jsem vyřízl páječkou otvory pro ruce, do kterých jsem vlepil okraj seříznutý z kelímku od másla vhodného průměru.



Obr. 3: A – Haszlerova skříň
B – detail uchycení rukavic

Deska byla opatřena těsněním a provázky připevněna k akváriu. Při výsevu pracuji v gumových rukavicích, jejichž lem může být přetažen přes okraj kelímku v otvorech, čímž je možno skříň dokonale utěsnit (např. při působení desinfekce před výsevem;

během výsevu procházejí rukavice otvorem volně). V prvních letech jsem skříň desinfikoval vystříkáním 10% roztokem kyseliny peroctové (persteril) dle DUŠKA et KŘÍSTKA (1986), později jsem přešel na Desitent (JEŽEK, 1996), který obsahuje 0,5% carbethopendeciniu bromidum (ve spreji), nepůsobí proto korozi kovových předmětů.

Před výsevem skříň vymyji saponátem, naskládám do ní kultivační nádoby, lahvičku se sterilizovanou destilovanou vodou a odpadní nádobku. Poté vše včetně rukavic zdesinfikuji. Během působení desinfekce ve skříni dokončím desinfekci semen, z injekce vypustím desinfekční látku, povrchově ji zdesinfikuji a ve skříni semena promyji sterilizovanou vodou, kterou vypouštím do odpadní nádoby. Potom vysévám semena na půdu lopatkou, kterou jsem vyrobil z drátu z nerezové oceli (délka 20 cm, průměr 3 mm) tak, že jsem rozklepal jeho konec. Lopatku před výsevem vyžihám v plameni.

Při výsevů uvedeným postupem jsem nikdy nezaznamenal infekci kultur plísněmi.

3.3 První pokus o kultivaci prstnatce Fuchsova

První pokus zahrnuje operace od sběru semen přes výsev a pěstování semenáčků na živné půdě až po přenos rostlin *ex vitro*. Vysévaný druh - prstnatec Fuchsův (*Dactylorhiza fuchsii*) patří k nejčastějším druhům v okolí Jablonce nad Nisou. Vyskytuje se nejčastěji na lesních prameništích nebo na loukách. Je to rostlina vysoká od 20 do 50, výjimečně 100 cm s podlouhlými skvrnitými listy a hustým květenstvím bílé až nachové barvy. Dle zkušeností dr. Michla patří k nejsnáze vysévatelným druhům.

3.3.1 Výsev

Sběr semen

Dne 12.8.2001 jsem sebral celkem 12 semeníků ze 3 různých rostlin rostoucích v malé populaci na lesní bažince polozastíněné olší, s podrostem přesličky, starčku a skřipiny lesní na svahu Novoveského vrchu u Jablonce nad Nisou.

Semena byla bílá, nezralá, pevně uzavřená v zelených semenících. Rostliny zde kvetly v posledním týdnu června. Po návratu z lokality jsem provedl mikroskopickou prohlídku semen. Semeno je dlouhé přibližně 1 mm, skládá se z kulovitěho, citrónově žlutého protokormu, který je kryt osemením tvořeným tenkou vrstvou buněk.

Desinfekce semen

Druhého dne jsem semena vyreparoval ze semeníků a dezinfikoval dle metody dr. Jiřího Michla (MICHL, 1988) skládající se z:

- třepání semen v ethanolu 1 minutu
- promytí sterilizovanou destilovanou vodou
- třepání semen v 22% Ca(OCl)₂ 5 minut
- promytí sterilizovanou destilovanou vodou

Postup jsem třikrát opakovl a poté semena vysel do 1 nádoby na živnou půdu.

Tab. 2: Složení živné půdy při výsevu 13.8.2001

Látka	Specifikace	obsah v 1 l půdy
Hydroponex	hnojivo pro hydroponii	1 g
Sacharosa	řepný cukr	20 g
Pangamin	zdroj vitamínu B	0,5 g
Aktivní uhlí	lékařské	1,0 g
Kyselina citrónová	potravinářská	0,2 g
Agar		10 g
Destilovaná voda		1000 g

Složení živné půdy

Složení živné půdy ukazuje tabulka 2.

Hydroponex vyrábí HÜ – BEN, Čerčany, deklarováno $N:P_2O_5:K_2O = 2,5 : 2 : 3$, což odpovídá molárnímu poměru $N:P:K = 13 : 1 : 2,3$. Analýzou jsem zjistil obsah dusíku jak ve formě NH_4^+ tak NO_3^- .

3.3.2 Kultivace *in vitro*

Výsevní nádoba

- 13.8.2001 (1. den) Po výsevu jsem uchovával kulturu *ve tmě při pokojové teplotě*.
- 5.10.2001 (54. den) Nádobu jsem *přenesl na světlo*, neboť jsem se mylně domníval, že došlo k vyklíčení.
- 10.11.2001 (90. den) Kulturu jsem *uložil do lednice (5-7°C)* k navození chladné periody roku. Od konce prosince docházelo pozvolna ke klíčení.
- 3.2.2002 (175. den) Výsev pozvolna přenáším *na teplo a světlo*. V průběhu léta roste první list, později i první adventivní kořen.
- 24.8.2002 (54. týden) Výsev jsem znovu přenesl *do chladu*, abych zmírnil hnědnutí rostlin (zhnědlo několik protokormů).
- 24.10.2002 (63. týden) Nádobu jsem přenesl *zpět na světlo a teplo*. Rostliny se již značně tísní a půda je již vyčerpaná, proto bude nutné přesazení.
- 10.11.2002 (65. týden) Rostliny jsem *přesadil* do 4 nových nádob. Půdu jsem použil stejnou jako pro výsev (tabulka 2). Při přesazování nedošlo k úhynu žádného semenáčku.

Rostliny v nádobách č. 2 a 3

- 10.7.2003 (23. měsíc) Rostliny přeneseny *do chladu*. Během jara a léta dorostly největší rostliny do velikosti umožňující přenos *ex vitro*.
- 23.9.2003 (25. měsíc) Celkem 34 rostlin *vysazeno na přirozený substrát*.

Rostliny v nádobě č. 1 (celkem 5 rostlin)

- 5.4.2003 (20. měsíc) Jedna rostlina počala prudce *hnědnout*, ostatní mírně. Mírně postižené rostliny byly přesazeny a uchovávány v lednici. Později se mírně vzpamatovávají.
- 1.11.2003 (26. měsíc) Jedna rostlina vyrazila nové listy a mohla být přenesena *ex vitro*, ostatní v jádru prohnědlé.

Rostliny v nádobě č. 4 (2 trsy)

- 30.6.2003 (23. měsíc) Rostliny také pozvolna hnědnou, přeneseny do lednice a poté přesazeny. Po čase odumřely.

3.3.3 Přenos semenáčků *ex vitro*

Ke konci léta bylo ve výsevu 6 rostlin s dostatečně vyvinutým kořenovým systémem (2 – 3 adventivní kořeny na bázi hlízkovitě ztloustlé) a s listy delšími tří centimetrů. Přenos byl proveden po předchozím jarovizačním ochlazení. Použil jsem postup dle doporučení dr. Milana Baláže, rostliny byly zasazeny do sterilizované dobře hydratované čedičové vaty Rockwool. Substrát jsem připravil několikátýdenním máčením běžného Rockwoolu používaného ve stavebnictví ve vodě se saponátem, propláchnutím a sterilizováním v tlakovém hrnci. Poté jsem ho naplnil do květináčku s dobře zajištěnou drenáží (polystyrénová drť). Rostliny jsem po vyjmutí z agaru pětkrát opláchl ve vodě, nechal krátce osušit rozložené na papíře a bez ošetření fungicidy zasadil do substrátu. V prvních 2 měsících byly semenáčky uchovávány v chladné stinné místnosti pod skleněným poklopem. Denně byly roseny sterilizovanou vodou a občas zality převařeným roztokem Hydroponexu. Potom byly přemístěny do tepla. V zimním období jsem je přisvětloval úspornou zářivkou, na jaře jsem je umístil na okenní parapet (z počátku ještě zastíněné průsvitným papírem). Substrát je udržován stále vlhký, aby rostliny nepřeschly, protože prstnatec Fuchsův (*Dactylorhiza fuchsii*) roste běžně na lesní slatinách celoročně zamokřených.

3.4 Srovnávací výsev prstnateců Fuchsova a májového, pětiprstky a vemeníku

Prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*), pětiprstka žežulník (*Gymnadenia conopsea*) a vemeník zelenavý (*Platanthera chlorantha*) patří spolu s prstnatcem Fuchsovým (*Dactylorhiza fuchsii*) k našim nejhojnějším druhům. Prstnatec májový roste často ve velkých množstvích na vlhkých loukách od nížin do hor. Podobá se prstnatci Fuchsovu a na společných lokalitách s ním vytváří hybridní prstnatec Braunův (*D. ×brauni*). Pětiprstka žežulník má těžiště výskytu spíše ve vyšších polohách, bohaté populace jsou například na Rýchorách v Krkonoších. Je to subtilnější rostlina s dlouhými kopinatými listy a hustým květenstvím světle růžových květů připomínajících komára. Vemeník zelenavý je druhem podhorských luk. Rostlina má na bázi většinou dva vejčité listy, 50 cm dlouhý stvol je zakončen květenstvím velkých vonných bílých květů s úzkým pyskem a dlouhou ostruhou nesoucí nektar. Všechny

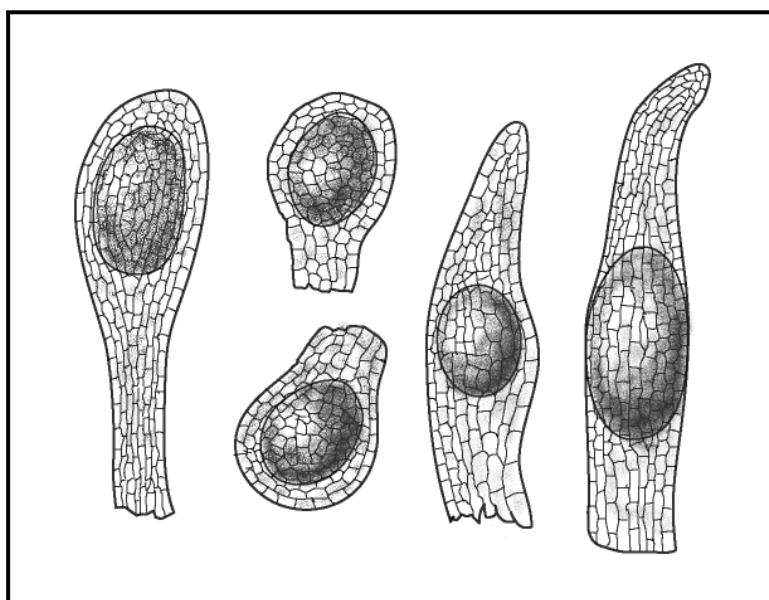
druhy mají podobné ekologické nároky (často se vyskytují společně) a jejich výsevy bývají úspěšné (MICHL, 1988), proto jsem se rozhodl vyzkoušet jejich výsev a porovnat jejich klíčivost na shodné agarové živné půdě.

3.4.1 Výsevy semen

Sběr semen

Celkem 20 semeníků prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) jsem sebral za velmi horkého dne před bouřkou dne 30.6.2003 z luční lokality s hojným výskytem v Rádle u Jablonce nad Nisou. Semena jsem vysel ještě téhož dne.

Pětiprstku žežulník (*Gymnadenia conopsea*) jsem sbíral 30.7.2003 na lokalitě Pralouka pod Bukovcem v Jizerských horách. S přihlédnutím k celkovému počtu rostlin na lokalitě jsem sebral pouze 16 semeníků ze 2 rostlin. Semena jsem vyséval druhého dne.



Obr. 4: Semena prstnatce májového, pětiprstky žežulníku, prstnatce Fuchsova a vemeníku zelenavého.

Semena vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*) jsem odebral 3.8.2003 v počtu 7 tobolek z rostlin, které jsem objevil na severním svahu Kopaniny nad obcí Pulečný nedaleko Jablonce nad Nisou. Vyséval jsem je taktéž druhého dne.

Konečně semena prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) (14 semeníků) jsem sebral opět na lokalitě Novoveský vrch 9.8.2003. Datum sběru jsem volil časnější než v roce 2001, neboť bylo velice teplé jaro a léto a rostliny kvetly dříve. Meteorologické podmínky mohou mít značný vliv na kvalitu semen, proto přikládám záznam průběhu počasí, který jsem začal vést od konce června 2003.

Desinfekce semen

Základní způsob desinfekce byl stejný jako v roce 2001.

Semena prstnatce májového pocházela ze zralých i nezralých tobolek dlouhých 1,3 cm. Kvůli problémům s ucpáváním injekční jehly se jejich desinfekce prodloužila z 15 na zhruba 30 minut. Vyseta byla oranžová semena.

Mikroskopickým porovnáním jsem zjistil, že semena pětiprstky jsou menší než semena prstnatce, proto jsem zkrátil desinfekci na 13 minut. Semena byla víceméně zralá, avšak stále ještě uzavřená v tobolkách. Po prvním třepání v $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ se téměř odbarvila, na počátku byla černá.

Tobolky vemeníku byly ještě zelené, dlouhé 2 – 2,5 cm. Semena byla přichycena k plodolistům. Desinfekcí se značně odbarvila.

Tobolky prstnatce Fuchsova se lišily zralostí podle místa růstu rostliny. Rostliny v mokřích částech bažiny měly menší počet zelených delších semeníků, rostliny rostoucí v místech, které v tehdejší nezvykle suchém létě vyschly, měly velký počet malých semeníků před otevřením. Bílá až hnědá semena po první desinfekci $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ zežloutla.

Živná půda

Oproti roku 2001 jsem snížil obsah sacharosy a nahradil ji glukosou, která se často používá v médiích pro výsev. Kyselinu citrónovou jsem nahradil kyselinou askorbovou, která má silnější redukční účinky. Obsah látek v médiu shrnuje tabulka 3.

Tab. 3: Složení živné půdy při výsevech roku 2003

Látka	Specifikace	obsah v 1 l půdy
Hydroponex	hnojivo pro hydroponii	1 g
Sacharosa	řepný cukr	10 g
Glukosa		10 g
Aktivní uhlí	lékařské	1,0 g
Pyridoxin	lékařský	20 mg
Kyselina askorbová	Celaskon	250 mg
Agar		10 g
Destilovaná voda		1000 g

Složení živných půd bylo pro všechny výsevy shodné, malé odchylky byly pouze ve vlhkosti média (množství vody z kondenzované na povrchu půdy).

3.4.2 Klíčení *in vitro*

Výsev prstnatce májového, pětiprstky a vemeníku

Kultivační nádoby byly po výsevu uloženy do tmy při pokojové teplotě. Během zimy jsem je přenesl do lednice, přes jaro a léto 2004 opět v teple a ve tmě. V srpnu jsem výsevy na 3 týdny zmrazil. Od té doby výsev prstnatce a pětiprstky ve tmě a

v teple bez známek klíčení. U vemeníku vyklíčil 1 protokorm (možná již v září 2003), brzy však zhnědl. Výsev vemeníku udržuji doposud na světle.

Výsev prstnatce Fuchsova

- 9.8.2003 (0. den) Výsev jsem umístil *do tmy při pokojové teplotě*
 10.9.2003 (32. den) Protokormy prokazatelně klíčí.
 24.12.2003 (133. den) Kultura přenesena *na světlo*, přisvětlováno úspornou zářivkou 11 W 13 – 16 hodin denně.
 7.3.2004 (31. týden) Kultura nebyla ochlazována. Ve výsevu je značné množství protokormů, proto je rozsazují na nová živná média. Následující experiment zjišťuje vliv sacharidového složení a hustoty média na růst semenáčků.

3.5 Růst semenáčků prstnatce Fuchsova na různých živných půdách

3.5.1 Živná média

Podstatnými činiteli, které mohou ovlivnit růst rostlinek *in vitro* může být obsah sacharosy. Vysoká koncentrace sacharosy může vést k hnědnutí semenáčků (VLAŠÍNOVÁ, 1990). Obsah sacharidů v půdě může také ovlivnit rychlost růstu a vyvinutost rostlinek. Množství agarů ovlivňuje hustotu média a tím ponoření semenáčků do půdy. V předchozích výsevech jsem si všiml, že hnědnutí je větší u kořenů ponořených do agarů, než u těch které rostou nad půdou, což by se mohlo následujícím experimentem prověřit.

Semenáčky prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) z předchozího pokusu jsem rozdělil do 10 nádob. V každé nádobě byla půda jiného složení. Základní společné substance, které ukazuje tabulka 5, byly doplněny sacharosou v množstvích 0, 5, 10, 15 a 20 g/l a agarem (7,5 a 22,5 g/l). Obsah sacharosy a agarů v jednotlivých nádobách (označených 0-, 0+, ..., 4+) ukazuje tabulka 4.

Tab. 4: Obsah agarů a sacharosy v médiích k přesazování semenáčků 7.3.2004

Označení média		Sacharosa (g/l)				
		0	5	10	15	20
Agar (g/l)	7,5	0-	1-	2-	3-	4-
	22,5	0+	1+	2+	3+	4+

Tab. 5: Základní složky živné půdy k přesazování semenáčků 7.3.2004

Látka	Specifikace	obsah v 1 l půdy
Hydroponex	hnojivo pro hydroponii	1 g
Glukosa		10 g
Aktivní uhlí	lékařské	1,0 g
Spofavit složení 1 tablety:	Směs vitamínů kyselina askorbová 50 mg thiamin 1 mg riboflavin 1 mg pyridoxin 1 mg tokoferol 5 mg retinol 400 µg niacin 10 mg cholecalciferol 2,5 µg pantothenan vápenatý 4 mg	5 tablet
Destilovaná voda		1000 g

3.5.2 Kultivace semenáčků

- 7.3.2004 (31. týden) Po přesazení probíhala kultivace semenáčků při *pokožové teplotě*. Až do přenosu do lednice jsem kultury *přisvětloval* umělým světlem 13 – 16 hodin denně, zároveň jsem je stínil od přímého slunečního světla.
- 23.8.2004 (13. měsíc) Nádoby 0-, 3-, 4- jsem přenesl *do chladu* (některé rostliny začaly hnědnout).
- 1.1.2005 (17. měsíc) Zbývající nádoby jsem také přenesl *do lednice* k navození zimní periody.
- 13.3.2005 (20. měsíc) Kultury byly přeneseny zpět *na teplo a světlo*.

3.6 Vliv desinfekce semen a obsahu sacharosy na klíčení prstnatce májového

Po nepříliš pozitivních výsledcích prvního výsevu prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) jsem se rozhodl detailně prošetřit vliv desinfekce a množství sacharosy v médiu při klíčení. Při krátké desinfekci nemusí být testa semen dostatečně rozrušena a klíčení je inhibováno, při příliš dlouhé desinfekci se mohou porušit zárodky v semenech, která potom opět nevyklíčí.

3.6.1 Výsev semen

Sběr semen

Semena jsem sbíral 16.7.2004 na shodném místě jako v roce 2003. Celkem jsem odebral 40 tobolek s téměř zralými semeny. Protože jsem neměl možnost provést výsev okamžitě, uložil jsem celé, většinou ještě uzavřené tobolky na *dva týdny do lednice*.

Desinfekce a živná půda

Semena jsem vysel do šesti kultivačních nádob na šest odlišných médií 2.8.2004. Základní substance živné půdy uvádí tabulka 6. Jednotlivé nádoby se liší obsahem sacharosy (0 nebo 10 g/l) v půdě a desinfekcí semen. Používal jsem 96 a 70% ethanol, nasycený roztok chlorového vápna (22%) a roztok chlorového vápna zředěný 1:3 (6%) (tabulka 7).

Tab. 6: Základní složky živné půdy k výsevu 2.8.2004

Látka	Specifikace	obsah v 1 l půdy
Hydroponex	hnojivo pro hydroponii	1 g
Glukosa		10 g
Aktivní uhlí	lékařské	1,0 g
Spofavit	Směs vitamínů	5 tablet
Kyselina askorbová	Celaskon	200 mg
Agar		8 g
Destilovaná voda		1000 g

Tab. 7: Obsah sacharosy a použitá desinfekce při výsevu 2.8.2004

Půda	1	4	2	5	3	6
Sacharosa (g/l)	0	10	0	10	0	10
Desinfekce	96% ethanol 22% Ca(OCl) ₂ 1+5 1+5 1+2 min		96% ethanol 22% Ca(OCl) ₂ 1+5 1+5 1+5 min		70% ethanol 6% Ca(OCl) ₂ 1+5 1+5 1+8 min	

Při použití větší koncentrace se semena odbarvila během 1. třepání v chlorovém vápně, při nižší koncentraci až po 2. třepání.

3.6.2 Kultivace výsevů

- 2.8.2004 (0.den) Kultivační nádoby uloženy *ve tmě, teplota pokojová*.
 1.1.2005 (20. týden) Kultury přeneseny *do lednice*.
 13.3.2005 (7. měsíc) Kultury přeneseny *zpět na teplo, ve tmě*.

3.7 Kultivace symbiotických hub

Výzkum symbiotických hub je nedílnou součástí studia orchidejí. Základem je získání čistých kultur hub z kořenů orchidejí, o což jsem se v následujícím experimentu pokusil. Cílem experimentu bylo zjištění optimálního způsobu desinfekce výchozího materiálu (kořenů prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*)) pro získání kultury symbiotické houby. Jako inspirace pro provedení izolace hub mi posloužily postupy uvedené v práci zabývající se pokusy s mykorhizními houbami (OREMUS et OTTEN, 1981).

3.7.1 Založení kultury

Sběr materiálu

9.8.2003 jsem sebral celkem 5 kořenů z několika rostlin prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) rostoucích v mokřadu na Novoveském vrchu. Sběr jsem provedl v závěrečné fázi vegetačního období, neboť tehdy je infekce houbami největší a ztráta kořenů již rostliny nepoškodí (měly téměř zralá semena). Odebíral jsem konce kořenů rostoucích těsně pod povrchem půdy, samotnou hlízu nebylo hýbáno a nebyla ani jinak poškozována. Téhož dne jsem materiálem očkoval živné medium.

Předtím jsem se přesvědčil mikroskopicky o přítomnosti hyf v kořenech. V buňkách byly zřejmé tmavé shluky houbových vláken.

Desinfekce a očkování

Při očkování kultury hub je nutné nalézt optimální desinfekci, kdy jsou zničeny choroboplodné zárodky na povrchu kořenů, avšak hyfy v nitru kořenových buněk zůstávají nedotčeny. K desinfekci jsem používal roztoky chlorového vápna – nasycený a ředěné 1:1, 1:2, 1:4 při různé době působení od 5 do 120 sekund (tabulka 8).

Tab. 8: Desinfekce kořenů při izolaci hub 9.8.2003

		Doba desinfekce (s)					
Ca(OCl) ₂	22%	miska 1					
		5	15	30	-	-	-
		miska 2					
	11%	10	20	30	-	-	-
		miska 3			miska 4		
	7%	10	20	30	45	60	90
		miska 5					
	4%	15	30	60	90	120	-

Očkování bylo provedeno v Haszlerově skříni. Předem omyté kořeny byly rozřezány na segmenty dlouhé okolo 1 centimetru vyžíhanou žiletkou a poté přeneseny pinzetou do Petriho misky s desinfekčním roztokem. Po uplynutí desinfekční doby byly oprány sterilizovanou destilovanou vodou a očkované na živné médium v Petriho miskách. Misky byly nakonec zalepeny izolepou proti vnější infekci a umístěny do tepla při pokojové teplotě. Celkem jsem naočkoval 5 misek, v každé bylo několik oddělených shluků kořenů, které se lišily použitou dobou desinfekce.

Živná půda

Živné médium bylo vyrobeno dle tabulky 9.

Tab. 9: Živná půda ke kultivaci hub 9.8.2003

Látka	Specifikace	obsah v 1 l půdy
Hydroponex	hnojivo pro hydroponii	2 g
Glukosa		20 g
Brambora	uvařená, rozmělněná	50 g
Agar		15 g
Destilovaná voda		1000 g

3.7.2 Kultivace hub

Po celou dobu kultivace byly misky *ve tmě při pokojové teplotě*.

Po týdnu již začal růst prvních vláken mimo kořeny, za měsíc již byla v kultuře vyvinutá mycelia, která jsem 10.1.2004 přeočkoval na nová média (3 misky).

4 Pozorování a výsledky

4.1 První výsev prstnatce Fuchsova

4.1.1 Průběh klíčení do přesazení

Klíčení je chronologicky popsáno v tabulce 10.

Tab. 10: Klíčení prstnatce Fuchsova

Datum	Doba od výsevu	Stav	Pozorování
13.8.2001	0. den	teplo, tma	Výsev.
5.10.2001	54. den	světlo	Již několik týdnů po výsevu patrné bobtnání.
10.11.2001	90. den	chlad	
22.12.2001	132. den		Prvně zaznamenáno klíčení, protokormy vytvořily bílé kulovité útvary velké 1 mm.
3.2.2002	175. den	světlo	Klíčí 10 protokormů, raší kořenové vlásky.
10.3.2002	30. týden		Vyvíjí se 12 protokormů, zakládá se první list, zárodky jsou velké 1,5 mm.
14.4.2002	35. týden		Protokormy se proměňují v hlízky velké 2 mm, z nichž raší drobné zelené lístky válcového tvaru.
8.5.2002	39. týden		Vyvíjí se 20 protokormů, hlízky tmavnou.
13.8.2002	1. rok		List nejvyspělejší rostliny měří 1 cm, ostatní do 5 mm. Na bázi listu se vyvíjí nový útvar hustě porostlý kořenovými vlásky – adventivní kořen. Na počátku léta vyklíčilo asi 10 nových protokormů.
24.8.2002	54. týden	chlad	Některé protokormy hnědnou, zchlazeno.
4.10.2002	60. týden		Růst pokračuje i v chladu, list u 17 rostlin, délka 0,5 – 2,0 (2,3) mm, u 6 rostlin adventivní kořen dlouhý 1 – 5 cm, 20 rostlin v protokormálním stádiu nebo se zárodkem listu.
24.10.2002	63. týden	světlo	Začíná se diferencovat 2. adventivní kořen růst se zpomaluje kvůli vyčerpanosti půdy.

4.1.2 Vývoj po přesazení

Rostliny byly přesazeny na novou agarovou půdu dne 10.11.2002. První listy rostlinek vyvinuté během klíčení postupně usychají a z jejich nitra vyrůstají druhé a

posléze další listy. Růstu nového listu je vždy kladen značný odpor, neboť musí prorůst původním, který podélně praská. Z těchto důvodů jsou listové orgány často deformované. Adventivní kořeny se vyvíjí u většiny vyspělejších rostlin v počtu 1 – 3. Starší kořeny na bázi tloustnou a vytváří tak hlízovitý orgán. Růst semenáčků zachycuje tabulka 11. Do 15.3.2003 je v průměru zachyceno 15 nejvyspělejších z celkem 60 rostlin (zbývající menší měly listy dlouhé teprve 0,3 – 1 cm). Široké věkové rozvrstvení bylo způsobeno nerovnoměrným klíčením. Koncem března se začíná projevovat silné hnědnutí v nádobě č. 1 a v červnu i v nádobě č. 4. Průměrný vzrůst byl poté počítán pouze ze zdravých rostlin (7 z celkem 34).

Tab. 11: Růst semenáčků prstnatce Fuchsova

Datum	Průměrný vzrůst (cm)	Interval (cm)	Pozorování
30.11.2002	1,8	3,0 – 1,0	1 kořen do 1 cm, zárodek druhého.
21.12.2002	2,2	3,6 – 1,4	
21.1.2003	2,5	3,8 – 1,5	1 – 2 kořeny do 1 cm, vyrůstají další listy.
13.2.2003	2,7	4,0 – 1,8	
15.3.2003	3,1	5,0 – 1,5	Zakládá se již i 3. kořen.
23.5.2003	3,2	4,0 – 2,0	Začíná hnědnutí.
4.7.2003	3,8	5,0 – 2,5	Kořeny 1 – 2 (4) cm, začínají tloustnout.
13.8.2003	4,4	5,5 – 3,6	Vyvíjí se v pořadí 3. – 4. list. V chladu.

4.1.3 Hnědnutí semenáčků

Hnědnutí bylo jedinou příčinou úhynu semenáčků pěstovaných *in vitro*. Projevuje se nejdříve postupným blednutím listů rostlin a později hnědým zbarvením počínajícím od báze nejmladšího listu (mimo tohoto se v kultuře objevuje i „nezhoubné“ hnědnutí starých listů a původních hlízek, kdy však zůstává nejmladší list svěže zelený a rostlina neodumírá). Hnědnutí postupuje velmi rychle a během několika týdnů rostlina odumře. Po otevření nádob s uhynulými rostlinami je možné registrovat typický zápach „po zksylých borůvkách“.

Hnědnutí semenáčků v obou nádobách postihlo hromadně všechny semenáčky. Domnívám se, že jednou z příčin hnědnutí v nádobách č. 1 a 4 mohlo být částečné vystavení kultur slunečnímu světlu, neboť v ostatních nádobách, které byly lépe zastíněny, k hnědnutí nedocházelo.

Postižené rostliny jsem se pokusil zachránit.

V nádobě č. 1 zhnědla 1 rostlina 21.3.2003, nádoba byla přenesena do chladu a 5.4.2003 jsem ostatní méně postižené rostliny přesadil. I poté jsem je nechal v chladu. 23.5.2003 začaly rostliny rašit. Nakonec jsem mohl jednu rostlinu 1.11.2003 přenést na přirozený substrát. Ostatní definitivně odumřely (Zhnědl růstový vrchol).

Rostliny z nádoby č. 4 byly také zchlazeny a přesazeny, avšak žádná nevyrašila.

4.1.4 Přenos semenáčků *ex vitro*

Přenos do květináčků na přirozený substrát tvořený Rockwoolem jsem provedl 23.9.2003 (2 roky po výsevu) po předchozím zchlazení kultur (od 11.7.2003).

Šest nejvyspělejších rostlin mělo listy dlouhé průměrně 4 cm a 2 – 3 kořeny průměrné celkové délky 4 cm na rostlinu. Ostatní rostliny měly list od 5 do 2 cm a žádný až dva kořeny do 1 cm délky.

2.10.2003 (2. týden) Minimálně u 3 semenáčků se aktivoval růst listu, který se založil již *in vitro*. Starší listy blednou a usychají.

15.10.2003 (4. týden) V květináčku je 16 zelených semenáčků. 23.11.2003 přeneseno do teplejší místnosti, přisvětlováno.

Během zimy U 4 semenáčků začínají vyrážet nové listy.

Rok 2004 Naživu 5 rostlin, staré listy z kultury *in vitro* usychají, růst nových listů je extrémně pomalý.

Jaro 2005 Listy 5 živých rostlin mají délky 1,5 – 2 cm, povrch substrátu je pokryt mechem (70%) a játrovkami (5%).

Úspěšnost přenosu byla 14% počítáme-li celkový počet semenáčků 34. Uvažujeme-li jen nejvyvinutější, dosahuje úspěšnost až 80%.

4.2 Srovnávací výsevy orchidejí

4.2.1 Výsev prstnatce májového, vemeníku a pětiprstky

U prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) a pětiprstky žežulníku (*Gymnadenia conopsea*) jsem zaznamenal nejvýše bobtnání semen. Ke klíčení nedošlo.

U vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*) se pravděpodobně na podzim po výsevu vyvinul v kultuře 1 vřetenovitý útvar délky 0,5 cm pokrytý kořenovým vlášením a se základem listu (asi). Brzy však zhnědl.

4.2.2 Výsev prstnatce Fuchsova

10.9.2003 (32. den) Výsev je *ve tmě*, vyklíčilo asi 20 semen.

23.11.2003 (15. týden) 100 vyklíčených protokormů, bílé, protáhlé, raší kořenové vlásy. V prosinci přeneseno *na světlo* zářivky.

7.3.2003 (31. týden) Celkem vyklíčilo asi 200 protokormů, část zhnědla. Největší protokormy již měly první list (vyvíjel se od ledna). Celková délka protokormů včetně listu dosahuje až 1 cm.

4.3 Růst semenáčků prstnatce Fuchsova

4.3.1 Průběh růstu

Přesazení proběhlo 7.3.2003. Další kultivace probíhala na světle, v teple.

Rostliny byly 13 – 16 hodin denně přisvětlovány až do zchlazení v průběhu zimy 2004/2005. Spektrum používané úsporné zářivky, které jsem změřil k tomuto účelu zhotoveným spektroskopem, je nespojité. Skládá se z ostré fialové čáry $\lambda \approx 400$ nm, slabého modrozeleného pásu u 510 nm, výrazného zeleného dubletu $\lambda \approx 550$ nm a dvou intenzivních sérií s hranami $\lambda \approx 580$ nm (žlutá) a $\lambda \approx 700$ nm (červená). Přisvětlování rostlinám svědčilo, neboť měly svěže zelené listy.

Vývoj kultur zachycuji v tabulce 12.

Tab. 12: Růst semenáčků prstnatce Fuchsova na různých půdách

Nádoba	16.5.2004			12.8.2004			28.9.2004			27.3.2005		
	Počet živých semenáčků	Průměrná délka listu	Kořeny	Průměrná délka listu	Průměrná délka kořene	Zhnědlé semenáčky (%)	Průměrná délka listu	Kořeny	Zhnědlé semenáčky (%)	Průměrná délka listu	Kořeny	Zhnědlé semenáčky (%)
0-	20	0,6	+	1,0	++	20	*	*	*	6,4	+	60
0+	10	0,2	0	0,7	+	10	0,9	+	10	2,1	+++	10
1-	25	0,4	0	0,7	+	12	0,9	+	25	3,0	+	80
1+	12	0,8	+	1,1	+	0	1,2	++	9	2,3	++	30
2-	9	0,5	+	1,2	++	0	1,4	+++	33	7,5	+++	90
2+	10	0,6	+	1,4	++	14	1,8	+++	20	3,5	++	80
3-	15	0,5	+	1,2	+	50	*	*	*	4,5	++	93
3+	8	0,7	0	1,1	+	0	1,2	++	0	2,2	+++	12
4-	13	0,5	+	1,0	++	25	*	*	*	4,0	+++	92
4+	8	0,6	+	1,4	++	0	2,3	+++	0	4,0	+++	20

V kolonce kořeny označuje + slabě vyvinutý kořenový systém
 ++ středně vyvinutý kořenový systém
 +++ velmi vyvinutý kořenový systém.

Pozorování nahrazená * nebyla provedena, nádoby byly kvůli hnědnutí umístěny v lednici.

Z pozorování zřejmě vyplývá, že největší podíl hnědnutí nastal v nádobách se řidší půdou (označení -).

Větší obsah sacharosy urychloval růst listu a kořenů a rostliny byly celkově silnější. Semenačky vyvinuté na půdách s menším množstvím sacharosy byly spíše chabé, s tenkými, někdy dlouhými listy. V průměru měly rostliny 1 – 3 kořeny délky do 3 centimetrů. Většina kořenů rostla nad živnou půdou, živiny byly přijímány pouze kořenovými vlásky. Často jsem dokonce pozoroval, že kořeny rostly vzhůru, téměř rovnoběžně s listy. Nejvyvinutější rostlina vyrostla v nádobě 2-, měla list délky 7,5 cm tvaru shodného s listem dospělé rostliny (plochý, skvrnitý), ostatní listy byly svinuté, válcovité a neskvřité.

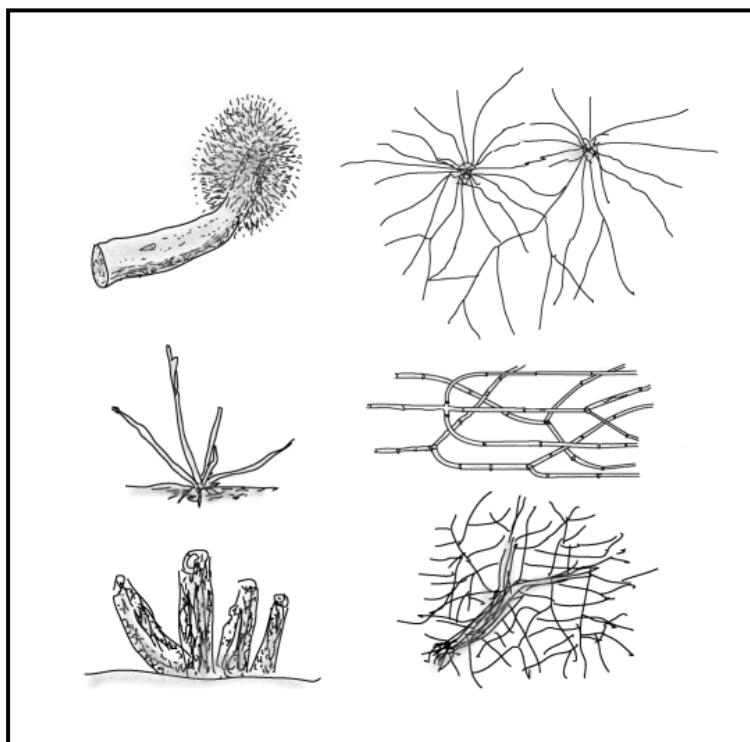
Zajímavým jevem, který jsem pozoroval ve všech nádobách, byla proliferace 5 – 10 % protokormů. Ty se samovolně vegetativně rozdělily na shluky 3 –12 nových protokormů, které se poté dále vyvíjely běžným způsobem. Výjimečně se takovýto shluk oddělil i od větších semenáčků, které již měli vyvinutý list. Proliferované rostliny jsem nezahrnoval do průměru.

4.4 Vliv desinfekce na klíčení prstnatce májového

4.4.1 Klíčení prstnatce májového

Do 27.3.2003 nedošlo zatím ke klíčení.

4.5 Kultivace symbiotických hub



Obr. 5: Počátek růstu mycelia z kořene, útvary vytvořené hyfami (vlákna a válce), mikroskopická struktura „bílé“, „červené“ a „černé“ houby (podobné měřítko).

4.5.1 Růst hub

- 9.8.2003 (0. den) Očkování kultury.
- 13.8.2003 (4. den) Okolo kořenů se rozšiřuje mléčný zákal, pravděpodobně bakteriální kolonie.
- 18.8.2003 (9. den) Okolo kořenů 1₅ (nádob 1, desinfekce 5 s) bělolesklý povlak vzhledu „kondenzovaného mléka“.
Okolo 1₃₀ suché podhoubí žlutě až hnědě naběhlé
V nádobě 2 pouze bakterie.
Nádob 3 kontaminována, asi *Penicillium* sp. Infekce však nejspíše nepochází z kořenů, neboť plíseň vyrůstá současně po celém povrchu agarů.
- 10.1.2004 (5. měsíc) 4₃, 4₆₀, 4₉₀, 5₆₀ – začíná růst hub (bílé chomáčky)
Houby v podobě bílých až šedých vláknitých mycelií porostly celý povrch agarů. Jednotlivá mycelia se makroskopicky odlišují barvou agarů pod podhoubím (projevuje se u starých mycelií v rozkladu).
1₅ – „červená“ houba, 1₃₀ – „černá“ houba.
2 – bez houby, 3 kontaminováno (zelenočerné výtrusnice).
4₃₀ – „bílá“, 4₆₀ „červená“, 4₉₀ „černá“.
5 – místy pokryto „bílou“ houbou, silný bakteriální zákal.
1₅, 1₃₀, 4₃₀, 4₆₀, 4₉₀ přeočkováno podle druhu houby do 3 nových Petriho misek.
Během roku 2004 houby porostly celé misky. „Bílá“ houba vytvořila z vláken uprostřed misky kopec o průměru 3 cm, z mycelia „červené“ houby vyrostly vzhůru bílé huňaté válce tlusté 3 mm a z „černé“ svazky hyf dlouhé 1 cm.

4.5.2 Struktura hub

Všechny pozorované útvary byly složeny pouze z vláken, žádná houba nevytvořila výtrusné orgány.

Hyfy hub jsem pozoroval mikroskopem, „červená“ houba má silná větvená vlákna, „bílá“ má tenká tvořící shluky a „černá“ má hustě propletená vlákna o trochu silnější než u „bílé“ houby (obr. 5).

5 Diskuse

Od roku 2001 jsem provedl celkem tyto experimenty:

- Výsev prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) ukončený přenosem semenáčků na přirozený substrát.
- Srovnávací výsevy prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*), prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), pětiprstky žežulníku (*Gymnadenia conopsea*) a vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*) na shodná média.
- Srovnání růstu semenáčků prstnatce Fuchsova na půdách s různým obsahem sacharosy a agaru.
- Výsev prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), zjištění vlivu desinfekce na klíčení.
- Kultivace symbiotických hub prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*).

Výsevy prstnatce Fuchsova

Prstnatec Fuchsův vykazoval v obou pokusech vysokou klíčivost. V prvním výsevu semena vyklíčila 130 dnů po výsevu a celkem jsem získal 60 semenáčků z 12 tobolek. Ve druhém výsevu klíčila semena již po 30 dnech a ve výrazně větším množství, celkem 200 protokormů ze 14 tobolek. Zpoždění klíčení v prvním případě zřejmě způsobilo přenesení výsevu na světlo, které klíčení inhibuje. Dalšími faktory mohlo být složení půdy (v prvním případě sacharosa 20 g/l, ve druhém sacharosa a glukosa po 10 g/l), odlišné stáří a vyvinutost semen a podobně. Podobné výsledky s klíčením prstnatce Fuchsova uvádí i VEJSADOVÁ (1997). Pozorovala dobré klíčení tohoto druhu od 8. – 12. týdne neohledně na druh sterilizace (10% NaOCl či 7% Ca(OCl)₂).

Vzhledem k objemu provedených experimentů však není možné vyvozovat z výsledků těchto výsevů žádné hlubší závěry.

Výsevy ostatních druhů

Výsledky všech ostatních výsevů byly veskrze negativní. Kromě jednoho semenáčku vemeníku, který však uhynul, nedošlo ke klíčení. Neúspěch těchto výsevů je zvláště pozoruhodný ve srovnání s poměrně dobrými výsledky výsevů prstnatce Fuchsova.

Možnou příčinou nezdaru u pětiprstky žežulníku mohla být nadměrná desinfekce semen, neboť jsou menší než u ostatních druhů. Nízké procento naklíčených semen podobně popisuje VEJSADOVÁ (1997), naopak MICHL (1988) řadí pětiprstku mezi dobře klíčící druhy.

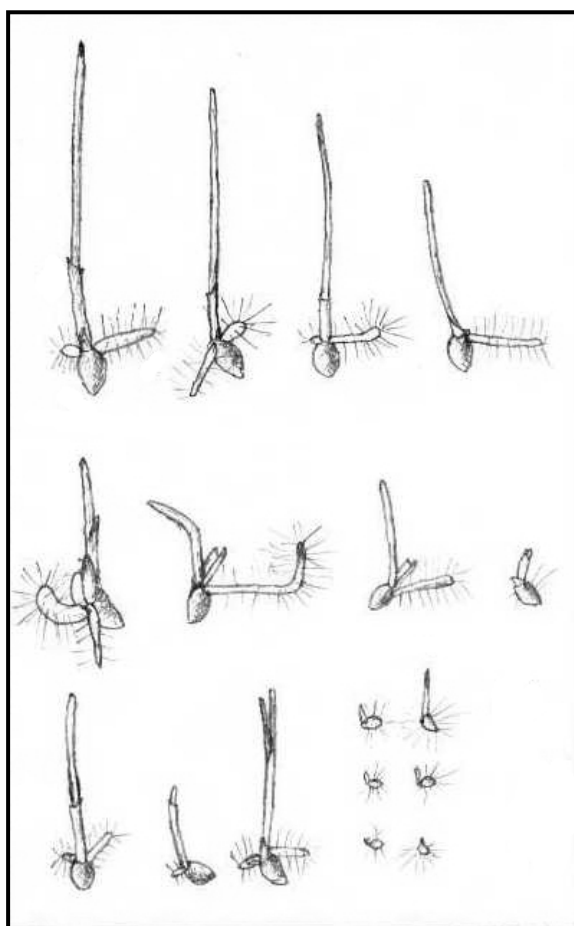
U vemeníku jsem vysel malé množství poměrně nezralých semen, což mohlo způsobit nepatrné klíčení.

Co se týče výsevů prstnatce májového, můžeme jako negativní označit zatím pouze první výsev z roku 2003. U druhého výsevu, kdy jsem zkoušel vliv desinfekce, není

zatím možné klíčení vyloučit. Michl uvádí, že ke klíčení může dojít i až 1 rok po výsevu. Neúspěch při prvním výsevu by bylo možné zdůvodnit použitím převážně zralých semen. Michl vysledoval velmi výrazný pokles klíčivosti, porovnával-li zralá semena se semeny ve 2/3 zralosti a to i u dobře klíčících druhů, jako je prstnatec májový.

Jako další příčinu negativních výsledků klíčení by bylo možné uvažovat použití čerstvých semen. Například LÁTALOVÁ (2000) úspěšně vysévala semena po předchozím vysušení a tříletém zmrazení.

V neposlední řadě mohlo být faktorem ovlivňujícím životaschopnost semen počasí během vegetační sezóny. Zvláště léto roku 2003 bylo velmi suché, což bylo na lokalitách, kde jsem prováděl sběry semen, dosti patrné. Zde by šlo také najít rozdíl mezi prstnatcem Fuchsovým a ostatními druhy, neboť ten rostl na lesní bažince a nebyl suchem příliš postižen.



Obr. 6: Semenáčky prstnatce Fuchsova

Růst semenáček in vitro a přenos na přirozený substrát

V pokusech jsem zaznamenal poněkud pomalejší růst, než uvádí Michl a ostatní autoři. Důvodem je zřejmě absence růstových stimulátorů v mých médiích. Po kultivaci semenáček z výsevu *in vitro* dosahoval list průměrné délky 4,4 cm a semenáčky měly vyvinuté až tři kořeny, které byly již u většiny vyspělejších semenáček na bázi hlízovitě

ztlustlé. Kultury byly dvakrát přeneseny do chladu a tmy k navození zimního období. Je zajímavé, že i v chladu růst stále pokračoval a listy zůstaly zelený.

Během kultivace jsem se setkal také s hnědnutím semenáčků. Jako možnou iniciační příčinu jsem potvrdil působení slunečního záření, neboť nádoby s postiženými rostlinami nebyly dokonale zastíněny. Dále jsem zjistil, že jsou-li částečně zhnědlé rostliny okamžitě přesazeny a přeneseny do chladu, mohou být zachráněny, avšak úspěšnost není velká.

Dva roky po výsevu jsem celkem 34 rostlin přenesl do sterilizované čedičové vaty Rockwool postupem dle doporučení dr. Baláže. Po přenosu byla kultura uchovávána 2 měsíce v chladné místnosti při vlhkosti 100%. Uvažujeme-li pouze silné semenáčky vhodné k převodu *ex vitro*, dosáhlo přesazování úspěšnosti 80% (přežilo 5 semenáčků z šesti nejsilnějších). Růst přesazených rostlinek je však velmi pomalý, pravděpodobně by bylo vhodné vsadit nyní rostliny do úživnějšího substrátu, například do půdy z lokality (substrát připravený z Rockwoolu neobsahuje žádnou organickou složku).

MICHL (1988) doporučuje přenášet rostliny výhradně k mateřským rostlinám, které pěstujeme v květináči a které zajistí semenáčkům infekci symbiotickou houbou. Při vysazení rostlin do čistého substrátu pozoroval téměř kompletní úhyn a zbylé semenáčky živořily. V mém experimentu byla úspěšnost přenosu i bez použití mateřské rostliny poměrně velká. Významný vliv zřejmě má udržování rostlinek ve stálém vlhku a počáteční aseptičnost substrátu (Baláž, ústní sdělení), živoření se ovšem potvrzuje. Výhodou realizované metody přenosu je, že nepotřebujeme odebírat z přírody dospělé rostliny, které jsou vzácné. Ukazuje se ale nutnost pozdější infekce semenáčků, což by mohla zajistit půda z lokality, nebo přídavek čisté kultury symbiotické houby. Obě možnosti se pokusím prověřit.

Srovnání růstu semenáčků prstnatce Fuchsova na různých médiích

Vykličené protokormy z druhého výsevu prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) jsem rozsadil do 10 nádob s obsahem sacharosy od 0 do 20 g/l (základem všech půd byla glukosa 10 g/l) a větším (22 g/l) či menším (7,5 g/l) obsahem agaru. Sledoval jsem rychlost růstu a hnědnutí. Rostliny jsem nechal v nádobách delší dobu, aby se hnědnutí dostatečně projevilo. (Jinak je vhodné kultury po prvních náznacích hnědnutí přesadit, stará půda postupně ztrácí redukční účinky oxidováním kyseliny askorbové.)

Po roce se zřetelně projevilo větší procento hnědnutí na řidší půdě. Důvod vidím ve větším ponoření kořenového systému v agaru, který se takto špatně okysličuje. V příštích experimentech zkusím vliv přídavku porézních struktur do média (např. jemný křemenný písek), které by jeho fyzikální vlastnosti přiblížily skutečné půdě.

Sacharosa se projevila zrychlením růstu semenáčků, které byly také celkově vyvinutější, výsledek však není zcela jednoznačný. Podobně jsem nevysledoval zcela jednoznačný vliv sacharosy na hnědnutí, byl by potřeba větší objem experimentů.

Pozitivně na růst semenáčků působilo také umělé přisvětlování úspornou zářivkou.

Kultivace hub

Experimentem zabývajícím se kultivací mykorhizních hub z kořenů prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) jsem chtěl zjistit ideální způsob desinfekce výchozího

materiálu. Srovnával jsem použití roztoku $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ nasyceného 22% až zředěného na 7% a jeho působení od 5 do 120 sekund. Hyfy hub se začaly vyvíjet již po týdnu, celkem jsem vypěstoval tři různé druhy hub, prstnatec Fuchsův má tedy i na jedné lokalitě více symbiontů (kořeny byly odebrány z několika rostlin). K růstu hub došlo jak po použití nízké tak vysoké koncentrace. Jednoznačný vliv desinfekce nalezen nebyl. Použití síly desinfekce v uvedeném rozpětí vede k úspěšné kultivaci hub které mohou být dále využity při experimentech s orchidejemi (symbiotický výsev, přenosy semenáčků *ex vitro*).

Celkové závěry

Prstnatec Fuchsův (*Dactylorhiza fuchsii*) lze relativně úspěšně vysévat v jednoduchých podmínkách s minimálními náklady. Výsevy ostatních druhů, prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), pětiprstky žežulníku (*Gymnadenia conopsea*) a vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*) však úspěšné nebyly. Jednoznačné příčiny není možné stanovit pro malý objem experimentů, který je mimo jiné limitován malým množstvím rostlin v přírodě. Na výsledcích pokusů se komplexně podílí soubor mnoha různých faktorů, jejich zkoumání bude náplní práce dalších let.

Při sledování růstu semenáčků jsem zjistil stimulující vliv nízké koncentrace agarů v živné půdě na hnědnutí rostlin. Sacharosa podporovala celkový růst semenáčků. Průkaznost experimentu však není příliš velká jak z důvodu rozsahu pokusu, tak pro jeho nestandardnost (například nedefinovatelné složení minerálního hnojiva Hydroponex...).

Dále jsem realizoval přenos semenáčků *ex vitro* na substrát bez mykorhizní houby, který byl úspěšný, následný růst rostlin byl však pomalý. Čistá minerální plst' Rockwool zřejmě neposkytuje rostlinám dostatek živin.

Nakonec se mi podařilo kultivovat několik druhů mykorhizních hub z kořenů prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*).

Asymbiotický výsev představuje možnost množení a potažmo záchrany druhů orchidejí ohrožených vyhynutím. Výsledky, především ve srovnání s náročností a nákladností postupů, však zatím nejsou dostatečné, a proto se nejproduktivnějším způsobem záchrany orchidejí stále jeví důsledná ochrana a řízená údržba stávajících lokalit, neboť na jejich vzniku se často lidská ruka podílela a k jejich udržení je tedy nezbytná.

6 Právní ošetření pokusu

Všechny druhy, se kterými jsem pracoval, jsou podle zákona č. 114/1992 Sb. řazeny mezi zvláště chráněné druhy rostlin v kategorii ohrožené. Sběr semen a ostatní zásahy týkající se těchto rostlin jsou zakázány ustanovením § 49 zákona č. 114/1992 Sb.

Výjimky z ochrany zvláště chráněných rostlin povoluje Ministerstvo životního prostředí ČR, týkají-li se silně či kriticky ohrožených druhů. U druhů ohrožených má tyto pravomoci referát životního prostředí okresního úřadu, respektive dnes příslušný odbor krajského úřadu nebo správa CHKO, nalézají-li se druh na jejím území.

Po prostudování příslušných zákonů jsem zažádal o příslušná povolení, jejichž kopie přikládám. Sběr materiálu na lokalitách jsem prováděl s ohledem na početnost populace co možná nejšetrněji, aby nebyly poškozeny rostliny ani omezena možnost jejich reprodukce.

7 Literatura

Bibliografické odkazy uvedené v textu KAPITÁLKAMI odkazují na níže uvedenou literaturu, odkazy psané normálním písmem označují převzaté citace z níže uvedené literatury .

BURGEFF H. (1954): Samenkeimung und Kultur europäischer Erdorchideen. Stuttgart.

BUSINSKÝ R. (1989): *Dactylorhiza bohemica* – nový druh nalezený v severních Čechách. In: Preslia, Praha, 61: 289 – 314.

DUŠEK J., KŘÍSTEK J. (1986): Orchideje. Praha.

HOFFMANNOVÁ E. (1993): Don Benito. Praha.

JEŽEK Z. (1996): Na lovu mexických orchidejí. Brno.

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

MICHL J. (1988): Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny. Živa, 36: 51 – 52, 89 – 91, 131 – 133.

NOVÁK F. J. (1990): Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Praha.

OREMUS P. A. I., OTTEN H. (1981): Succession and nodulation in *Hippophae rhamnoides*. In: Plant and Soil, Boston, 63(3): 317 – 331.

PROCHÁZKA F., VELÍSEK V. (1983): Orchideje naší přírody. Praha.

PROCHÁZKA S. et al. (1998): Fyziologie rostlin. Praha.

VEJSADOVÁ H. (1997): Klíčivost semen terestrických orchidejí v aseptických podmínkách. In: Kindlmann P. Populační dynamika a ekologie terestrických orchidejí. České Budějovice, 49 – 54.

VLAŠÍNOVÁ H. (1990): Ještě jednou výsevy orchidejí. Živa 38: 58 – 59.

ZICHOVÁ M. (2000): Sezónní rozvoj mykorrhizního mimokořenového mycelia asociovaného se třemi druhy hlíznatých mediteránních orchidejí. Diplomová práce, Masarykova univerzita v Brně. Brno, 1 – 12.

8 Přílohy

Příloha 1: Počasí léto 2003

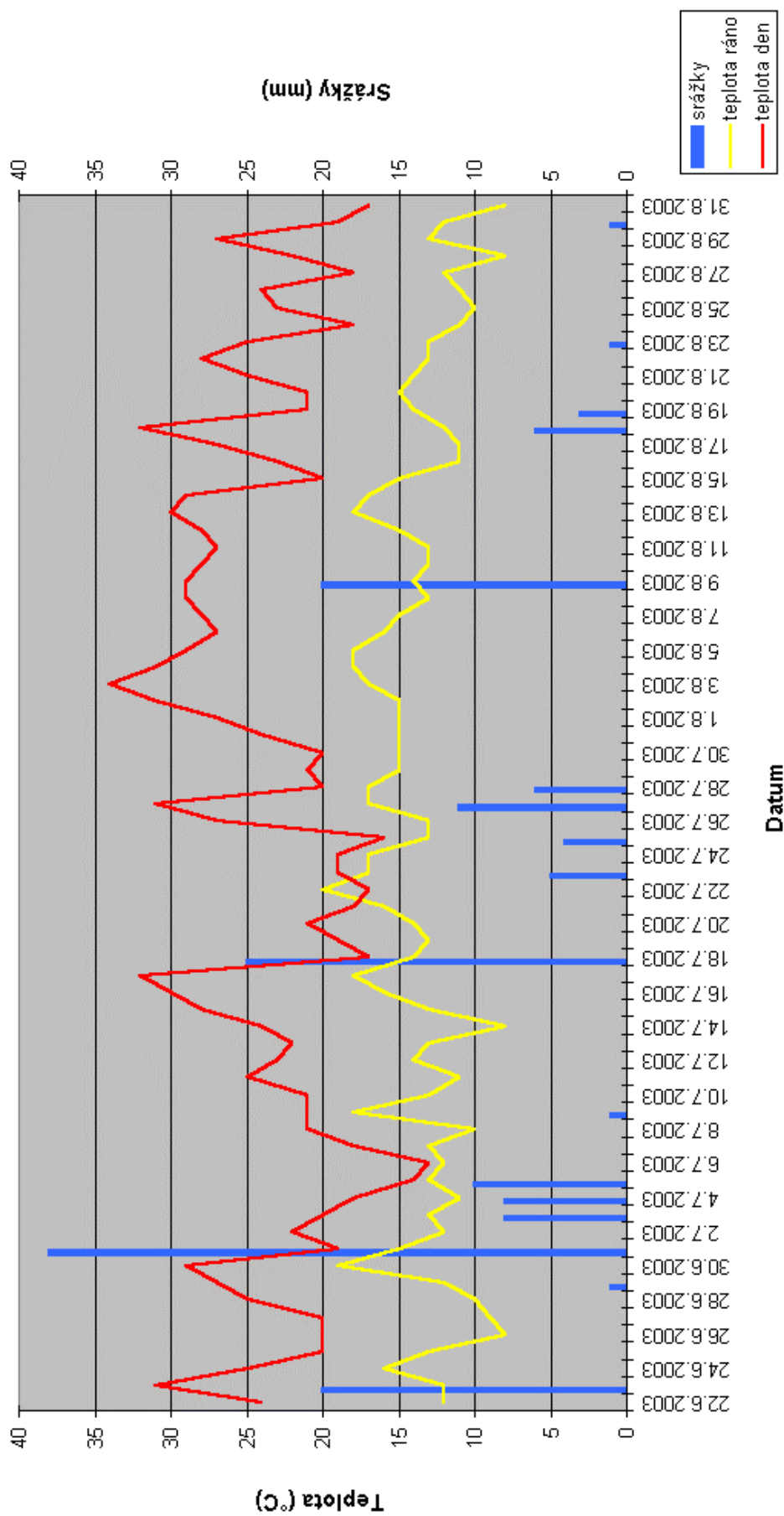
Příloha 2: Počasí podzim, zima 2003/2004

Příloha 3: Počasí jaro, léto 2004

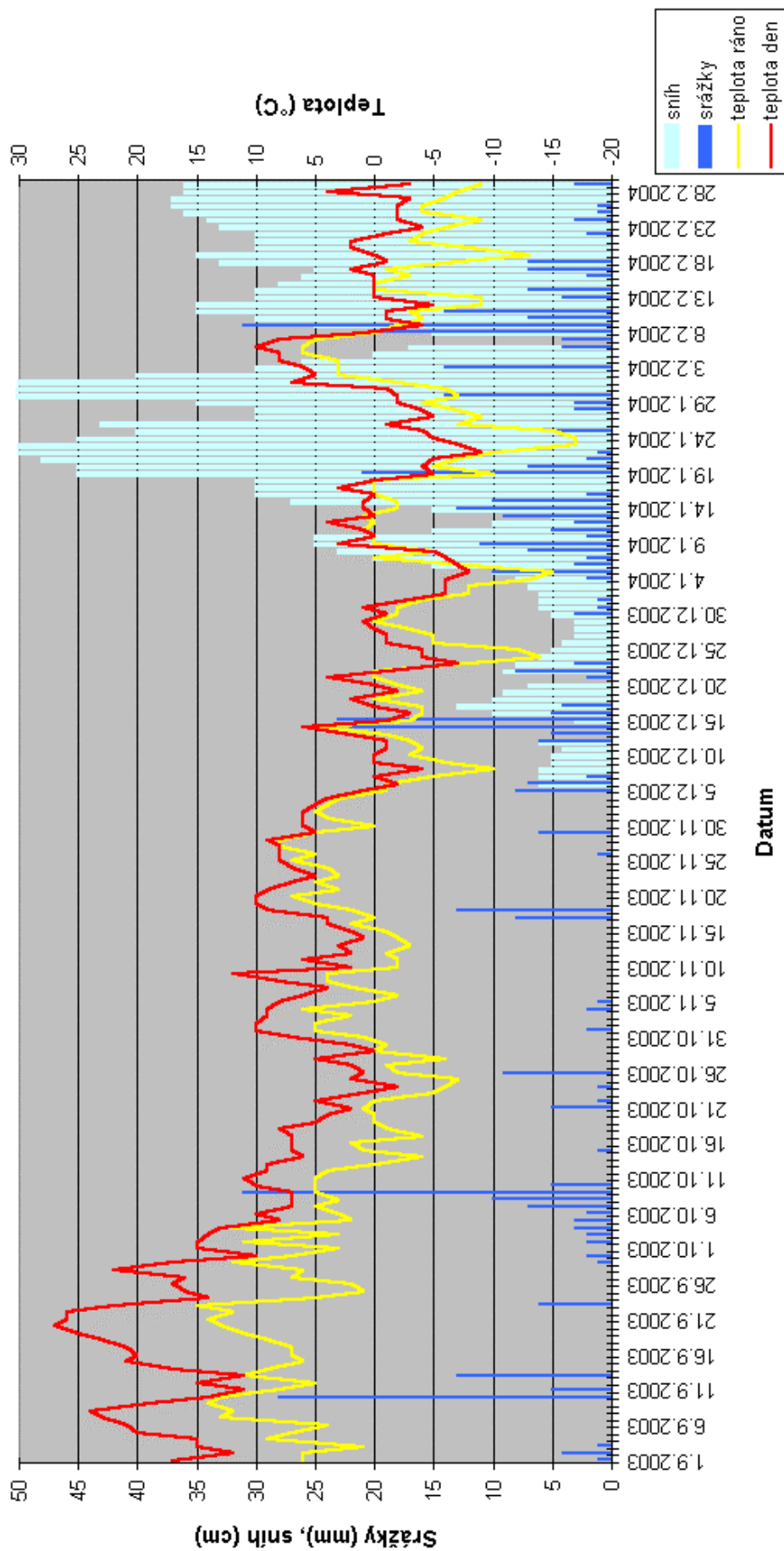
Údaje byly měřeny v Jablonci nad Nisou 50°43'33'' sš. 15°9'37'' vd.
520 m n. m. Přístroje byly umístěny na budově ve výši 40 m.

Příloha 5: Semenáčky prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*)

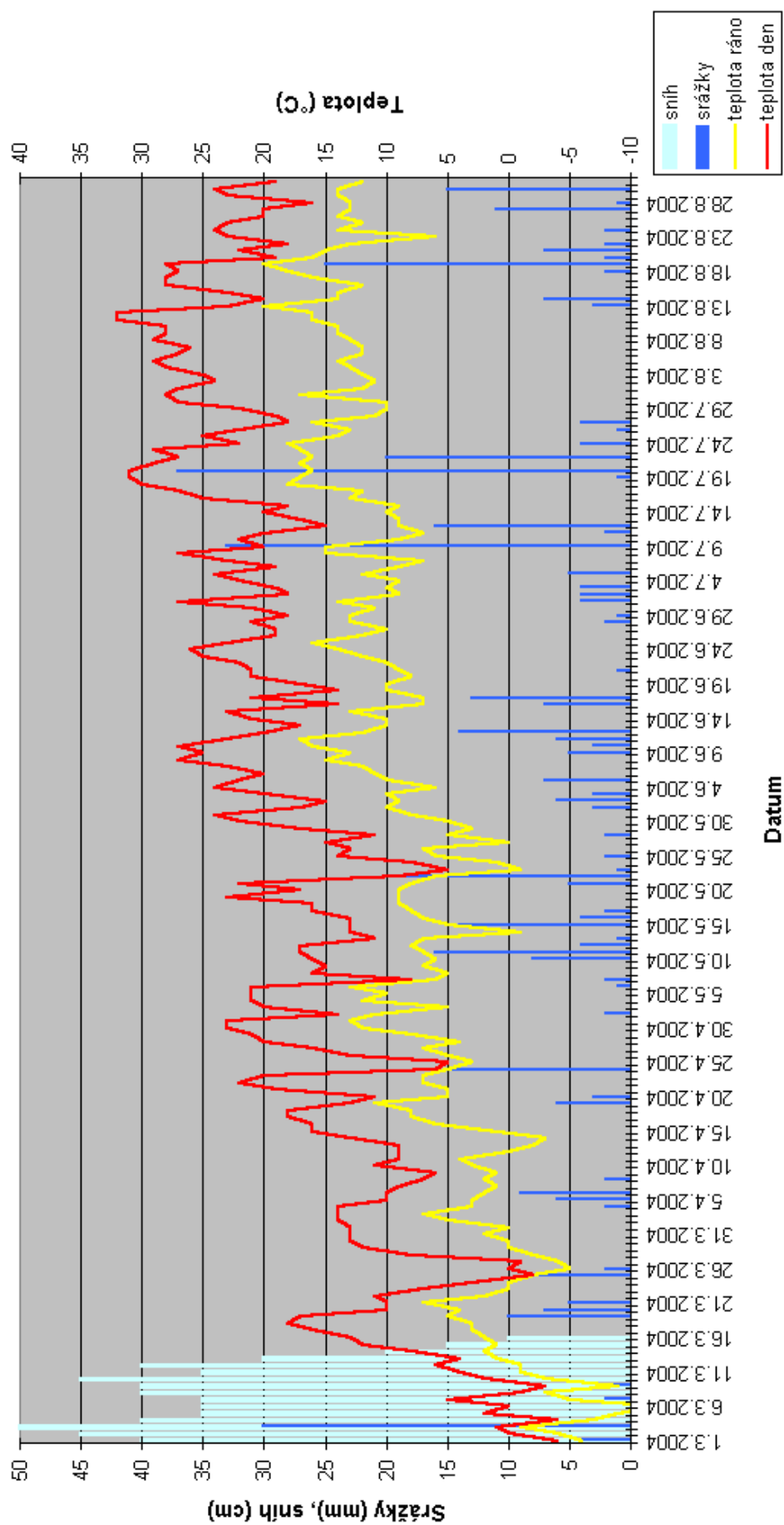
Příloha 1: Počasí léto 2003



Příloha 2: Počasí podzím, zima 2003/2004



Příloha 3: Počasí jaro, léto 2004



Příloha 4: Semenáčky prstnatce Fuchsova

