

N_{met} - METODIKA

**Metodika rozmnožování orchidejí rodů *Anacamptis*, *Ophrys* a *Serapias* asymbiotickým
výsevem *in vitro***

RNDr. Jan Ponert, Ph.D.

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin

červen 2019



*Metodika rozmnožování orchidejí rodů Anacamptis, Ophrys a Serapias asymbiotickým
výsevem in vitro*

Tato metodika byla vypracovaná na Katedře experimentální biologie rostlin PřF UK v rámci projektu MŠMT Centrum experimentální biologie rostlin UK (NPU: LO 1417).

Autor:

RNDr. Jan Ponert, Ph.D.

ponert@natur.cuni.cz

Oponenti:

Mgr. Ing. Pavel Trávníček, Ph.D. (Botanický ústav AV ČR, v.v.i.)

RNDr. Petr Soudek, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.)

ISBN 978-80-7444-067-0

Obsah

1.	Úvod.....	3
2.	Cíl metodiky.....	5
3.	Stručný popis metodiky.....	5
4.	Detailní popis metodiky	5
4.1.	Potřebné přístrojové vybavení.....	5
4.2.	Potřebné materiálové vybavení.....	6
4.3.	Sběr semen	7
4.4.	Skladování semen před výsevem	7
4.5.	Složení kultivačních médií.....	7
4.6.	Příprava kultivačních médií.....	8
4.7.	Příprava roztoku chlorového vápna	8
4.8.	Výsev semen	9
4.9.	Kultivace po výsevu <i>in vitro</i>	10
4.10.	Převod semenáčů do podmínek <i>ex vitro</i>	11
4.11.	Časový harmonogram	12
5.	Srovnání novosti postupů	12
6.	Popis uplatnění certifikované metodiky	12
7.	Ekonomické aspekty.....	13
8.	Seznam použité související literatury.....	13
9.	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	14
10.	Jména oponentů	14
11.	Dedikace.....	14

1. Úvod.

Naprostá většina rostlin je po celý život autotrofní. Orchideje jsou neobvyklé tím, že jejich časná vývojová stádia jsou heterotrofní a energii ani uhlík si neumí obstarat samy z neživé přírody. Semena orchidejí jsou extrémně malá a patří mezi nejmenší semena na světě vůbec (Arditti et Ghani, 2000; Rasmussen et Rasmussen, 2009). Jejich jedinou živou částí je vlastní zárodek (embryo) a semena neobsahují žádná diferencovaná zásobní pletiva. Drobná semena orchidejí proto obsahují jen velice malé množství zásobních látek, které nestačí k tomu, aby mohl zárodek vytvořit autotrofní pletiva. Zásobní látky v semenech mohou zpravidla zajistit výživu pouze během vlastního klíčení. Po vyklíčení se embryo vyvíjí ve speciální útvar, tzv. protokorm, který je alespoň ve svých časných fázích vývoje plně heterotrofní (Bernard, 1909; Yeung, 2017). Zatímco u epifytických druhů orchidejí začínají fotosyntetizovat často již starší protokormy, u terestrických druhů jsou protokormy často celou dobu života nezelené a rostou pod zemí. Tato fáze protokormu může u některých druhů orchidejí trvat i značně dlouhou dobu, v řádu let (Rasmussen, 1995). Později z protokormu vyrůstá první prýt a kořeny.

V přirozených podmínkách jsou mladé heterotrofní orchideje závislé na mykorhizní symbióze se specifickými houbami (Peterson et al., 1998; Vij et al., 2002). Ze svých symbiotických hub získávají veškerou potřebnou výživu a díky tomu mohou vyrůst ze semen v zelené rostliny. V umělých podmínkách je však ustavení funkční symbiózy poměrně náročné. Ke komerčním účelům se proto orchideje rozmnožují takřka výhradně umělou cestou bez symbiotických hub. Semena se vysévají do axenických podmínek *in vitro* na speciální živná média, která mladým orchidejím poskytnou všechny potřebné látky namísto symbiotických hub (Arditti, 1984; Yam et Arditti, 2017). Semena orchidejí je před výsevem nutné dobře desinfikovat. Pokud se totiž na médium dostanou zárodky jiných živých organismů, nejspíše agresivně porostou a zahubí orchideje (tzv. kontaminace).

Celý tento postup tzv. asymbiotického výsevu *in vitro* má řadu úskalí a je nezbytné jej optimalizovat pro každý druh či skupinu příbuzných druhů. Prvním problémem je dormance semen. Mnoho druhů orchidejí vyžaduje specifické ošetření semen, které naruší jejich dormanci. Častým problémem je to, že semena orchidejí mají silně vyvinuté osemení, které brání průniku vody dovnitř semene a tím také klíčení. Pro úspěšné axenické vyklíčení semen je proto nutné narušit osemení tak, aby průnik vody umožnilo. V praxi se osemení rozrušuje

působením agresivních roztoků – zpravidla stejných, jaké se používají k desinfekci semen před výsevem. Jeden krok celého výsevu nazývaný většinou jednoduše souslovím „desinfekce semen“ tedy zajišťuje dvě zcela odlišné potřeby: vlastní desinfekci semen a rozrušení osemení (Arditti, 1967, Rasmussen, 1995; Yam et Arditti, 2017).

Druhým problémem je nalezení správných kultivačních podmínek pro protokormy a starší semenáče orchidejí. Různé druhy orchidejí vytvářejí mykorhizní symbiózu s různými houbami a je pravděpodobné, že podle toho mají různé nároky na kultivační médium, které houbu v axenické kultuře nahrazuje. Kultivační médium, které vyhovuje jedné orchideji, může být pro jiný druh zcela nevhodné. Navíc se často liší nároky mladých protokormů a starších semenáčů. Pro klíčení a mladé protokormy jsou často vhodná jednodušší a méně koncentrovaná média než pro starší rostliny. Kultivační podmínky však nesestávají pouze ze samotného média, ale důležitá je také teplota, osvětlení a větrání kultur.

Třetím a mnohdy nejtěžším problémem je převod semenáčů z kultury *in vitro* do hrnkové kultury ve skleníku. Zde se nároky některých orchidejí liší zcela diametrálně. Většinou je klíčové převádět dobře narostlé semenáče ve správné vývojové i růstové fázi. Samotný kultivační substrát vhodný pro zasazení semenáčů *ex vitro* bývá odlišný od toho, který vyhovuje dospělým rostlinám. *Ex vitro* semenáče jsou zvyklé na vysokou vlhkost a zpravidla vyžadují jemnější a vlhčí substrát než dospělé rostliny.

Vypracování dobře fungujícího postupu rozmnožování konkrétních orchidejí výsevem *in vitro* je tedy značně komplexní záležitost. Optimalizace celého postupu zpravidla trvá roky a obecně platí, že terestrické druhy jsou na optimalizaci obtížnější než epifytické. Potup rozmnožování výsevem je dobře zpracovaný pro běžně prodávané epifytické druhy, jako jsou například *Cattleya*, *Oncidium* či *Phalaenopsis*. Pro drtivou většinu méně pěstovaných druhů ale postup optimalizován nebyl a mnoho terestrických druhů takto rozmnožovat vůbec neumíme (Rasmussen, 1995; Yam et Arditti, 2017). Jednou ze skupin orchidejí, které jsou rozmnožovány jen vzácně a s nejistými výsledky, jsou také mnohé evropské terestrické orchideje. Často se přitom jedná o nápadné druhy s potenciálem pro využití v komerčním zahradnictví. Zároveň je řada druhů orchidejí ohrožená a umělé rozmnožování by mohlo pomoci k jejich záchraně. V této práci jsme se proto zaměřili na vypracování efektivního způsobu rozmnožování třech příbuzných rodů středomořských orchidejí.

2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je představit efektivní způsob rozmnožování středomořských orchidejí rodů *Anacamptis* Rich., *Ophrys* L. a *Serapias* L. asymbiotickým výsevem *in vitro*.

3. Stručný popis metodiky

Rostliny jsou kultivovány asymbiotickým výsevem *in vitro*. Zralá vysušená semena jsou desinfikována v injekčních stříkačkách s filtrem vyrobeným z nylonové síťoviny. Po desinfekci je suspenze semen ve sterilní vodě vytlačována do sterilních kultivačních nádob na povrch kultivačního média ER1/4-2A ztuženého agarem. Misky jsou kultivovány ve tmě a stálé teplotě. Starší rostliny jsou přesázeny na médium BM-2b a po založení prvních prýtů jsou kultury umístěny na světlo. Po vytvoření hlíz a kořenů jsou rostliny v zimě přesazovány do květináčů ve skleníku.

4. Detailní popis metodiky

4.1. Potřebné přístrojové vybavení

pH metr

Autokláv (parní tlakový sterilizátor)

Poloautomatické pipety

Zařízení na výrobu demineralizované vody

Mikrovlnná trouba (pro zahřívání média)

Flow-box (box pro sterilní práci)

Kultivační místnost se stálou teplotou + 20 až 23°C umožňující kultivaci ve tmě

Kultivační místnost se stálou teplotou + 12 až 13°C umožňující kultivaci na světle (krátký den 8 /16 hodin; ozáření cca 100 W m⁻²).

Kahan

4.2. Potřebné materiálové vybavení

Papírové sáčky

Plastové jednorázové injekční stříkačky objemu 3 nebo 5 ml (Luer lock).

Jednorázové sterilní jehly na injekční stříkačky průměru 1,2 a 1,8 mm (18Gx 1 1/2'', Luer-Lock; 15G x 1 1/2'', Luer-Lock).

Nylonová síť Uhelon (průměr ok cca 40 µm; např. UHELON 130 T)

Sterilní plastové petriho misky (průměr 9 nebo 6 cm)

Parafilm

Špičky na pipety

Chlorové vápno

Demineralizovaná či destilovaná voda (vodivost pod 0,3 µs/cm)

Filtrační papír

Filtrační nálevka

Smáčedlo Tween 20

Autoklávovatelné uzavíratelné nádoby (např. láhev se šroubovacím uzávěrem DURAN, 500 ml, 86 x 176 mm)

Čistý líh (70%)

Pinzety

Běžné laboratorní nádobí (kádinky, odměrné válce, baňky)

Cedník

Složky kultivačních médií uvedené v tabulkách č. 1 a 2.

4.3. Sběr semen

Sbíráme celé zralé tobolky a ukládáme je ihned do papírových sáčků. Sběr je nutné provádět za počasí bez deště, protože semena sbíraná za mokra následně silně kontaminují. Zcela ideální je sběr semen ze skleníkových kultur chráněných před deštěm. Sáčky umístíme do prostředí s pokojovou teplotou, kde mohou dobře vysychat. Chráníme je před přímým slunečním zářením.

4.4. Skladování semen před výsevem

Zralá semena skladujeme v papírových sáčcích v suchém prostoru se stálou teplotou +18 až +26°C. Před výsevem ze semen odstraníme zbytky tobolek i jiných částí rostlin (např. ručním přebráním pomocí pinzety).

4.5. Složení kultivačních médií

Pro postupy popsané v této metodice jsou potřeba dvě kultivační média, která byla vyvinuta pro tuto metodiku a jejichž složení je uvedeno v tabulkách č. 1 a 2 této metodiky: ER1/4-2A a BM-2b. Obě média jsou ztužena agarem v množství 7 g / l a pH je upraveno před autoklávováním na 5,7.

Tabulka 1: Složení kultivačního média ER1/4-2A.

celkový objem	1l
instantní médium „ER medium including vitamins“ (Duchefa, kat. č. E0208)	1 g
pangamin (běžně k dostání v lékárnách, např. Pangamin KLASIK, Rapeto)	0,45 g
Aminosteril N-Hepa 8% (Fresenius Kabi)	10 ml
ananasová šťáva (připravená vymačkáním z čerstvého ananasu – lze skladovat zmraženou při -20°C)	10 ml
sacharóza (např. Penta, kat. č. 24970-31000)	10 g
trehalóza (např. Duchefa, kat. č. T1395)	5 g
aktivní uhlí (např. Sigma-Aldrich, kat. č. C9157)	0,5 g
kinetin (např. Sigma-Aldrich, kat. č. K3378)	2 mg

Tabulka 2: Složení kultivačního média BM-2b.

celkový objem	1l
instantní médium BM-2 (Himedia, kat. č. PT064)	24,2 g
MES pufr (např. Duchefa, kat. č. M1503)	1 g
yeast extract (např. Duchefa, kat. č. Y1333)	1,4 g
aktivní uhlí (např. Sigma-Aldrich, kat. č. C9157)	0,5 g
kinetin (např. Sigma-Aldrich, kat. č. K3378)	0,5 mg

4.6. Příprava kultivačních médií

Připravíme si varnou nádobu, nalijeme do ní množství demineralizované vody odpovídající polovině plánovaného objemu média a postupně v ní rozpouštíme jednotlivé složky média za stálého míchání. Po rozpuštění všech složek (a dobrého rozmíchání aktivního uhlí) doplníme objem média na finálním hodnotu. Poté upravíme pH na hodnotu 5,7 a následně přidáme odvážené množství agarů. Po přidání agarů médium krátce povaříme zahříváním v mikrovlnné troubě a důkladně zamícháme. Médium ER1/4-2A nalijeme do autoklávovatelných lahví 500 ml, vydesinfikujeme autoklávováním (20 min při teplotě 121°C a tlaku 144 kPa) a po zchladnutí na 45°C rozléváme asepticky ve Flow boxu do sterilních Petriho misek. Po zatuhnutí média misky přiklopíme a skladujeme ve tmě v mikroténových sáčkách při +4°C až +7°C po co nejkratší dobu, maximálně 1 měsíc. Médium BM-2b nalijeme ihned po rozvaření agarů do skleněných nádob určených pro kultivaci starších semenáčů a autoklávováním vydesinfikujeme celé kultivační nádoby i s médiem. Vrstva média ve skleněných kultivačních nádobách by měla mít tloušťku 1 – 2 cm. Před zatuhnutím média je nezbytné nádoby pravidelně míchat, aby nedošlo k usazení aktivního uhlí na dno. Médium ve skleněných nádobách lze skladovat ve tmě maximálně tři měsíce.

4.7. Příprava roztoku chlorového vápna

20 g chlorového vápna dobře rozmícháme ve 100 ml demineralizované vody. Necháme 1 hodinu odstát mimo přímé sluneční světlo. Následně roztok přefiltrujeme přes filtrační papír vložený ve filtrační nálevce. Do filtrátu přidáme jednu kapku smáčedla Tween 20, zamícháme

a výsledný roztok ihned používáme. Roztok připravujeme vždy čerstvý a neskladujeme ho déle, než 2 hodiny.

4.8. Výsev semen

Z nylonové síťoviny (průměr ok cca 40 μm; např. UHELON 130 T) ustříhneme nůžkami čtvereček o délce strany přibližně 1,5 cm. Tento čtvereček přiložíme středem na hrdlo injekční stříkačky a přes něj nasadíme jehlu průměru 1,2 mm (např. 18Gx 1 1/2'', Luer-Lock; Dispomedicor Rt.). Výsledkem je jedna vrstva nylonové síťoviny uzavřená v hrdle injekční jehly a těsně přiléhající k injekční stříkačce. Tato vrstva bude dále fungovat jako filtr oddělující semena od roztoků. Tento aparát je detailně popsán v práci Ponert et al. (2011). Z injekční stříkačky s nylonovou sítí vytáhneme píst, vložíme suchá přečištěná semena a zpět zasuneme píst. Následně dovnitř nasáváme příslušné roztoky dle níže uvedeného postupu:

70% ethanol (vodný roztok), protřepat, inkubovat 4 minuty, odstříknout;

3 × nasát demineralizovanou vodu, protřepat, odstříknout;

nasát demineralizovanou vodu a protřepat.

Od této chvíle pracujeme asepticky ve flow boxu.

Nasát roztok chlorového vápna, protřepat, inkubovat 5 minut, během této doby 1 x vyměnit roztok za čerstvý (odstříknout a nasát nový), odstříknout;

3 × nasát sterilní demineralizovanou vodu, protřepat, odstříknout;

nasát sterilní demineralizovanou vodu a protřepat.

Výsledkem je suspenze desinfikovaných semen ve sterilní vodě. Vyměníme jehlu s nylonovým filtrem za novou sterilní jehlu průměru 1,8 mm (např. 15G × 1 1/2''; Luer-Lock; Dispomedicor Rt.) bez filtru. Stříkačku protřepeme, aby došlo k promíchání suspenze semen ve vodě, a suspenzi semen prudce vytlačujeme na povrch média v Petriho miskách. Z jedné stříkačky obsahující 3 ml suspenze lze vysít 6 až 10 Petriho misek. Petriho misky uzavřeme víčkem, mírným horizontálním krouživým pohybem rozprostřeme suspenzi semen po povrchu média a misky na boku obalíme minimálně dvěma vrstvami parafilmu. Voda se do média během několika dnů vsákne.

4.9. Kultivace po výsevu *in vitro*

Po výsevu kultury umístíme do tmy a stálé teploty v rozmezí + 20 až 23°C. Kultury kontrolujeme po dvou týdnech od výsevu a následně jednou měsíčně, přičemž případné kontaminované Petriho misky vyhazujeme. Během dvou týdnů až dvou měsíců bude viditelný růst protokormů. Pokud protokormy dorostou velikosti 2 až 4 mm, nebo pokud vytvářejí výrazné vrcholy prýtů (obrázek 1), přesazujeme je na nové médium BM-2b ve skleněných kultivačních nádobách, které svou velikostí umožňují následný vývoj prýtů a hlíz. Přesazování provádíme sterilními pinzetami asepticky ve flow boxu. Po přesazení umístíme kultury do stálé teploty +12°C. Pokud protokormům nezačal vyrůstat prýt, kultivujeme je dále ve tmě, dokud nezačne vyrůstat prýt. Od chvíle, kdy začne prvním protokormům růst prýt, kultivujeme celou kulturu na světle při ozáření cca 100 W m⁻² a krátkodenní fotoperiodě (8 hodin světla, 16 hodin tmy). Pokud protokormům nezačnou vyrůstat zelené části prýtů a kořeny či hlízy do dvou měsíců od přesazení, přesadíme je znovu na stejné nové médium. Od fáze, kdy rostou nápadné listy a podzemní orgány, již rostliny zpravidla není potřeba přesazovat. Pokud bychom však rostliny kultivovali dlouhou dobu, je nezbytné rostliny po 11 měsících přesadit na nové médium.



Obrázek 1: Protokormy *Ophrys bertoloniiformis*, které právě dorostly nejmenší velikosti vhodné pro přesazení na nové médium.

4.10. Převod semenáčů do podmínek *ex vitro*

Pro úspěšný převod do podmínek *ex vitro* by rostliny měly být v aktivním růstu, bez známek hnědnutí s vytvořenými velkými hlízami a s listy (obrázek 2). V podmínkách střední Evropy je úspěšný převod možný pouze v období od 1.1. do 15.3. Později převedené rostliny se špatně ujímají, protože jsou již vyšší teploty, delší den a rostliny mají tendenci ihned zatahovat. Převod provádíme v nesterilních podmínkách. Rostliny i s kultivačním médiem opatrně vyjmeme z kultivační nádoby tak, aby nedošlo k polámání rostlin, a položíme je na cedník. Následně médium odmyjeme silným proudem vody. Výhodně lze využít sprchu. Je nezbytné odstranit veškeré zbytky média. Dříve, než rostliny oschnou, je zasadíme do vlhkého substrátu (písek, pemza, Seramis, perlit, jemná kompostovaná kůra, hlinitý substrát „John Innes No. 1“ v poměru 1:1:1:1:0,5:0,5, s přídavkem 5 % jemně drceného vápence) v květináčích z pálené hlíny a zalijeme. Na spodu květináče by měla být drenáž z vápencového štěrku vyplňující spodní 1/3 výšky květináče. Květináče zasenkujeme do větší nádoby s pískem, nebo do záhonu s pískem a umístíme do chladného skleníku s minimální teplotou +4°C. Skleník by se neměl přehřívat, aby denní teplota zůstávala co nejnižší (nepřesahovala venkovní teplotu) a noční klesala na minimální nastavené hodnoty, dokud to umožní venkovní počasí.



Obrázek 2: Semenáče *Ophrys biscutella* ve velikosti vhodné k převodu do podmínek *ex vitro*.

4.11.Časový harmonogram

Protože je převod do nesterilních podmínek možný kvůli průběhu počasí pouze krátkou část roku, je nutné celý postup správně načasovat. Výsev je vhodné provádět od ledna do dubna. Protokormy většinou narostou do velikosti vhodné pro přesazení během třech až sedmi měsíců. Rostliny lze potom převést do nesterilních podmínek *ex vitro* začátkem následujícího roku. Reakce jednotlivých druhů se liší a může se stát, že vývoj daného druhu bude probíhat pomaleji. V tom případě lze tento časový postup modifikovat tak, že rostliny kultivujeme libovolně dlouhou dobu *in vitro* při teplotě 12°C a krátkém dni. Tuto fázi kultivace lze tedy prodloužit, za předpokladu přesazování na nové médium i na několik let.

5. Srovnání novosti postupů

Jedná se o novou metodiku. Tato metodika poprvé představuje složení dvou kultivačních médií optimalizovaných pro kultivaci orchidejí rodů *Anacamptis*, *Ophrys* a *Serapias*, konkrétně média ER1/4-2A a média BM-2b (tabulky 1 a 2). Toto jedinečné složení kultivačních médií je zde doplněno kultivací za nízkých teplot a krátkého dne. V dříve publikovaných postupech jsou zde pojednávány orchideje kultivovány za běžných laboratorních teplot 20-25°C a normální délky dne. Tyto orchideje ale v přírodě rostou v zimním období a jsou k růstu stimulovány nízkými teplotami a krátkým dnem. Využití zde popsané kultivace za nízkých teplot a krátkého dne proto vede k rychlejšímu růstu a produkci zdravějších semenáčů, které se lépe ujímají.

6. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena několika skupinám uživatelů: (i) Výzkumné instituce mohou pomocí zde popsaného postupu kultivovat orchideje rodů *Anacamptis*, *Ophrys* a *Serapias* k výzkumným účelům. (ii) Ochránáři mohou namnožit ohrožené druhy orchidejí a pokusit se o posílení populací či reintrodukcii na zaniklá stanoviště. (iii) Zahradnické firmy mohou připravit semenáče ke komerčním účelům. Tato metodika je zaměřena na popis postupu umožňujícího vypěstování soběstačných semenáčů orchidejí rodů *Anacamptis*, *Ophrys* a *Serapias* vhodných pro další dopěstování ve skleníku.

7. Ekonomické aspekty

Pro pracoviště, kde je zavedená kultivace jakýchkoliv rostlin *in vitro*, jsou náklady na zavedení metodiky prakticky nulové. Jediné, co bude nutné doplnit, je spotřební materiál. Na výsev je potřeba následujících položek, které nejsou běžnou součástí *in vitro* kultivačních postupů (ceny jsou uvedeny včetně DPH):

Tabulka 3: náklady na spotřební materiál, který není běžnou součástí laboratoří vybavených pro *in vitro* kultivace.

Položka	cena za kus [Kč]	množství ošetřených semen	cena za jedno semeno [Kč]
Injekční stříkačka	1,5	300	0,005
Nylonová síť 1 m ²	400	> 100 000	0,004
Injekční jehla 1,8 mm	1,8	300	0,006
Injekční jehla 1,2 mm	0,9	300	0,003
Chlorové vápno	70	30 000	0,002
Petriho misky	2	300	0,006

Nárůst nákladů oproti klasickým *in vitro* kulturám lze tedy předpokládat o 0,026 Kč na semeno. Při celkové úspěšnosti 20 % to odpovídá 0,13 Kč na rostlinu, což je vůči běžným nákladům na *in vitro* kultivace zanedbatelné. Popsaný postup tedy svými ekonomickými náklady zhruba odpovídá nákladům na rozmnožování jiných rostlin *in vitro*.

8. Seznam použité související literatury

- Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review* 33: 1-97.
- Arditti J (1984) An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 359-381.
- Arditti J, Ghani AKA (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 145: 367-421.
- Bernard N (1909) L'évolution dans la symbiose. Les Orchidees et leurs champignons commensaux. *Annales des Sciences Naturelles Serie (Botanique)* 9: 1-196.
- Peterson RL, Uetake Y, Zelmer C (1998) Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* 25: 29-55.

- Ponert J, Vosol sobě S, Kmecová K, Lipavská H (2011) European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* 1: 95-107.
- Rasmussen HN (1995) *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rasmussen HN, Rasmussen FN (2009) Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118: 334-345.
- Vij SP, Lakhanpal TN, Gupta A (2002) Orchidoid Mycorrhiza and Techniques To Investigate. In: Mukerji KG, Manoharachary C, Chamola BP, eds. *Techniques in Mycorrhizal Studies*. Dordrecht, Netherlands: Springer Science + Business Media, 385-434.
- Yam TW, Arditti J (2017) *Micropropagation of Orchids*. Third edition. Volume one. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex.
- Yeung EC (2017) A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies* 58: 1–14.

9. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Ponert J, Vosol sobě S, Kmecová K, Lipavská H (2011) European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* 1: 95-107.
- Ponert J, Figura T, Vosol sobě S, Lipavská H, Vohník M, Jersáková J (2013) Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany* 91: 662-670.
- Ponert J, Lipavská H (2017) Utilization of exogenous saccharides by protocorms of two terrestrial orchids. *Plant Soil and Environment* 63: 152-158.

10. Jména oponentů

Mgr. Ing. Pavel Trávníček, Ph.D. (Botanický ústav AV ČR, v.v.i.)

RNDr. Petr Soudek, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.)

11. Dedikace

Tato certifikovaná metodika vznikla za podpory MŠMT, konkrétně projektu NPU: LO 1417 (Centrum experimentální biologie rostlin UK).