

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Tomáš Figura

Mechanismy dormancie semien mykoheterotrofných rastlín

Seed dormancy mechanisms of mycoheterotrophic plants

Bakalárska práca

Školiteľ: RNDr. Jan Ponert
Konzultant: Doc. RNDr. Helena Lipavská PhD.
Praha 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 16.5.2013

Podpis

PodĎakovanie

Ďakujem môjmu školiteľovi RNDr. Honzovi Ponertovi za to že ma zasvätil do tajov orchideí a za cenné rady a ďalšiu neoceniteľnú pomoc, doc. RNDr. Helene Lipavskej Ph.D. a RNDr. Hanke Konrádovej Ph.D., za technické rady a pomoc pri zostavovaní práce, RNDr. Mgr. Kláre Čihákovej za osvieženie chemických znalostí a aj seba za to, že som prácu dopísal včas. Ďakujem za ďalšiu pomoc členom Katedier experimentálnej biológie rastlín a botaniky, Unii pro transport a signalizaci rostlin, osloveným domácim aj zahraničným odborníkom, svojej rodine za trpezlivosť a gramatické korektúry, Jakubovi Starostovi za psychickú podporu, Thorovi a jeho kladivu Mjølner za ochranu pri písaní, skupine Månegarm a hudobníkom Björgvin Sigurðsson a Baldur Ragnarsson za spríjemnenie atmosféry pri písaní, Mgr. Stanislavovi Vosolsobě za to že je a Bc. Monike Kofroňovej za upozornenie že práca nebola zarovnaná do bloku.

ABSTRAKT

Semená mykoheterotrofných rastlín známe ako prachové semená, ktoré sú typické pre čeľaď *Orchidaceae* a ďalších 11 čeľadí, majú vnútornú (fyziologickú, morfológickú) a vonkajšiu (fyzikálnu) dormanciu. Prelamovanie dormancie je nevyhnutný krok pre to, aby semeno vyklíčilo. Na prelomenie vonkajšej dormancie je nevyhnutné prelomiť ako vonkajšie, tak vnútorné osemenie, čo môže byť prevedené skarifikáciou. Chemická skarifikácia, najčastejšie prevádzaná chlórnanom, je často používaná a zdá sa, že je to najlepší spôsob na prelamovanie dormancie a sterilizáciu semien. Ďalšie sterilizačné prostriedky ako etanol a kyselina sírová sú tiež často používané. Na prelomenie vnútornej (fyziologickej) dormancie je vhodné aplikovať fytohormóny pričom najužitočnejšie sú cytokiníny, hlavne kinetín. Kyselina abscisová indukuje dormanciu a etylén indukuje klíčivosť. Anorganické formy dusíka majú taktiež inhibičný efekt na klíčenie, aspoň u niektorých druhov. Semená mnohých orchideí tiež potrebujú periódu chladnej stratifikácie po výseve a väčšina z nich klíči pri teplote okolo 23°C.

Kľúčové slová: Orchideaceae, prachové semená, dormancia, mykoheterotrofia, *in vitro*, klíčenie

ABSTRACT

Seeds of mycoheterotrophic plants known as dust seeds which are typical for the family *Orchidaceae* and 11 other families have inner (physiological, morphological) and outer (physical) dormancy. Dormancy breaking it is a necessary step for a seed to germinate. For breaking the exogenous dormancy it is necessary to break both inner and outer testa, which can be done by scarification. Chemical scarification, mostly done by chlorine, is commonly used and it seems to be the best way for breaking dormancy and also for sterilization of seeds. Other sterilization agents as ethanol and sulfuric acid are also commonly used. For breaking the inner (physical) dormancy, application of growth regulators can be useful, especially in the case of cytokinins, specifically kinetine. Abscisic acid induces dormancy and ethylene induces germination. Anorganic forms of nitrogen have also inhibitory effects for germination at least for some species. Seeds of most orchid species also need a period of chilling after sowing and for germination they mostly need temperature around 23°C.

Keywords: *Orchidaceae*, dust seeds, dormancy, mycoheterotrophy, *in vitro*, germination

Online verzia dostupná na <http://fi.yc.cz/public/dormancy.pdf>

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. <u>Úvod</u> | 6 |
| 2. <u>Všeobecné mechanizmy dormancie semien u rastlín</u> | 10 |
| 3. <u>Dormancia semien mykoheterotrofných rastlín</u> | 13 |
| 3.1 <u>Spôsoby narušovania dormancie semien heterotrofných rastlín</u> | 13 |
| 3.1.1 <u>Skarifikácia</u> | 13 |
| 3.1.1.1 <u>Etanol</u> | 13 |
| 3.1.1.2 <u>Chlórnany</u> | 14 |
| 3.1.1.3 <u>Iné oxidačné činidlá</u> | 17 |
| 3.1.1.4 <u>Detergent</u> | 18 |
| 3.1.1.5 <u>Kyselina sírová</u> | 18 |
| 3.1.1.6 <u>Voda</u> | 19 |
| 3.1.1.7 <u>Iné spôsoby narúšania dormancie semien</u> | 19 |
| 3.1.2 <u>Dusík</u> | 20 |
| 3.1.3 <u>Fytohormóny</u> | 20 |
| 3.1.3.1 <u>Cytokiníny</u> | 20 |
| 3.1.3.2 <u>Giberelíny</u> | 21 |
| 3.1.3.3 <u>ABA</u> | 22 |
| 3.1.3.4 <u>Auxíny</u> | 22 |
| 3.1.3.5 <u>Etylén</u> | 22 |
| 3.1.4 <u>Svetlo</u> | 23 |
| 3.1.5 <u>Nezrelé semená</u> | 24 |
| 3.1.6 <u>Teplota</u> | 26 |
| 3.1.6.1 <u>Druhy nevyžadujúce stratifikáciu</u> | 26 |
| 3.1.6.2 <u>Druhy vyžadujúce stratifikáciu</u> | 27 |
| 3.1.7 <u>After-ripening</u> | 27 |
| 3.1.8 <u>Hubový symbiont</u> | 28 |
| 3.1.9 <u>Klíčenie v prirodzených podmienkach</u> | 29 |
| 4. <u>Mechanizmy dormancie mykoheterotrofných rastlín</u> | 30 |
| 4.1 <u>Vonkajšia dormancia</u> | 30 |
| 4.2 <u>Vnútoraná dormancia</u> | 31 |
| 5. <u>Literatúra</u> | 32 |

Použité skratky:

ABA- kyselina abscisová

DAP- dni po opelení

GA – giberelíny

GA₃– kyselina gibberelová (C₁₉H₂₂O₆)

TTZ- tetrazolium

LEA- ochranné proteíny objavujúce sa v neskorých fázach embryogenézy (z anglického late embryogenesis abundant

ATP – adenzíntrifosfát

FDA – fluorescín diacetát

PI – propidiumiodid

BR - brasinosteroidy

EtOH – etanol

HCl – kyselina chlorovodíková

H₂SO₄ – kyselina sírová

1. Úvod

Väčšina rastlín vytvára semená, pre tie je väčšinou vhodnejšie vyklíčiť až za určitých viac či menej optimálnych podmienok, ktoré väčšinou nenastanú okamžite, keď semeno opustí materskú rastlinu. Z tohoto dôvodu majú semená mechanizmy, ktoré zabraňujú semenu vyklíčiť pokiaľ nenastanú vhodné podmienky na klíčenie - majú dormanciu. Dormancia je definovaná ako vnútorný "blok" ktorý zabezpečuje že semená nevyklíčia za nepriaznivých podmienok – teplotných, svetelných, vlhkostných či iných podmienok ([Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006](#)).

Dormantné semeno je také, ktoré nevyklíči v určitom čase ani za takých ekologických podmienok za ktorých by nedormantné semeno vyklíčilo ([Baskin et Baskin 2006](#)). Inými slovami je to neschopnosť životaschopného semena vyklíčiť za priaznivých podmienok ([Bewley 1997](#)). Dormancia zabezpečuje správne načasovanie klíčenia v závislosti na ročnom období a hrá dôležitú úlohu v evolúcii rastlín a ich adaptácií na klimatické zmeny. Slovo dormancia pochádza z latinského *dormire* – spať. To že životaschopné semeno je dočasne neschopné vyklíčiť aj za podmienok normálne vhodných pre klíčenie odlišuje dormanciu semien od štádia pokoja (z angl. *quiescence*) čo je stav pozastaveného vývoja v nedormantných semenách nachádzajúcich sa v nepriaznivých ekologických podmienkach ([Li et Foley 1997](#)). Dospievanie semien je spojené s vytváraním dormancie semien ([Rasmussen et al. 1990a](#)). Na konci embryogenézy sa embryo dostáva do stavu dormancie. Dochádza k zníženiu obsahu vody, zvýšeniu obsahu ochranných proteínov LEA (z anglického „late embryo abundant“) ochraňujúcich pred dehydratáciou, ktoré sa objavujú v neskorých fázach embryogenézy, a zmene hladiny fytohormónov (klesá aktivita gibberelínov a auxínov). Nastáva utlmenie metabolickej aktivity a je zvýšená hladina ABA ([Cumming 1990](#), [Hong-Bo et al. 2005](#), [Pavlová 2005](#)). Z obalov vajíčka sa stanú obaly semena. Signál na vstup do dormancie rastlina dostane zo sporofytu, a tak embryá kultivované mimo materskú rastlinu nevstúpia do dormancie. V čase keď embryo vstupuje do dormancie môže byť tiež rôzne vyvinuté. Opakom k najvyvinutejším embryám tráv ([Pavlová 2005](#)) sú embryá orchideí či hniliakov ([Leake et al. 2004](#)), pričom napr. u *Monotropa hypopitys* pozostáva embryo len zo 4 buniek vytvorených 2 mitotickými deleniami ([Koch 1882](#)). Ak už semeno nie je dormantné, môže nastať klíčenie. K tomu, aby semeno vyklíčilo, je treba obnoviť metabolickú aktivitu semena, a k tej dojde len ak je semeno rehydratované - semeno bobtná, a vo väčšine prípadov je nutný aj dostatok kyslíku, ktorý pomocou respirácie vytvára energeticky bohatú látku - adenosíntrifosfát (ATP) a ďalšie metabolity. Hydratácia umožňuje tiež hydrolýzu zásobných látok a vyplavovanie inhibičných látok ([Botha et al. 1992](#), [Pavlová 2005](#)). Ďalšie informácie o dormancii semien a ranných štádiách ontogenézy sú prehľadne spracované v rešerši v češtine od Čihákovéj ([2010](#)).

Mykoheterotrofné či parazitické rastliny, ktorým sa táto práca venuje, majú semená miniatúrnych rozmerov a malej hmotnosti a súhrne sa nazývajú ako "dust seeds" voľne preložiteľné ako

prachové semená. Tieto malé semená môžu vážiť len mikrogram ([Ziegler 1981](#)) a sú najmenšími semenami krytosemenných rastlín ([Leake 1994](#), [Eriksson et Kainulainen 2011](#)), u orchideí v tobolke sú ich veľké množstvá ([Slavíková 1986](#), [Arditti et Ghani 2000](#), [Vičko et al. 2003](#), [Delforge 2006](#)). Už Martin ([1946](#)) zaradil semená mykoheterotrofných rastlín podľa rozdielného pomeru embrya k endospermu do kategórie „micro seeds“ (*Orchideaceae*, *Monotropaceae*, *Pyrolaceae* a *Burmaniaceae*) a väčšie do kategórie „dwarf seeds“ (*Gentianaceae*, *Orobanchaceae* a *Ericaceae*) čo boli v jeho klasifikácii najmenšie semená. Podľa Eriksson et Kainulainen ([2011](#)) sa prachové semená vyskytli nezávisle u 12 čeľadí (*Burmanniaceae*, *Corsiaceae*, *Orchidaceae*, *Triuridaceae*, *Petrosaviaceae*, *Ericaceae*, *Gentianaceae*, *Polygalaceae*, *Orobanchaceae*, *Rubiaceae*, *Buddlejaceae* and *Gesneriaceae*), a rastliny s prachovými semenami sú aspoň na začiatku svojho života závislé na externom zdroji organického uhlíku ([Ericsson et Kainulainen 2011](#)) – sú spočiatku plne mykoheterotrofné (alebo parazitické na iných rastlinách). V dospelosti takéto rastliny ostanú, plne mykoheterotrofné (parazitické) alebo len čiastočne mykoheterotrofné (parazitické; [Ericsson et Kainulainen 2011](#)). Takéto malé semená orchideí sa síce ľahko šíria vetrom, no predpokladá sa že sú vo väčšine prípadov citlivé k vysychaniu a je otázne či dlhodobá prítomnosť semena v atmosfére nezničí embryo ([Pridgeon 1999](#)).

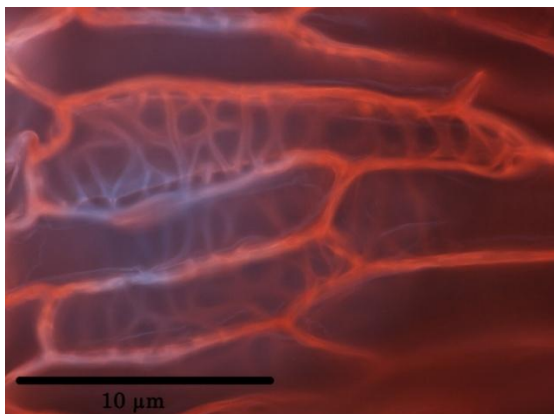
Semená orchideí nemajú endosperm, alebo je málo vyvinutý a majú len minimum zásobných látok ([Lee et al. 2006](#)), ktoré nedostačujú pre rast mladých rastlín po vyklíčení. Väčšina prác popisuje absenciu endospermu ako základnú charakteristiku (rozpísané v: [Pridgeon 1999](#), [Ponert 2009](#)). Dvojité oplodnenie v minulosti pozorovali niektorí autori ([Hagerup 1947](#), [Swamy 1942](#), [43a](#), [b](#), [44](#), [45](#), [46a](#), [47](#), [48](#), [49a](#), [b](#)), jedná sa ale o staršie práce, ktorých pozorovania v novších neboli potvrdené ([Albert 1990](#), [Clements 1995](#)). Niektorí autori teda predpokládajú, že u orchideí k dvojitému oplodneniu vôbec nedochádza ([Clements 1995](#); [Ponert 2009](#)). Fredericson ([1990](#)) pomocou konfokálnej mikroskopie dobre zdokumentovala prítomnosť dvojitého oplodnenia u *Epipactis palustris*. Otázka či u orchideí dochádza ku dvojitému oplodneniu je teda otvorená. Je možné že k dvojitému oplodneniu dochádza len u niektorých druhov. Malý zárodok je v semene orchideí jediným živým pletivom obklopeným vonkajším osemením (testou) pozostávajúcím väčšinou z jedinej vrstvy odumretých buniek, ktorá vznikla z vonkajšieho integumentu vajíčka ([Ziegler 1981](#), [Clements 1995](#)) a vnútorným osemením.

Úspešnosť vývoja semenáčov je preto nízka a pre mladé rastliny je nevyhnutné, aby boli infikované mykoríznou hubou z ktorej získavajú výživu pre svoj rast. V umelých podmienkach toto prvýkrát napodobnil Bernard ([1899](#)). Až neskôr sa podarilo nahradiť hubu živným roztokom a vytvoriť tak prvú asymbiotickú kultúru orchideí ([Knudson 1921](#)). V súčasnosti sa pri výskume orchideí pracuje zo symbiotickými aj asymbiotickými kultúrami *in vitro*. Asymbiotická kultúra neobsahuje hubového symbionta a symbiotická kultúra je taká, kde pred vysiatím semien alebo súčasne s vysiatím, bola na médiu prítomná symbiotická huba.

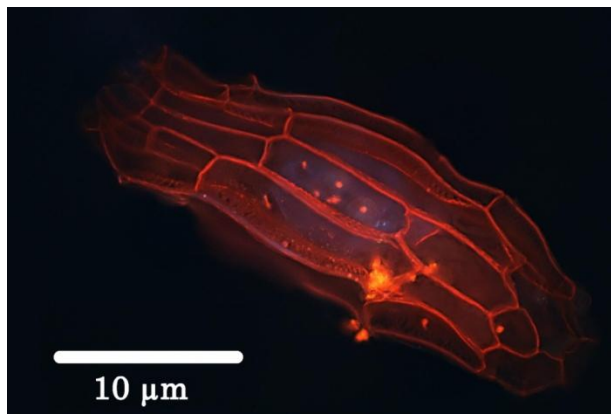
Dôležitá prekážka, cez ktorú sa musí dostať voda aj hýfa huby je osemenie. Testa (osemenie)

vyzerá ako jemná štruktúra no je nepriepustná pre vodu a jedná sa o mechanizmus dormancie ([Rasmussen 1995](#)). Prvá práca zaoberajúca sa štruktúrou osemenia orchideí je kniha rakúskeho autora publikovaná v roku 1863 (Beer [1863](#)). Dospelé semená orchideí majú dve vrstvy osemenia – vnútorné a vonkajšie. Nápadné je predovšetkým vonkajšie osemenie, ktoré je tvorené z jednej vrstvy bunkových stien odumretých buniek vyvinutých z vonkajšieho intergumentu vajíčka. Strata obsahu buniek tejto vrstvy nastáva tesne pred úplným dozretím semien ([Ziegler 1981](#), [Clements 1995](#)). Vonkajšie osemenie podľa [Vasudevana a van Stadena \(2010\)](#) u *Dendrobium nobile* malo 2 vrstvy buniek, ktoré obsahovali lignín.

Omnoho menej nápadné je u zrelých semien orchideí vnútorné osemenie, ktoré vzniká z vnútorného intergumentu vajíčka. Vnútorné osemenie je tesne pripojené k embryu ([Veyret 1969](#), [Sgarbi et Prete 2009](#)). Vnútorné osemenie väčšina autorov prehliada, pričom popisuje len „osemenie“ čím je myslené vonkajšie osemenie. Vnútorné osemenie aspoň v niektorých prípadoch vzniká z dvoch vrstiev buniek ktoré potom degradujú a ostane len kutikula ([Vasudevan et van Staden 2010](#)) Bunkové steny vonkajšieho osemenia sú tiež často ako napríklad druhu *Dactylorhiza sambucina* (príloha, obrázok č. 1) či *Pyrola ochroleuca* z čeľadi *Ericaceae* (obrázok č. 2) sekundárne vystužené.



Obrázok č. 1: Semeno *Dactylorhiza sambucina* s viditeľnými sekundárnymi výstuhami na osemeni, fluorescencia, excitácia zeleným svetlom, preparát prifarbený roztokom fluoresceín diacetátu s propidiumjodidom. Foto: Autor a Jan Ponert.



Obrázok č. 2: Semeno *Pyrola ochroleuca* s červeno svietiacim osemením, fluorescencia, excitácia UV svetlom, použité fluorescenčné farbivá fluoresceín diacetát a propidiumjodid. Foto: Autor

Yamazaki et Miyoshi ([2006](#)) a Vasudevan et van Staden ([2010](#)) pozorovali dve až tri vrstvy vnútorného integumentu (osemenia) – vonkajšiu a vnútornú až po 90 dní po opelení (ďalej DAP z anglického „days after pollination“). Vnútorná vrstva vnútorného osemenia bola zafarbená safraninom 90 DAP a táto bola menej zafarbená po 100 DAP čo naznačuje že kutinizuje (Yamazaki et Miyoshi [2006](#)). Vonkajšia vrstva bola stlačená a lignifikovaná 100 DAP. Semená aspoň u nimi skúmaného druhu *Cephalanthera falcata* majú po 90 DAP dve vrstvy vnútorného integumentu (osemenia), jednu lignifikovanú a jednu kutinizovanú ([Yamazaki et Miyoshi 2006](#)).

Ziegler ([1981](#)) si tiež všimol že semená majú navlhavý elater, ktorý zabraňuje tomu, aby semená

pri prasknutí tobolky vypadli naraz.

Osemenie je väčšinou nepriepustné pre vodu a môže brániť predčasnému klíčeniu semien v nepriaznivých podmienkach – robí semená dormantnými. Osemenie umožňuje semenám orchideí nielen lietať ([Burgeff 1936](#), [Karasawa et Saito 1982](#), [Murren et Ellison 1998](#), [Arditti et Ghani 2000](#)), ale aj plávať na vode ([Carey 1998](#), [Murren et Elison 1998](#), [Arditti et Ghani 2000](#)) vďaka osemením zadržanému vzduchu, a semená môžu byť prenášané exozoochoricky aj endozoochoricky ([Nakamura et Hamada 1978](#), [Arditti et Ghani 2000](#)). V prirodzených podmienkach by k narušeniu osemenia mohli prispievať mykorízne huby ktoré ho pravdepodobne enzymaticky narušia a po vytvorení mykoríznej symbiózy embryo potom priamo zásobujú vodou ([Baláž 2001](#), [Gryndler et al. 2004](#)) alebo je narušované abioticky (vplyvom teploty, mrazu či len pôsobením vody; ([Barthlott et Ziegler 1980](#), [Prutsch et al. 2000](#)). Prítomnosť hubového symbionta ale nie je nevyhnutná a to aspoň u väčšiny druhov pri asymbiotickom výseve *in vitro*, kde semenám stačí narušiť dormanciu stratifikáciou či dezinfekciou (chlórnanom, etanolom, H₂SO₄ a ďalších; [Rasmussen 1995](#), [Malmgren et Nyström 2013](#), [Ponert et al. 2013](#) a ďalší), alebo klíčia vo vhodných podmienkach bez ošetrovania ([Wodrich 1997](#), [Ponert 2009](#)).

V holarktickej oblasti je rok rozdelený na sezóny, čo je pre vývoj rastlín dôležité. Mnoho štúdií sa venuje odpovedi rastlín na teplotu, vlhkosť, dĺžku dňa či iné kvalitatívne faktory, iné štúdie sa zas venujú vplyvu chemických faktorov.

2. Všeobecné mechanizmy dormancie semien u rastlín

Ako bolo uvedené v predchádzajúcej kapitole, semená mykoheterotrofných rastlín majú určité odlišnosti od semien väčšiny ostatných rastlín. Otázkou akými mechanizmami je ale riadené klíčenie a dormancia semien mykoheterotrofných rastlín sa ale zaoberá len veľmi málo prác. Najprv teda stručne predstavím všeobecné mechanizmy dormancie semien u rastlín.

Problematikou dormancie semien všeobecne sa naopak venuje množstvo rewiw ([Bewley et Black 1985](#), [Fenner 1992](#), [Hilhorst et Karssen 1992](#), [Hilhorst 1995](#), [Vleeshouwers 1995](#), [Bewley 1997](#), [Fenner 2000](#), [Viémont 2000](#), [Fenner 2005](#) a ďalší), mnohé z nich sú veľmi rozsiahle.

Jedná sa o zložitý dej regulovaný mnohými rôznymi spôsobmi a preto býva dormancia rôzne delená. Klasifikácia dormancie ale nie je jednotná a v publikáciách sa väčšinou nerozlišuje aký typ dormancie bol skúmaný; Baskin et Baskin ([2004](#)) uvádzajú že v delení dormancie je zmätok a fakt že mnohí autori neuvádzajú, aký druh dormancie skúmajú, považujú za nešťastné riešenie, preto predstavujú hierarchický systém rozdelenia domancie semien na základe Nikolaeva ([1967](#), [1977](#)). Baskin et Baskin ([2004](#)) navrhujú tri hierarchické vrstvy: trieda, úroveň a typ. Rozdeľujú 5 tried dormancie: fyziologická, morfológická, morfofyziologická, fyzická a kombinovaná. Tieto kategórie ďalej delia na úrovne a typy. Fyziologická dormancia je najrozšírenejšia. Baskin et Baskin ([2004](#)) ani Nikolaeva ([1967](#), [1977](#)) ale do tohto systému nezahrňujú „semená s nediferencovaným embryom“ čím myslia orchidey, no tvrdia že majú morfológický a fyziologický komponent dormancie ([Baskin et Baskin 2004](#)).

Fyziologická dormancia je taká, ktorá na to, aby bola narušená potrebuje teplú alebo chladnú stratifikáciu, aplikáciu GA či after-ripening ([Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006](#))

Morfológická dormancia je zapríčinená nedostatočne vyvinutým ale diferencovaným embryom ([Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006](#), [Baskin et Baskin 1998](#)). Morfofyziologická dormancia je taká, kde nevyvinuté embryo má aj fyziologickú dormanciu ([Baskin et Baskin 2004](#)). Fyzikálna dormancia je spôsobená vrstvou alebo vrstvami vode nepriepustných buniek osemenia a oplodia ([Baskin et al. 2000](#)). Takáto dormancia je narušená vtedy ak sa voda dostane k embryu ([Baskin et al. 2000](#)). Kombinovaná dormancia je taká, kde sú nezmáčavé semená v spojení s fyziologickou dormanciou ([Baskin et Baskin 2004](#)).

Iné, ale tiež často používané delenie dormancie je podľa Harpera ([1959](#)), ktorý dormanciu delí na primárnu (vrodenu), sekundárnu (indukovanú) a vynútenú. Primárna dormancia (synonymom je vrodená; [Fenner 2000](#)) je neschopnosť semena vyklíčiť ihneď po dozretí a vypadnutí semien z materskej rastliny ([Hilhorst 1995](#), [Bewley 1997](#)) a zabraňuje vyklíčeniu všetkých semien naraz ([Fenner 2000](#)), semeno vyžaduje istý vonkajší podnet k tomu aby pokračovalo v raste (prítomnosť vody, nízka teplota, svetlo, fotoperiód, vhodná vlnová dĺžka žiarenia; [Begon et al. 1997](#)). Keď sú vlhké semená, ponechané v dostatočnom environmentálnom strese, ktorý zabráni klíčivosti alebo

keď nie sú podmienky na opustenie dormancie, môže nastať sekundárna dormancia ([Fenner 2000](#)). Sekundárna dormancia je nadobudnutá dormancia, do ktorej sa dostalo už nedormantné semeno ([Baskin et Baskin 2004](#)) ale podľa Fenner ([2000](#)) môže byť indukovaná u už dormantného ale aj u nedormantného semena. Vynútenou dormanciou tu chápeme stav, do ktorého sa semeno dostane pôsobením vonkajších (nepriaznivých) podmienok, do týchto podmienok sa dostane keď nie je splnená nejaká podmienka k jeho klíčeniu. Podmienená dormancia podľa Baskin et Baskin ([2004](#)) je podobná Harperovej vynútenej dormancii; jedná sa o dynamický fyziologický stav, kde klíčenie riadia meniace požiadavky semena vo vzťahu k vonkajšiemu prostrediu. ([Baskin et Baskin 1985](#))

Primárna, sekundárna a podmienená dormancia nie sú podľa Baskin et Baskin ([2004](#)) druhy, typy ani úrovne dormancie, podľa nich semeno ich úrovne „non-deep physiological dormancy“ je v dormančnom cykle medzi týmito tromi stavmi ([Baskin et Baskin 2004](#)).

Nedormantné semeno je schopné vyklíčiť v širokom rozsahu environmentálnych podmienok, ale nevyklíči za každých podmienok ([Baskin et Baskin 2004](#)). Nedormantné semeno ktoré nevyklíči kôli absencii nejakého faktoru (teplota, vlkosť, svetlo ([Ochudodho et Modi 2007](#)) či iné) je označované že je v stave pokoja (z anglického výrazu quiescence; [Baskin et Baskin 2004](#), [Fenner 2000](#)), tento stav pokoja kedy semeno kôli nevhodným ekologickým podmienkam) nemôže vyklíčiť je podľa Baskin et Baskin ([2004](#)) synonymom pre Harperovu ([1977](#)) vynútenú dormanciu a pseudodormanciu ([Hilhorst et Karssen 1992](#), [Koornneef et Karssen 1994](#))

Dormancia je určená morfológickými a fyziologickými vlastnosťami semena ([Nikolaeva 2004](#)). Nevyvinuté embryá, morfológická a morfofyziologická dormancia sú typické pre primitívne taxóny - podčelade *Magnoliidae*, *Ranunculidae* z dvojklíčnolistových a napr. podtrieda *Arecidae* jednoklíčnolistových. Evolučne najpokročilejšie taxóny majú zas plne vyvinuté embryo a nemajú často morfológickú či morfofyziologickú dormanciu (*Caryophyllidae*, *Hamamelidae*; [Nikolaeva 2004](#)).

Práce Nikolaevy ([1969,1977](#)) z ktorých vychádzali aj Baskin et Baskin ([2004](#)) rozoznávajú typy dormancie podľa toho, čo ju spôsobuje a podľa podmienok ktoré ju narušujú. Rozoznáva exogénnu - spojenú s vonkajšími obalmi semien, endogénnu kde patrí morfológická (spojená s nevyvinutým embryom), fyziologická (spojená s fyziologickým stavom embrya) a morfofyziologická (kombinácia nevyvinutého embrya a fyziologických príčin) a kombinovanú (kombinácia exogénnej a endogénnej; Nikolaeva [1969,1977](#)). Rozdelenie na vnútornú a vonkajšiu dormanciu bude použité aj v tejto práci. Podľa Vleeshouwers et al. ([1995](#)) by nemala byť dormancia semien určovaná len absenciou klíčivosti ale ako rozsah podmienok, v ktorých je semeno schopné vyklíčiť.

Mechanizmy dormancie semien a klíčenie sú ovplyvnené významnou mierou fytohormónmi ABA a GA ([Baskin et Baskin 2004](#)). ABA indukuje dormanciu a GA podporujú klíčenie a prekonanie dormancie semien. GA stimulujú expresiu α -amylázy v aleurónovej vrstve ktorá hydrolyzuje škrob,

ABA teda udržuje dormanciu a klíčivosť je priamo korelovaná s obsahom ABA. ABA pôsobí proti účinku GA podobne ako etylén a BR ktoré podporujú klíčenie ([Pavlová 2005](#), [Hilhorst 1995](#)). Dormanciu semien môže okrem zvýšenej hladiny ABA v embryu vyvolávať aj iný rastový inhibitor ako fenyylpropanoidy v osemeni či oplodí. Funkciu ABA na klíčenie semien popisuje Karssen ([1983](#)) kde mutanti *Arabidopsis* neschopný tvorby ABA či odpovedi na ABA klíčili predčasne ([Karssen 1983](#)). ABA je veľmi dôležitá v regulácii tvorby primárnej dormancie ([Hilhorst 1995](#)). ABA bola nájdená vo všetkých častiach semena ([Hilhorst 1995](#)).

Ďalší fytohormón, ktorý sa zrejme významne uplatňuje v prelamaní dormancie je etylén. Etylén tiež prelamuje vnútornú a vonkajšiu dormanciu semien a navodzuje klíčenie ([Kepczynski et Kepczynska 1997](#), [Matilla 2000](#)). Môže pôsobiť samostatne alebo spolu s inými faktormi a pôsobí takto u väčšiny rastlín. Mechanizmus jeho pôsobenia ale nie je takmer známy ([Kepczynski et Kepczynska 1997](#)) no Matilla ([2000](#)) u semien *Xanthium pennsylvanicum* pozoroval že β -cyanoalanín-syntáza je zapojená v klíčení závislom na etyléne. Regulácia rozdelenia S-adenosyl-L-methionínu (AdoMET) medzi etylén vs. polyamínovou biosyntetickou cestou môže byť tiež spôsob kontrolou klíčenia semien.

Semená v dormantnom stave môžu vydržať veľmi dlho. Semenám *Chenopodium album*, ktorým bol stanovený vek na 1700 rokov boli stále živé ([Ødum 1965](#)). Teplota a fotoperiódá sú tiež stimuly na prelomenie dormancie ([Begon et al. 1997](#)). Skoro všetky semená sú dormantné, je len málo výnimiek ako *Rhizophora mangale* ([Bewley et Black 1994](#), [Begon et al. 1997](#)), tak aj keď rastliny sú sesilne organizmy, s obmedzenou schopnosťou rozptylu v priestore na rozdiel od živočíchov, vďaka dormancii sú schopné prečkať dlhé obdobie a obmedzenú schopnosť rozptylu v priestore kompenzujú rozptylom v čase - počkajú si na lepšie podmienky.

Väčšina rastlín ktorých semená ostávajú v pôde sú jedno a dvojročné, takéto semená nemajú často mechanizmy na rozširovanie. Niektoré semená sú uvoľnené zo šišky až po pôsobení ekologického faktoru (ohňa) a tento jav sa nazýva serotínia ([Givnish 1981](#), [Schwilk et Ackerly 2001](#), [Muir et Lotan 1985](#)).

V prírode teda dormancia zabezpečuje že semeno vyklíči v správnej dobe, za optimálnej teploty, vlhkosti, za optimálneho osvetlenia či iných podmienok, a sa dá teda narušiť aj umelo – v laboratórnych podmienkach. V nasledujúcej kapitole sa budem venovať dormancii semien u mykoheterotrofných rastlín so zreteľom na čeľaď *Orchideaceae*.

3. Dormancia semien mykoheterotrofných rastlín

Väčšina prác zaoberajúcich sa dormanciou mykoheterotrofných rastlín je o orchideách, menej prác je o iných mykoheterotrofoch, preto sa zameriam na orchidey. V prípade, že bude spomenutá iná rastlina ako z čeľade *Orchidaceae*, bude to v texte uvedené. Vo väčšine prác sa stretávame s empiricky stanovenými postupmi ako prekonať dormanciu semien aby tie potom vyklíčili.

Existuje veľké množstvo prác zaoberajúcich sa rušením dormancie semien mykoheterotrofných rastlín (predovšetkým orchideí), pre praktické účely úspešného vyklíčenia, sa ale len veľmi málo štúdií sa zaoberá samotnými mechanizmami dormancie. V nasledujúcom texte teda najprv uvediem dostupné údaje o rušení dormancie rôznymi spôsobmi a až potom sa zameriam na vlastné mechanizmy, ktorými dormancia pôsobí

3.1 Spôsoby narušovania dormancie semien heterotrofných rastlín

3.1.1 Skarifikácia

Keďže testa (osemenie) u orchideí je vodeodolné, je to vlastne mechanizmus zaistenia dormancie, ktorá môže byť prekonaná napríklad skarifikáciou či dlhodobším lúhovaním vo vode ([Rasmussen 1995](#)). Vzhľadom k veľkosti semien mykoheterotrofných rastlín sa väčšinou nepoužíva klasická skarifikácia prevádzaná mechanicky. Osemenie sa narušuje pôsobením určitých chemických látok a tento proces možno označiť ako chemickú skarifikáciu. Pôvodne bola väčšina týchto látok aplikovaná ako dezinfekčný agens a cieľom vydezinfikovať nesterilné semená pre založenie kultúr *in vitro*. Až neskôr sa zistilo že tento dezinfekčný krok často významne zvyšuje podiel vyklíčených semien. Používa sa množstvo látok, často aplikovaných v jednom slede postupne za sebou. V ďalšom texte sa nimi budem pre prehľadnosť zaoberať oddelene. Asi najčastejšie je ošetrovanie etanolom a následne chlórnanmi.

3.1.1.1 Etanol

Najčastejšie sa používa 70% (96%) roztok EtOH na 1-5 minút. Etanol sa niekedy používa na sterilizáciu semien, ale je lepšie používať chlórnan, ktoré dezinfikujú omnoho účinnejšie. Samotný etanol v mnohých prípadoch nedostačuje k dezinfekcii ([Rasmussen 1995](#)). Tiež býva uvádzané že nebolo dokázané že zvyšuje klíčivosť ([Rasmussen 1995](#)). Etanol ale pomáha k lepšej zmáčavosti semien ([Michl 1988](#)), a pravdepodobne zbavuje semeno hydrofóbných látok, ako napríklad voskov a semená sú potom viac zmáčateľné. Nakoľko semená niektorých druhov orchideí klíčia lepšie po samotnom máčaní vo vode, dal by sa stimulačný efekt etanolu na klíčenie predpokladať. U druhu

Anacamptis morio ošetrenie etanolom skutočne viedlo k zvýšeniu klíčivosti ([Ponert et al. 2011](#)), v prípade že ním boli semená dezinfikované krátku dobu 2 alebo 5 minút, po 15 minútach pôsobenia EtOH bola klíčivosť zreteľne nižšia a po 60 minútach už semená neklíčili vôbec. Dlhšie pôsobenie etanolu teda semená zabíja, ale kratšie pôsobenie zvyšuje percento klíčivosti ([Ponert et al. 2011](#)). Viacerí autori používajú etanol na dezinfekciu semien pred použitím chlórnanov na široké spektrum druhov ([Michl 1988](#), [Ponert et al. 2011](#), [Ponert et al. 2013](#) a ďalší). U *Pseudorchis albida* používa Ponert et al. ([2013](#)) napr. 70% etanol na 5 minút. 70% etanol používa po dobu 2 minúty aj Kmecová ([2011](#)) u *Anacamptis morio*, Jeřábková ([2006](#)) na 3 minúty a následne ešte na ďalšiu minútu u *Pseudorchis albida* a Vejsadová ([2006](#)) u taxónov *Dactylorhiza incarnata subsp. serotina*, *Dactylorhiza maculata subsp. maculata* a *Liparis loeselii* na 3 minúty. Michl ([1988](#)) zas používa 95% EtOH na 3x 1 minútu. Uvádza tiež že etanol samotný je takmer neúčinný a naopak podľa Kmecovej ([2011](#)) je použitie etanolu dostatočné ošetrenie pred výsevom, tá však používala len dva druhy, ktoré klíčia dobre aj bez ošetrenia a je teda možné že etanol nedostačuje k prelomeniu dormancie väčšiny druhov. Michl ([1988](#)) využíva 95% etanol po dobu 1 minúty v kombinácii s chlórnanom vápenatým a dezinfekčný postup odporúča opakovať 3x, pričom sa pri jeho opakovaní neznižuje klíčivosť semien. Ponert ([2009](#)) používa taktiež etanol ako predošetrenie pred dezinfekciou chlórnanom a to 96% na 5 minút.

Používanie etanolu je teda časté väčšinou ako predošetrenie semien pred ďalšími dezinfekčnými roztokmi, ale zdá sa že nie je nevyhnutné.

3.1.1.2 Chlórnaný

Chlórnaný nielen dezinfikujú semená pri výsadbe *in vitro*, ale aj degradujú osemenie ([Rasmussen 1995](#), [Malmgren et Nyström 2013](#)) a narušujú vonkajšiu dormanciu semien, pravdepodobne tým, že chlórnaný rozpúšťajú suberínu podobné látky z osemenia a robia ho viac priepustné pre vodu, ktorá je prístupná k embryu ([Harvais et Hadley 1967](#)). Mnohí autori tiež predpokladajú že preplachovanie v dezinfekčnom roztoku vyplavuje ABA. Vyplavovanie ABA lúhovaním popisuje Rasmussen ([1995](#)) či Van Waes ([1984](#)). Van Waes et Debergh ([1986](#)) považujú dezinfekciu chlórnanom za jedno z najdôležitejších ošetrení na ktorom závisí klíčivosť.

Podľa Anderson ([1990](#)), používa Steele ([1996](#)) metódu kde odstraňuje plyny z vnútra semena vákuom pred aplikáciou chlórnanom. Pozorovanie ukázalo, že bieliaci roztok vstupuje cez osemenie cez suspenzorový koniec ([Steele 1996](#)). Semenám s tmavými embryami blednú embryá v momente keď je bieliaci roztok vo vnútri semena a podľa tohoto Steele ([1996](#)) usudzuje, že hydrofóbná povaha osemenia nie je dôležitý mechanizmus dormancie a dáva za pravdu Lindén ([1980](#)) že preplachovanie chlórnanom oxiduje dormanciu indukujúce zložky. Nie je ale jasné či skutočne blednú samotné embryá alebo vnútorné osemenie, ktoré je k nim tesne pripojené.

Koncentráciu a dobu pôsobenia roztoku na semeno je nutné prispôbiť v závislosti na druhu

orchidey ([Malmgren et Nyström 2013](#)). Väčšinou sa používajú roztoky $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a NaOCl , ale často tiež nie celkom presne definované dezinfekčné prípravky ako je Savo ([Vejsadová et Malá 1996](#), [Vejsadová et Gutzerová 1997](#), [Kmecová 2011](#)), Chlorox ([Stoutamire 1996](#)) či Domestos ([Harvais et Hadley 1967](#), [Chu et Mudge 1996](#), [Arditti 2008](#)). Harvais et Hadley ([1967](#)) nepozorovali významný rozdiel medzi použitím komerčných bielidiel (Chlorox, Domestos) a chlórnanov ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$, NaOCl).

$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ je častejšie používaný ako NaOCl ([Rasmussen 1995](#), [Ježek 1996](#), [Steele 1996](#), [Vejsadová et Malá 1996](#), [Vejsadová et Gutzerová 1997](#), [Miyoshi et Mii 1998](#) a ďalší). $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ je používané najviac v saturovanom 7.5% či slabšom 5% roztoku ([Stoutamire 1963](#), [Van Waes 1984](#), [Van Waes et Debergh 1986](#)) ale používané sú aj slabšie roztoky ([Miyoshi et Mii 1998](#)). NaOCl je najviac používané v 0,3 - 2,5% roztoku ([Miyoshi et Mii 1988](#), [Miyoshi et Mii 1998](#), [Tomita 1998](#), [Vejsadová 2006](#), [Ponert et al. 2013](#), [Malmgren et Nyström 2013](#) a ďalší).

Celkovo sú s dezinfekciou pomocou $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ lepšie výsledky ako pri použití NaOCl ([Michl 1988](#), [Miyoshi et Mii 1988](#), [Rasmussen 1995](#), [Vejsadová 2006](#), [Kmecová 2011](#), [Ponert et al. 2011](#), a ďalší). Vejsadová ([2006](#)) dosiahla lepšie výsledky v kombinácii 7,2% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ s predošetrením etanolom.

Tak ako Kmecová ([2011](#)) či Dowling et Jusaitis ([2012](#)) popisujú, že niektoré druhy sú viac citlivé k NaOCl ako k $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, množstvo ďalších prác popisuje že NaOCl znižuje klíčivosť ([Michl 1988](#), [Rasmussen 1995](#), [Vejsadová 2006](#), [Kmecová 2011](#), [Ponert et al. 2011](#)). Táto „citlivosť“ môže byť spojená fyzikálnymi vlastnosťami osemenia ([Malmgren 1996](#)). Efekt dezinfekcie roztokmi $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a NaOCl sa teda líši medzi jednotlivými druhmi, ale nie je jasné ktorá vlastnosť roztoku je pre to dôležitá. Roztoky sa líšia mnohými parametrami, pričom jedným z najnápadnejších je kyslosť roztoku ([Kmecová 2011](#), [Ponert et al. 2011](#)). Efekt pH dezinfekčného roztoku sa zdá byť pre jednotlivé druhy rozdielny a pravdepodobne je kľúčový. Oba chlórnaný sú tiež oxidačné činidlá pričom NaOCl je silnejšie. Chlórnaný sú v roztoku silne zásadité, pričom NaOCl má vyššie pH (12) ako $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (11.5; [Ponert et al. 2011](#)). Efekt pH by mohol byť zodpovedný za rozdielne výsledky pri používaní chlórnanov. Boli prevedené experimenty s použitím roztokov NaOCl a $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ s upraveným pH, no s heterogénnymi výsledkami, spôsobenými pravdepodobne nestabilitou roztokov po úprave pH ([Ponert et al. 2011](#)). Predovšetkým roztok NaOCl je po úprave nestabilný ([Kmecová 2011](#)). Výsledky ale ukazujú že rozdiely v klíčivosti nemožno vysvetliť len rozdielnym pH roztoku ([Ponert et al. 2011](#)). Rozdielny efekt roztokov bude teda spôsobený iným parametrom – najskôr oxidačnou silou roztoku alebo prítomnosťou sodných iontov.

Niektorí iní autori ale používajú NaOCl . Steele ([1996](#)) píše že CaOCl je viac používaný pri výseve orchideí lebo je k semenám citlivejší, ale zdá sa, že je citlivejší aj k patogénom a treba dlhšie sterilizovať a CaOCl_2 stráca silu aj keď je v tuhom stave. Používa 0.5% NaOCl a tento roztok odporúča použiť prípadne aj z komerčných prípravkov obsahujúcich 5% NaOCl , nepopisuje používanie etanolu ani iných dezinfekčných prostriedkov.

NaOCl znižuje klíčivosť napr. u druhov *Dactylorhiza majalis* a *D. fuchsii*.

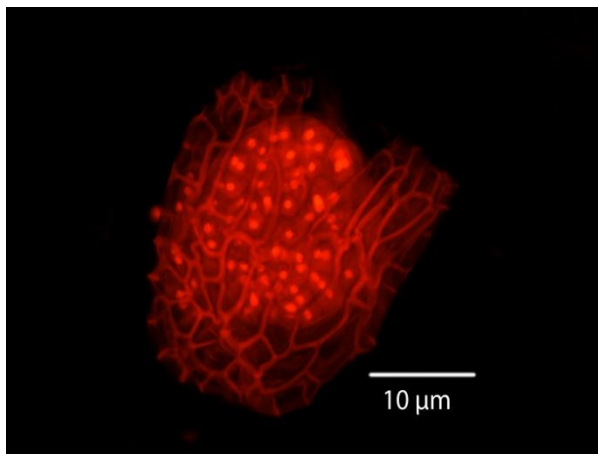
Semená *Habenaria macroceratitis* boli sterilizované roztokom s čistým etanolom, 6% NaOCl a deionizovanou vodou v pomere 1:1:1 po dobu 1 minúty. Tetrázoliový test životaschopnosti (TTZ) ukázal že 41,4 % semien po 5 týždňoch od výsevu bolo živých ([Stewart et Kane 2006](#)). Podobným roztokom no viac riedeným dezinfikoval semená *Eulophia alta* aj Johnson ([2007](#)) po dobu menej ako 1 minúta. Čerstvo pripravené 1% NaOCl spolu s tritónom po dobu 10 min používali Dowling et Jusaitis ([2012](#)) a Tomita ([1998](#)) dezinfikuje roztokom NaOCl (1% chlóru), po dobu 4 - 8 min, s vysokou klíčivosťou u druhu *Calypso bulbosa*. Malmgren et Nyström ([2013](#)) používajú roztok chlórnanu sodného s koncentráciou od 0,3 do 1% a na semená nechávajú roztok pôsobiť po dobu 5 až 45 minút (a to v závislosti na druhu), pričom 1% roztok NaOCl používa na sterilizáciu u rodu *Dactylorhiza* na 8-15 minút; na druhy s „tenkým osemením“ ako sú stredoeurópske druhy rodu *Orchis* odporúčajú 0,5% NaOCl na 10-15 minút a u rodu *Ophrys* 0,3-0,5% roztok na len 4-8 minút pričom nie je nutné stratifikovať. Pri rode ako *Gymnadenia*, *Platanthera*, *Coeloglossum* a *Nigritella*, ktoré majú „hrubšie osemenie“ odporúča 1% NaOCl na 15-20 minút, pričom predtým používa ešte kyselinu sírovú (2/9 M) na 10 minút ([Malmgren et Nyström 2013](#)).

Pri svojej práci s rodom *Cypripedium* používal aj Steele ([1996](#)) 0,5% roztok NaOCl u *Cypripedium acaule* na 2 hodiny, pričom popisuje že Anderson ([1990](#)) u toho istého druhu používal 6 h dezinfekciu tým istým roztokom. Steele ([1996](#)) dezinfikoval *C. arietinum* s najlepším výsledkom po 2h 35min dezinfekcie, pri dlhších aj kratších časoch (1h 30 min a 2h 55min) bol neúspešný. *C. candidum* klíčilo najlepšie po 66 minútach vyplachovania v chlórnanom a so zvyšujúcou sa dĺžkou preplachovania chlórnanom pozoroval zvyšujúcu klíčivosť; taktiež Anderson ([1990](#)) dosiahol najlepšie výsledky s 2 hodinami vyplachovania v chlórnanom, podobne dlho – 64 min dezinfikuje Steele ([1996](#)) aj *C. fasciculatum* a 30 min *C. guttatum* s 90 % výslednou klíčivosťou, a *C. parviflorum* dezinfikuje 60 min.

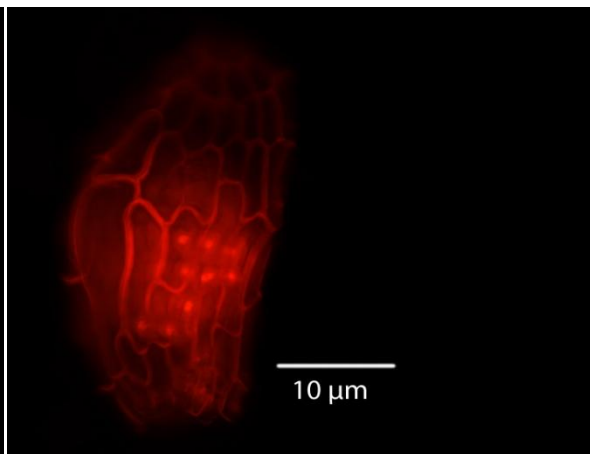
Aj Stoutamire ([1996](#)) používa 0,5% NaOCl (zriedený Chlorox) a naznačuje že osemenie pomocou NaOCl oxiduje a semená klíčia rýchlejšie, a predpokladá že nepriepustnosť vonkajšieho osemenia je mechanizmus vnútornej dormancie spojený zo stratifikáciou. Uvažuje tiež že strata vodeodolnosti umožňuje semenu začlenenie do pôdy. 5% roztok Chlorox-u používa aj Yanetti ([1996](#)) a sterilizuje až kým semená *Arethusa bulbosa* nezačnú blednúť (10-15min). 10% chlorox s prídavkom zmáčadla tween 20 používa Chu et Mudge ([1996](#)). Aj Steele ([1996](#)) pripomína, že roztok chlórnanu možno pripraviť z komerčného bielidla s obsahom 5% NaOCl poznamenáva, že musí byť čerstvo pripravený. Používanie čerstvého roztoku chlórnanu doporučujú viacerí autori ([Yanetti 1996](#), [Bruns et Read 2000](#), [Arditti 2008](#) a ďalší).

Čas dezinfekcie je veľmi dôležitý, dlhá dezinfekcia totiž semená zabíja ([Ponert et al. 2011](#), [Malmgren et Nyström 2013](#)), Steele ([1996](#)) popisuje že so zvyšujúcim sa časom dezinfekcie stúpa klíčivosť, ale zároveň stúpa mortalita semien, a každý druh vyžaduje inú dĺžku dezinfekcie. K podobnému záveru dospel aj Lindén(1980), ktorý tiež zistil, že do určitého času dezinfekcie

klíčivosť prudko stúpa a potom zas klesá s ďalšiou dezinfekciou chlórnanom.



Obrázok č. 3: Semeno *Chamorchis alpina*, s prasknutým osemením a mŕtvym embryom ktorému červeno svietia jadrá mŕtvych buniek, fluorescencia excitácia zeleným svetlom, prifarbené farbivom fluorescín diacetát a propidiumiodid



Obrázok č. 4: Semeno *Chamorchis alpina*, s kompaktným osemením a len s embryom obsahujúcim mŕtve bunky; mŕtvym bunkám červeno svietia jadrá, excitácia fluorescencia zeleným svetlom, prifarbené farbivom fluorescín diacetát a propidiumiodid

Rozdielne doby dezinfekcie u rôznych druhov sú pravdepodobne spojené s rôznou štruktúrou ich osemenia ([Van Waes et Debergh 1986](#)). Stanovenie optimálnej doby dezinfekcie chlórnanmi je niekedy náročnejšie. Harvais et Hadley ([1967](#)) dezinfikovali semená *Dactylorhiza purpurella* až pokým nevybledli (120 minút v $\text{Ca}(\text{OCl}_2)$), zistili že vtedy klíčia. Ak semená sterilizovali kratšiu dobu bola klíčivosť nižšia. Vyblednuté semená po ošetrení chlórnanom a etanolom klíčili aj iným autorom ([Michl 1988](#)). Harvais ([1980](#)) si u druhu *Cypripedium reginae* všimol, že keď sa semená potopia počas dezinfekcie chlórnanom, je to najlepší čas na výsev a prisudzoval to tomu že vyplachovanie bieliacim roztokom sa odstraňuje suberín z osemenia a unikajú plyny spomedzi osemenia a embrya.

Aj Michl ([1988](#)) poznamenal že klíčia len semená na ktoré bol už aplikovaný chlórnan a účinnosť dezinfekcie sa zvyšuje pri použití pomerne vysokého množstva chlorového vápna. Vejsadová ([2006](#)) tvrdí že úplne vyblednuté semená už neklíčia a vysievať treba v momente keď začnú blednúť, rovnaký postup dodržiava aj Jeřábková ([2006](#)). Vejsadová ([2006](#)) tak používa 0,5% NaOCl pokým semená nezačnú blednúť (40-50 min).

3.1.1.3 Iné oxidačné činidlá

Ďalšie oxidačné činidlá, ako peroxid vodíka (H_2O_2) a hydroxid sodný (NaOH) majú na klíčivosť tiež rozdielny efekt. Peroxid vodíka je pre semená škodlivý ([Michl 1988](#), [Rasmussen 1995](#)) no občas

sa používa ([Bruns et Read 2000](#); v kombinácii s Tween 80 u rodu *Sarcodes*), zatiaľ čo hydroxid sodný zvýšil klíčivosť ([Eiberg 1970](#)). Eiberg ([1970](#)) zistil že pôsobením 4N NaOH na 15 minút zlepšilo klíčivosť. Z toho sa dá usúdiť že zásaditosť roztoku aplikovaného na semená pred vysadením je dôležitá a nie jeho oxidatívny efekt ([Rasmussen 1995](#)).

3.1.1.4 Detergent

Pre efektívne chemické ošetrovanie osemenia vodnými roztokmi je vhodné použiť detergent. Detergent zlepšuje kontakt semena s vodou ([Rasmussen 1995](#), [Arditti 2008](#)). Najpoužívanejší detergent je sorbitolanhydrid Tween 80 ([Van Waes et Debergh 1986](#), [Rasmussen 1995](#), [Bruns et Read 2000](#)), Tween 20 je ale tiež používaný ([Chu et Mudge 1996](#), [Tomita 1998](#), [Kmecová 2011](#) a ďalší); používanie iných nie je dostatočne preskúmané. Detergent Teepol je pre orchideové semená škodlivý ([Harvais 1980](#)). Kmecová ([2011](#)) pri testovaní vplyvu detergentu Tween 20 pri dezinfekcii semien u 2 dobre klíčiacych druhov nepozorovala žiadny efekt.

Pri symbiotickom výseve *Dactylorhiza majalis* využívajúcom 5% NaOCl po dobu 6 min bola pridaná asi kvapka komerčného detergentu Tween 80 ([Rasmussen 1990](#)). Eiberg ([1970](#)) si všimol že ak sa koncentrácia detergentu Tween zvýši nad 0,5%, tak klesá klíčivosť. U iných autorov nebol problém ani pri vyšších koncentráciách (asi 1%; [Rasmussen 1995](#)). Pri asymbiotickom výseve *Pseudorchis albida* používa Jeřábková ([2006](#)) 3 kvapky Tween 80. Podľa Arditti ([2008](#)) používa väčšina laboratórií Tween 20, no poznamenáva že v domácich podmienkach možno použiť tekutý detergent pre domácnosti alebo detský šampón. Stoutamire ([1996](#)) nepoužíva detergent s odvolaním na Rasmussen ([1995](#)), ktorá popisuje že je pravdepodobne toxický. Ďalší používaný detergent je Triton. 0.01% Triton (X-114) po dobu 10 min v kombinácii s NaOCl používali Dowling et Jusaitis ([2012](#)). Detergenty sa používajú v roztoku chlórnanu alebo iného oxidačného činidla (napr. [Bruns et Read 2000](#)). Efekt pridaného detergentu je väčšinou malý, no zlepšuje zmáčavosť semien a je vhodné používať pri semenách druhov ťažko klíčiacych. Použiteľné by mohli byť aj komerčné detergenty (Jar) ktoré sa používajú u iných rastlín.

3.1.1.5 Kyselina sírová

V prípade že chceme narušiť osemenie a tým zrušiť dormanciu, u niektorých druhov orchideí sa používa ešte kyselina sírová spolu s použitím chlórnanu ([Ponert et al. 2011](#), [Malmgren et Nyström 2013](#)). Napríklad u druhu *Pseudorchis albida* viedlo k úspešnému klíčeniu pôsobenie 2% H₂SO₄ na 10 minút v kombinácii s Ca(OCl)₂ a etanolom ([Ponert et al. 2013](#)). Malmgren et Nyström ([2013](#)) používajú na prelamanie dormancie 2% H₂SO₄ na 10 minút u rodu *Dactylorhiza*, *Gymnadenia* či *Orchis*. Malmgren ([1996](#)) používa 0,5 – 2% roztok (0,05 – 0,2 M) H₂SO₄ a odporúča okamžite dezinfikovať v chlórnanu; čas dezinfekcie sa po použití H₂SO₄ skrátí a stačí použitie slabšieho chlórnanu a pre druhy rodu *Cypripedium* ktoré klíčia horšie odporúča použiť práve 2% H₂SO₄ na

10-15 minút a následne NaOCl. Malmgren ([1996](#)) popisuje dosiahnutie nízkych klíčivostí s *Orchis militaris* a *O. purpurea* bez použitia H_2SO_4 , avšak pri použití H_2SO_4 na 10 minút v prípade *O. purpurea* a v kombinácii H_2SO_4 s pôsobením chladu po vysievaní u *O. militaris* dosahuje vysokých klíčivostí u oboch druhov.

Malmgren ([1996](#)) u *Gymnadenia conopsea*, *Nigritella nigra* a *Platanthera bifolia*, pozoruje lepšie výsledky ak pred dezinfekciou NaOCl použije H_2SO_4 a pôsobenie chladom. 1% H_2SO_4 a NaOCl zabezpečila 100 % klíčivosť *Himantoglossum hircinum* ([Malmgren 1996](#)). Malmgren (osobné zdelenie) doporučuje používať H_2SO_4 pred aplikáciou chlórnanu v prípade výsevu ťažko klíčiacych druhov.

3.1.1.6 Voda

Semená niekedy klíčia aj po dlhodobom máčaní vo vode, ktoré tiež narušuje dormanciu semien ([Rasmussen 1995](#)). Mimo fakt že lúhovanie vo vode zvyšuje pravdepodobnosť pretečenia vody k embryu, taktiež vyplavuje inhibičné látky zo semena ([Rasmussen 1995](#)). Van Waes et Debergh ([1986](#)) a Van Waes ([1984](#)) popisujú vyplavovanie ABA zo semien počas dezinfekcie chlórnanom, no u niektorých druhov môže byť pravdepodobne vyplavovaná aj lúhovaním vo vode.

Semená terestrických druhov sú viac hydrofóbne ako semená epifytov ktoré vlnú rýchlejšie ([Stoutamire 1996](#)). Semená *Platanthera leucophaea* plávali na hladine aj po 2 hodinách oxidácie v bieliacom roztoku ([Stoutamire 1996](#)). Existujú ale aj iné mechanické adaptácie pre kontakt s vodou. Osemenie u rodu *Sobralia* má tri druhy buniek, pričom dva z nich spôsobujú že časť osemenia je skrútená a hilum je uzavreté. Bunkové steny týchto buniek reagujú na vodu. Za sucha sú tieto bunky zovreté a voda sa nedostane k embryu, po dlhšom kontakte s vodou sa osemenie „rozmotá“ a je umožnený prienik vody k embryu. Tento mechanizmus zabraňuje tomu aby semeno vyklíčilo pri slabom navlhnutí ([Prutsch et al. 2000](#)).

3.1.1.7 Iné spôsoby narúšania dormancie a dezinfekcie semien.

Skôr ojedinelé je použitie iných skarifikačných postupov. Množstvo autorov predpokladá, že pre zrušenie dormancie semien orchideí je kľúčové narušenie osemenia. Butcher et Marlow ([1989](#)) odporúčali mechanické narúšanie orchideových semien no podľa Rasmussen ([1995](#)) sa jedná o nepraktický spôsob skarifikácie pretože semená orchideí a mykoheterotrofov sú malé. Arditti et Ghani ([2000](#)) či Lee et al. ([2007](#)) popisujú narúšanie osemenia ultrazvukom, a táto metóda zvýšila klíčivosť semien. Miyoshi et Mii ([1988](#)) používali na ošetrovanie semien *Calanthe discolor* ultrazvuk po dobu 4 minúty, ktorý odstránil osemenie a semená následne klíčili lepšie.

Arditti ([2008](#)) odporúča aplikovať dezinfekciu plynom na niektoré semená, ktoré z rôznych dôvodov nejde dezinfikovať inak. Plyn vytvára pridaním 3 ml koncentrovanej HCl do 100ml komerčného bielidla pre domácnosti (Clorox, Purex, Domestos), ktoré obyčajne obsahuje 5.25% chlórnanu sodného.

Vyššie popísané spôsoby sa prakticky nevyužívajú. Používajú sa na miesto toho zaužívané metódy skarifikácie chlórnanmi.

3.1.2 Dusík

Forma dusíka v médiu pri výsevoch *in vitro* ovplyvňuje klíčenie orchideí ([Ponert et al. 2013](#)). Výber vhodnej formy dusíka je závislý na druhu orchidey ([Van Waes et Debergh 1986](#)). Orchidey klíčia na organickom dusíku ([Lugo 1955](#), [Van Waes et Debergh 1986](#)), a niekedy sa používajú pri kultivácii *in vitro* aj médiá s obsahom anorganického dusíku ([Pierce et Cerabolini 2011](#), [Ponert et al. 2011](#)). Nadarajan et al. ([2011](#)) zistil že preferujú skôr dusík z aminokyselín, ako z NH_4^+ alebo amónnych solí. Jediná práca popisuje aj stimulačný efekt NO_3^- ([Ichihashi et Yamashita 1977](#)) zatiaľčo mnohí autori popisujú inhibičný efekt nitrátov ([Eiberg 1970](#), [Van Waes et Debergh 1986](#), [Sgarbi et al. 2009](#)). [Ponert et al. 2013](#) popisuje negatívny vplyv dusíku na klíčenie *Pseudorchis albida* už pri nízkych koncentráciách (2 mg NO_3^-/l). Zdá sa klíčenie druhov, ktoré rastú v oblastiach chudobných na živiny ako *Pseudorchis albida* ([Jersáková et al. 2011](#)) sú inhibované nitrátmi a druhy rastúce na lúkach a stanovištiach bohatších na živiny ako rody *Anacamptis*, *Orchis* či *Ophrys* klíčia aj na médiách s obsahom nitrátov ([Ponert et al. 2011](#), [Malmgren et Nyström 2013](#), [Ponert et al. 2013](#)).

3.1.3 Fytohormóny

Fytohormóny ovplyvňujú vnútornú (fyziologickú) dormanciu semien. Najviac používané sú cytokiníny a z nich kinetín ([Ponert et al. 2013](#)) a majú väčšinou pozitívny vplyv na klíčenie semien orchideí, aj keď v niektorých prípadoch bol pozorovaný ich inhibičný efekt na klíčenie. Cytokinínom sa v súvislosti s orchideami a klíčením ich semien venuje najviac publikácii spomedzi všetkých fytohormónov Lindén ([1980](#)) uvažuje o tom, že bielenie (vyplachovanie chlórnanom používané k dezinfekcii semien pred výsevom *in vitro*) vyplavuje alebo ničí inhibitory rastu. Väčšie množstvo prác sa zaoberá len vplyvom cytokinínov a auxínov, menej GA, ABA a etylénom a u ďalších skupín fytohormónov (etylén, jasmonáty, brassinosteroidy) je nutný ďalší výskum. Množstvo prác sa ale venuje vplyvu fytohormónov na organogézu a neskoršie štádiá ontogenézy ([Ueda 1969a](#), [Ueda 1969b](#), [Fonnesbech 1972](#), [Nakamura et al. 1982](#), [Wotavová-Novotná et al. 2007](#), [Ponert 2009](#), a ďalší).

3.1.3.1 Cytokiníny

Exogénny cytokinín pridaný do média zvyšuje klíčivosť u mnohých druhov ([Harvais 1980](#), [Harvais 1982](#), [Van Waes et Debergh 1986](#), [De Pauw et al. 1995](#), [Rasmussen 1995](#), [Steele 1996](#), [Steward et Kane 2006](#), [Pierce et Cerabolini 2011](#)). Benzyladenín (BA) či kinetín zvýšili klíčivosť u mnohých druhov ([Borris 1969](#), [Harvais 1982](#), [Van Waes et Debergh 1986b](#), [Miyoshi et Mii 1998](#)), a boli pre klíčivosť prospešné už pri koncentrácii 0,88 μM u BA u druhov *Epipactis heleborine* či *Cypripedium*

calceolus ([Van Waes et Debergh 1986](#)) a v koncentrácii 0,5 - 5mg na liter média v prípade kinetínu ([Borris 1969](#), [Harvais 1982](#), [Van Waes 1984](#)). Efekt cytokinínov bol pozorovaný u druhov vyžadujúcich stratifikáciu chladom a cytokiníny možno prinášajú odpoveď rovnakú ako po stratifikácii a majú opačné efekt k ABA ([Rasmussen 1995](#)). Inhibičný alebo žiaden efekt cytokinínov na orchidey bol pozorovaný pri 6 – benzylaminopuríne na klíčivosť *Orchis mascula* ([Borris et Voight 1986](#)), a u kinetínu na *Pterostylis vittata* ([Wilkinson et al. 1994](#)). Tieto dva výsledky ale môžu len poukazovať na druhovo špecifickú odpoveď rastlín na cytokiníny a iná koncentrácia fytohormónu by pravdepodobne klíčivosť podporovala ([Ponert et al. 2013](#)). Steele ([1966](#)) pri používaní kinetínu zistil rýchlejšiu klíčivosť a pozitívny efekt kinetínu (1 µM) pozoroval na *Calanthe macranthos* aj Miyoshi et Mii ([1998](#)). Harvais ([1982](#)) u druhu *Cypripedium reginae* zistil že najlepší výsledok z testovanými aminopurínmi dosiahol s kinetínom a to v koncentrácii 0,5-1 mg/l. Steele ([1996](#)) používa 1,2 mg/l kinetínu a do média ho dáva pred autoklávovaním; prídanie ďalšieho 0,2mg/l nahradí straty kinetínu termodegradáciou. Takáto koncentrácia funguje u väčšiny druhov rodu *Cypripedium*. Steele ([1996](#)) tiež pozoroval, že dlhšia doba bielenia môže byť náhrada za použitie kinetínu a ďalšie experimenty s inými druhmi rodu *Cypripedium* ukázali podobný efekt pri iných druhoch a zistili že po dlhodobom preplachovaní v chlórname netreba pridávať exogénny cytokinín. Steele ([1996](#)) pozoroval u niektorých druhov *Cypripedium* že klíčenie podporuje prídanie cytokinínu (používa kinetín), ale tento inhibuje rast protokormov, teda v ďalších štádiách vývoja protokormov treba tieto presadiť na médium bez cytokinínov, pozoroval to napr. u *C. arietinum*, *C. candidum*, *C. yatabeanum*. Potrebu pridať cytokinín nepozoroval u *C. californicum*, *C. guttatum* či *C. passerinum* ([Steele 1996](#)). Ponert ([2009](#)) dosiahol najvyššej klíčivosti na médiu obsahujúcom kinetín no podobne ako Steele ([1996](#)) zistili aj Ponert et al. ([2013](#)), že protokormy rástli rýchlejšie na médiu bez kinetínu a kinetín rast protokormov inhiboval.

Dactylorhiza maculata a *Listera ovata* klíčili najlepšie na médiu bez BA ([Van Waes et Debergh 1986](#)).

3.1.3.2 Giberelíny

Na rozdiel od väčšiny ostatných rastlín, zdá sa že giberelíny nemajú stimulačný efekt na klíčenie orchideí (napr. [Rasmussen 1995](#), [Ponert 2009](#) a citácie vo vnútri). GA₃ spôsobila pokles klíčivosti u niektorých orchideí ako u symbiotickej kultúry *Pterostylis vittata* ([Wilkinson et al. 1994](#)) a u ďalších nemala žiaden efekt ([Hadley et Harvais 1968](#), [Borris et Voigt 1986](#), [Van Waes et Debergh 1986](#), [Rasmussen 1995](#)). GA₃ ale podporovala klíčenie u rastliny *Empetrum hermaphroditum* (ktorá prachové semená nemá, ale patrí do čeľade *Ericaceae*, u ktorých sa vyskytujú prachové semená) pri použití 1000 mg/l a vysievaní na filtračný papier s destilovanou vodou ([Baskin et al. 2002](#)).

3.1.3.3 ABA

U orchideí je jej efekt výrazný a to už pri veľmi malých koncentráciách ([Rasmussen 1995](#)).

U orchideí bola detekovaná u *Epipactis helleborine* a *Dactylorhiza maculata* ([Van Waes 1984](#), [Van Waes et Debergh 1986](#), [Van der Kinderen 1987](#)) a minimálne Van Waes ([1984](#)) preukázal, že znižuje klíčivosť u *E. helleborine* a to už v nízkych koncentráciách (koncentrácia 10^{-7} M znížila klíčivosť na polovicu a pri 10^{-6} M semená neklíčili vôbec). U semien tohto problematicky klíčiaceho druhu bola zistená výrazne vyššia hladina ABA než u druhov dobre klíčiacych ([Van der Kinderen 1987](#)). Lee et al. ([2007](#)) pozoroval zvyšovanie obsahu ABA s dozrievaním semien u *Calanthe tricarinata* medzi 60 – 210 DAP. Van Waes et Debergh ([1986](#)) a Van Waes ([1984](#)) popisuje vyplavovanie ABA zo semena počas preplachovania chlórnanom a Van Waes ([1984](#)) pozoroval, že po 2 hodinách sterilizácie semien *Dactylorhiza maculata* nebola ABA takmer detekovateľná a exogénne aplikovaná ABA inhibovala klíčenie semien. Tak, ako aj u iných rastlín má teda ABA u orchideí inhibičný efekt na klíčenie ([Van Waes 1984](#)).

3.1.3.4 Auxíny

Van Waes ([1984](#)) nepreukázal u 8 z 9 druhov orchideí takmer žiaden efekt IAA, IBA či NAA na klíčivosť semien terestrických orchideí. V niektorých prípadoch auxíny zabezpečili ešte mierne nižšiu klíčivosť. Inhibičný efekt IAA na klíčenie *Dactylorhiza purpurella* pozorovali aj Hadley et Harvais ([1968](#)). Eiberg ([1970](#)) pozoroval že klíčivosť bola silne inhibovaná TIBA (2, 3 5-trijodobenzoová kyselina) ktorý je inhibítorom auxínu a tento inhiboval klíčenie u *Dactylorhiza maculata*. už pri nízkych koncentráciách (2 ppm). U druhu *Orchis mascula* Borris et Voight ([1986](#)) pozorovali výrazné zvýšenie klíčivosti po pridaní 2 ppm NAA. Klíčivosť u symbiotického výsevu bola lepšia po použití IAA u *Pterostylis vittata* ([Wilkinson et al. 1994](#)). Zdá sa teda že efekt auxínov je závislý od druhu či na kultivačných podmienkach a môže byť stimulačný aj inhibičný.

3.1.3.5 Etylén

O efekte etylénu na semená orchideí je len málo dát, ale zdá sa že jeho efekt na klíčenie orchideí je stimulačný ([Rasmussen 1995](#)). Etylén zvyšoval klíčivosť u symbiotickej aj asymbiotickej kultúry u *Dactylorhiza majalis* aj pri veľmi nízkych koncentráciách ([Johansen et Rasmussen 1992](#)) a taktiež zvýšil klíčivosť u *Galeola septentrionalis* v koncentráciách 2 – 8 μ l/l a jeho odstránenie znížilo klíčivosť ([Nakamura et al. 1975](#)). Etylén nemal negatívny účinok na klíčenie ani pri vyšších koncentráciách ([Rasmussen 1995](#)) a jeho produkcia bola pozorovaná na asymbiotickom klíčení tropických orchideí kde dosiahla 125 μ l/l ([Hailes et Seaton 1989](#)), čo naznačuje že orchideové semená a ich klíčivosť sú k etylénu tolerantné aj pri takto vysokých koncentráciách ([Rasmussen 1995](#)).

3.1.4. Svetlo

Požiadavky orchideí na svetlo pri klíčení sa líšia. Niektoré druhy vyžadujú aspoň zo začiatku kultivácie tmu ([Van Waes et Debergh 1986](#), [Arditti 2008](#), [Anderson 1996](#), [Sgarbi et Prete 2009](#)), iné klíčia na svetle ako napríklad americká orchidea listnatých lesov *Calopogon tuberosus* ([Whitlow 1996](#)). Niektoré druhy rodu *Epipactis* klíčia dobre aj na svetle, no lepšie klíčia v tme a niektoré druhy môžu klíčiť dobre buď v tme ale aj na svetle v závislosti na tom, na akej lokalite boli semená zbierané ([Van Waes et Debergh 1986](#)).

Väčšina autorov však semená ukladá do tmy ako Jeřábková ([2006](#)) pri asymbiotickom pestovaní *Pseudorchis albida*, rovnako ako aj Vejsadová ([2006](#)) tiež pri asymbiotickom výseve 2 druhov rodu *Dactylorhiza* a *Liparis loeselii*. *Habenaria tridactylites* tiež vyžaduje tmu, pokým semená nevyklíčia a rovnako tak množstvo ďalších európskych druhov (vlastné pozorovanie), severoamerických ako *Aerethusa bulbosa* ([Yannetti 1996](#)) ale aj tropických druhov ([Park et al. 2012](#)).

Osvetlenie redukovalo klíčivosť *Coeloglossum viride* a *Dactylorhiza purpurella*, dokonca u *C. viride* takmer úplne inhibovalo klíčenie, pričom zo vzrastajúcim osvetlením klesala klíčivosť a po premiestnení nevyklíčených semien *D. purpurella* do tmy tieto vyklíčili čo dokazuje inhibičný vplyv svetla na klíčenie semien; na vývoj protokormov už svetlo nemalo negatívny vplyv ([Harvais et Hadley 1967](#)).

Mnohé terestrické orchidey klíčia pri fotoperióde bieleho svetla, ale nie za trvalého osvetlenia ([Stoutamire 1964](#) a ďalší). U druhu *Habenaria macroceratitis* boli pri symbiotickom výseve semená kultivované v tme, a to tak že petriho misky boli obalené albobalom, pri 16h fotoperióde a pri stálom osvetlení ([Stewart et Kane 2006](#)). Najvyššia klíčivosť bola dosiahnutá pri stálej tme, ale vysoká klíčivosť bola dosiahnutá prekvapivo aj za stáleho osvetlenia. Najnižšia klíčivosť bola pri fotoperióde 16h svetla ([Stewart et Kane 2006](#)). Klíčivosť *Dactylorhiza majalis* v tme bola výrazne zvýšená, ak sa na semená predtým svietilo bielym svetlom 16 hodín denne po dobu 10-14 dní, dlhšia expozícia svetlom mala negatívny efekt ([Rasmussen et al. 1990](#)) Len 2 % semien vyklíčili na fotoperióde ihneď, nakoľko vyžadovali asi 14 dní úplnej tmy. Prerušenie takéhoto tmavého obdobia dvoma nasledovnými fotoperiódami zvýšilo klíčivosť ak tieto prerušenia boli prevedené pred 8 dňom ([Rasmussen et al. 1990](#)).

To že niektoré druhy klíčia v tme je pravdepodobne mechanizmus, ktorý umožňuje semenám klíčiť až keď sú pod povrchom zeme, kde klíčiace semeno nebude vystavené takým zmenám teploty či vlhkosti ([Stoutamire 1996](#)). Stoutamire ([1996](#)) napríklad u *Platanthera leucophaea* nepozoroval klíčenie u semien na povrchu substrátu, ale len pod zemou, uvažuje o dáždovkách ako o vektoroch, ktoré semená zahrabú do zeme.

Nepodarilo sa mi dohľadať žiadne informácie o inhibičnom vplyve svetla na klíčenie epifytných druhov čeľadi *Orchidaceae*, ktoré na svetle pravdepodobne klíčia, nakoľko klíčia na povrchu iných rastlín.

3.1.5 Nezrelé semená

Yamazaki et Miyoshi (2006) odoberali semená ručne opelenej orchidey *Cephalanthera falcata* v rôznych DAP. Najväčšia klíčivosť bola v 70 DAP a po 80 DAP sa znižovala, medzi 100-120 DAP bola klíčivosť len minimálna, oplodnenie nastáva podľa Nagashima (1979) 38-40 DAP. Pri farbení safraninom pozorovali svetlo červené zafarbenie vnútorného integumentu (odpovedajúcemu vnútornému osemeniu) u semien starých 70 DAP čo naznačuje že lignifikácia (pozri kapitola 2) sa objavuje v tomto čase. Väčšina semien starých 80 – 100 DAP boli živé usudzujúc podľa toho že TTC farbenie zafarbilo 84 – 99 %. Teda semená v tomto štádiu už boli dormantné. Ako je popísané v kapitole 2, Yamazaki et Miyoshi (2006) pozorovali lignifikáciu a kutinizáciu vnútorného osemenia, čo môže vytvárať dormanciu semien v určitom čase po opelení a semená sú do tejto doby schopné vyklíčiť. Vnútorné osemenie môže mať dôležitú úlohu v mechanickej a chemickej regulácii klíčenia minimálne u tohto druhu. Dospelé semená ktoré autori zbierali 140 DAP sa roztokom TTC nezafarbili, pokiaľ nebolo vnútorné osemenie odstránené pinzetou (Yamazaki et Miyoshi 2006). Z toho usudzujú, že roztok neprejde cez vnútorné osemenie a to asi od 100 DAP. Farbením pomocou TTC zisťovali životaschopnosť nezrelých semien u *Dendrobium nobile* aj Vasudevan et van Staden (2010) a zistili že životaschopnosť bola nižšia pri 96 DAP, podstatne sa zvýšila pri 116 DAP a bola nižšia pri 129 a 158 DAP. Taktiež pozorovali kutinizáciu a lignifikáciu ale v 158 DAP nebola oblasť suspensoru kutinizovaná (vnútorný integument) a lignifikácia na vonkajšom integumente nebola celistvá, obsahovala medzery, čo umožňuje lepšiu hydratáciu a poukazuje na to, že epifytické orchidey klíčia lepšie ako terestrické.

Nezrelé semená často klíčia lepšie ako zrelé, čo je pravdepodobne spôsobené nástupom dormancie počas dozrievania (Rasmussen 1995). Vysievanie čiastočne nevyvinutých semien, kde sa zbierajú zelené tobolky pred dozretím používajú viacerí autori (napr. Michl 1988, Malmgren 1996, Arditti 2008, Sgarbi et Prete 2009, Park et al. 2012, Malmgren et Nyström 2013 a ďalší). Väčšinou sa na výsevy *in vitro* používajú nezrelé semená tých druhov, ktorých zrelé semená inak neklíčia. Tieto druhy majú vyvinutú silnejšiu dormanciu semien, ktorá sa pravdepodobne utvára až v posledných štádiách dozrievania semien, preto nezrelé semená u takýchto druhov vyklíčia narozdiel od zrelých. Posúdiť správnu dobu kedy zbierať nezrelé semená je náročné (Malmgren 1996, Malmgren et Nyström 2013; vlastné pozorovanie) a jediná cesta ako zistiť ako je embryo vyvinuté sa zdá byť pomocou porovnania s ostatnými štúdiami popisujúcimi čas, ktorý uplynul od opelenia po oplodnenie a na dospelosť semena (Rasmussen 1995), alebo anatomické štúdium semien v tobolkách (Yamazaki et Miyoshi 2006). Iba 5-7 dní môže oddeľovať semená ktoré sú príliš mladé na to, aby vyklíčili a tie ktoré sú úplne zrelé (Malmgren et Nyström 2013). U rodu *Cypripedium* je správne štádium na zber semien 49 – 70 DAP v závislosti na druhu, pričom počasie ovplyvňuje dozrievanie. Vysievaním nezrelých semien sa dá dosiahnuť klíčivosť viac ako 75 %. Michl (1988) odporúča 28-42 DAP u rodu *Orchis*, a o niečo viac DAP u rodu *Cypripedium* a u

Gymnadenia conopsea odporúča 42 DAP. Najvhodnejšia doba na zber sa ale líši v závislosti na počasí a najlepšie je zrelosť posúdiť mikroskopicky (napr. podľa štruktúrneho stavu embryí a že semená sú biele). Niektorí autori zas odporúčajú zbierať semená v 2/3 zrelosti ([Michl 1988](#), [Veisadová et Malá 1996](#), [Jeřábková 2006](#)) Nezrelé semená používa aj Yannetti ([1996](#)) u *Arethusa bulbosa*, zelené tobolky zbiera „60 dní staré“ (pojmom „ 60 dní staré“ autor pravdepodobne označuje 60 DAP), ale klíčia aj semená z toboliek „45 dní starých“. Podobne Steele ([1996](#)) napr. u *Cypripedium montanum*, zbiera semená menej ako 42 DAP. U tropických zástupcov ako *Gastrodia elata* zbiera nezrelé tobolky pred prasknutím aj Park et al. ([2012](#)) a to už v 18 – 21 DAP, tieto následne klíčia v symbiotickej kultúre *in vitro*. Zelené tobolky bývajú skladované najčastejšie pri teplote 4°C (napr. [Sgarbi et Prete 2009](#), [Park et al. 2012](#)). Dezinfikujú sa buď v roztoku chlórnanu (napr. 20 minút v 5% roztoku; napr. [Sgarbi et Prete 2009](#), a následne v EtOH), a opaľujú (napr. 90% EtOH; [Sgarbi et Prete 2009](#), 100% EtOH; [Vasudevan et van Staden 2010](#)), alebo sa dezinfikuje len chlórnanom alebo len etanolom (napr. [Park et al. 2012](#)- 95% EtOH a opáliť).

Po vysadení zreých semien *Pseudorchis albida*, semená vyklíčili po 1 roku ([Ponert et al. 2011](#)), zatiaľ čo ak boli semená zbierané nezrelé, klíčili už po 5-6 mesiacoch ([Jeřábková 2006](#); [Pierce et Cerabolini 2011](#)). Dlhý čas od vysievania po vyklíčenie je asi spôsobený tým že sa jedná o horský druh klíčiaci po dlhom období chladu ([Jersáková et al. 2011](#)). Michl ([1988](#)) nebol úspešný s pestovaním obligátne mykoheterotrofných druhov ako *Cephalanthera damasonium*, *Limodorum abortivum* či *Neottia nidus-avis*). Bol ale úspešný s výsevom druhov rodu *Epipactis* a *Cypripedium calceolus* ale s nízkou úspešnosťou. Nízkou úspešnosť pripisuje nevhodnej zrelosti semien. Michl ([1988](#)) pozoroval že nezrelé semená klíčia v asymbiotických podmienkach takmer vo všetkých testovaných prípadoch lepšie. Nezrelé semená klíčili rýchlejšie a skorej. Dobre klíčiaci druh *Dactylorhiza majalis*, klíči horšie v prípade že semená necháme úplne dozrieť na rastline, semená z tej istej rastliny klíčili lepšie, ak boli nezrelé aj u tohto relatívne dobre klíčiaceho druhu ([Michl 1988](#) a citácie vo vnútri). Frosh ([1980](#)) zistil pokles klíčivosti s postupným dozrievaním u druhu *Orchis morio* a doporučuje vysievať semená 42 DAP, zatiaľčo u rodov *Ophrys* a *Dactylorhiza* doporučuje výsev zreých semien. Michl ([1988](#)) zisil zas že ním testovaný zástupci rodu *Ophrys* klíčili lepšie pri použití nezreých semien.

Zrelé semená ostávajú životaschopné dlhšiu dobu ak sú chladené a ak po zbere z tobolky sú vysúšané na vzduchu. Nezrelé semená semená majú zas výhodu v tom že nemajú vyvinutú dormanciu a teda ju nie je nutné prelamovať ale semená je nutné vysádzať skôr ([Steele 1996](#)). Experimenty s nezreými semenami môžu byť zavádzajúce vzhľadom na ich odlišné správanie od zreých semien v prírode. Ak pestujeme orchidey v podmienkach *in vitro*, je lepšie použiť zreé semená pomocou ktorých vieruhodnejšie zistíme ako daný mechanizmus funguje aj v prírode ([Rasmussen 2011](#)).

3.1.6 Teplota

Požiadavky na teplotu rozdeľujú terestrické orchidey na také čo vyžadujú stratifikáciu chladom na vyklíčenie ([Ballard 1987](#), [Coke 1990](#), [Malmgren et Nyström 2013](#), [Malmgren 1996](#)) a tie ktoré klíčia dobre bez stratifikácie pri teplote 17 - 25°C ([Ponert et al. 2011](#), [Ponert et al. 2013](#), [Rasmussen 1995](#)). Väčšina druhov terestrických orchideí dobre klíči pri teplote okolo 23°C ([Van Waes et Degergh 1986](#)), či v rozmedzí 22 - 25°C ([Rasmussen 1995](#), [Anderson 1996](#) a ďalší). V nasledujúcom texte budú preto tieto skupiny pojednávané oddelene.

3.1.6.1 Druhy nevyžadujúce stratifikáciu

Druhy teplejších oblastí ako austrálske druhy *Pterostylis nutans*, *Microtis arenaria*, *Thelymitra pauciflora*, a *Prasophyllum pruinatum* klíčili v tme pri 20°C ([Dowling et Jusaitis 2012](#)). Taktiež druhy mierneho pásma ako *Limodorum abortivum* ktoré klíčilo z nezrelých semien pri 25°C ([Sgarbi et Prete 2009](#)) či druh *Dactylorhiza purpurella* kde bola najväčšia klíčivosť dosiahnutá pri 23°C a 29°C môžu klíčiť bez potreby stratifikácie ([Harvais & Hadley 1967](#)). Pri 11°C bola klíčivosť *Dactylorhiza purpurella* nízka (12 % po 6 mesiacoch) a nevyklíčené semená boli stále dormantné, a v prípade že boli prenesené do 25°C aj po 14 mesiacoch v 11°C začali klíčiť ([Harvais & Hadley 1967](#)). Trochu odlišné požiadavky boli zistené u druhu *Gymnadenia conopsea*, ktorá najlepšie klíčila pri nižších teplotách mierne pod 20°C pri symbiotickom výseve ([Rasmussen 1995](#)). Podobných výsledkov bolo dosiahnutých s blízko príbuzným druhom *D. majalis* a to v symbiotických i asymbiotických kultúrach. Najvyššej klíčivosti pri symbiotickom výseve in vitro, bolo dosiahnuté v teplotnom rozmedzí 21.2 -27.2°C, pričom najvyššia klíčivosť 53 bola dosiahnutá pri teplote 23.6 °C a 42 % pri 25.7 °C. Nad teplotným optimom pre druh *D. majalis* (23-25°C), bol zaznamenaný pokles v klíčivosti. Najvyššej klíčivosti pri asymbiotickom výseve in vitro – (21 %) bolo dosiahnuté pri teplote 23.5°C po 42 dňoch, klíčivosť okolo 20 bola docielená v teplotnom rozsahu 23.5 – 25.7°C. Nad týmto rozsahom klíčivosť opäť klesala. ([Rasmussen et al 1990](#)). Teplotné nároky pre klíčenie sa teda medzi symbiotickými a asymbiotickými kultúrami prakticky nelíšili. Semená *Dactylorhiza incarnata* umiestnené vo vode s detergentom klíčili najrýchlejšie pri teplote 23-24°C , zatiaľčo pri vyšších aj nižších teplotách vyklíčili za dvojnásobný čas ([Eiberg 1970](#)). Najvyššia klíčivosť u rodu *Cypripedium* bola dosiahnutá pri nižšej teplote – okolo 20°C ([Stoutamire 1974](#)). Pri teplotách mimo optimum semená ostávajú dormantné ([Harvais et Hadley 1967](#) a ďalší). Optimálne teploty pre klíčenie arktických a chladnomilnejších temperátnych druhov sa ukázali byť rovnaké, avšak temperátne druhy majú väčšiu toleranciu k extrémnejším teplotám ([Rasmussen 1995](#)). Tomita ([1998](#)) skúšal vplyv rôznych teplôt (15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 17,5°C) na klíčivosť *Calypso bulbosa* čo je druh cirkumpolárne rozšírený ([Delforge 2006](#), [Baumann et al. 2006](#)) a ako optimálna teplota sa ukázala 20°C.

Nakamura et al. ([1975](#)) dosiahli najlepšej klíčivosti v podmienkach in vitro u *Galeola septentrionalis* pri teplote 30°C, čo považuje za zvláštne nakoľko Hamada ([1939](#)) namerl na stanovišti výskytu

tejto rastliny pri Kjoto najviac 22°C.

Malmgren (1996) nepozoroval potrebu pôsobenia chladu u *Orchis morio* a *O.spitzelii* na rozdiel od *O.militaris* z rovnakých stanovišť vo Švédsku ako predchádzajúce dva druhy. Otázka prečo si ale tieto príbuzné druhy nie sú podobné z hľadiska nutnosti stratifikácie ostáva otvorená.

3.1.6.2 Druhy vyžadujúce stratifikáciu

Druhy, ktoré vyžadujú stratifikáciu, v prírode obvykle klíčia až na jar po chladnej zime (Ponert et al. 2013). Tento druh dormancie pravdepodobne bráni tomu aby semeno nevyklíčilo pred obdobím chladu - zimy. Doby používané na stratifikáciu sa líšia. Malmgren a Nyström (2013) odporúčajú 3 mesačné pôsobenie chladu. Malmgren (1996) využíva pôsobenie 2-5°C na 2 – 4 mesiace pre druhy, ktoré po samotnej dezinfekcii chlórnanom neklíčia. Aj Stoutamire (1974) u semien druhu *Cypripedium reginae* zistil zvýšenie klíčivosti po schladení na 5-10°C na niekoľko mesiacov a aj Ballard (1987) zistil, že skladovaním v chlade pri 5°C na 2 mesiace u tohto isteho druhu sa výrazne zvýšila klíčivosť. Ak boli semená chladené pred výsevom v suchom stave po dobu 1 rok klíčivosť sa blížila 100 %. Steele (1996) dáva do chladu 1-5°C všetky suché semená pred výsevom u rodu *Cypripedium*. Na druhú stranu Malmgren (pers com.) zdôrazňuje že v prípade kultivácie *in vitro* je nutné semená stratifikovať až po výseve na kultivačné médium. Semená *Platanthera leucophaea* klíčili po stratifikácii v podmienkach *in vitro* aj *in vivo* v 5°C. V podmienkach *in vivo* semená neošetrené v chlórnanom klíčili neskôr alebo až po druhej perióde chladu a klíčivosť vybielených semien bola vyššia. V podmienkach *in vitro* po 8 týždňoch v 4°C boli premiestnené do 24°C a tmy a klíčili (Stoutamire 1996). Druh *Pseudorchis albida* ktorý klíči po prezimovaní (Jersáková et al. 2011), úspešne vykličil po pôsobení chladu (2°C) po dobu 3 mesiace (Ponert et al 2013).

Steele (1996) taktiež pozoroval pozitívny efekt pôsobenia chladu na klíčivosť semien *Cypripedium californicum*. Niektorí autori ako Yannetti (1996) stratifikujú semená viacstupňovo, napr. u *Arethusa bulbosa* najprv 30 dní pri 10°C, potom v chladničke 4-5 mesiacov pri 3-4°C a následne zase na 30dní v 10°C.

Stratifikácia pri 20°C je dôležitá napríklad u druhu *Epipactis palustris*, predtým ako budú semená odpovedať na stratifikáciu chladom a nakoniec je nevyhnutné pôsobenie kompatibilnej huby (Rasmussen 1992). Pôsobenie chladu zrejme vyžadujú aj symbiotické aj asymbiotické kultúry. Poukazuje na to štúdia kde 3-4 °C na tri mesiace pozitívne ovplyvnilo germináciu napr. u *D. lapponica* a to ako v asymbiotických, tak aj v symbiotických kultúrach (Øien 2008)

3.1.7 After-ripening

After-ripening je perióda skladovania čerstvo odobratých dospelých semien, spravidla niekoľkých mesiacov za sucha, ktorá umožňuje prelomenie dormancie (Kucera et al. 2005, Bair et al. 2006, Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006). Mechanizmus, akým after-ripening pôsobí zatiaľ nie je

spoľahlivo objasnený.

Väčšina autorov semená pred výsevom skladuje v suchu ([Sharma et al. 2003](#), [Lauzer et al. 2007](#), [Kauth et al. 2008](#)), čím môžu vedome i nevedome doceliť after-ripeningu. Štúdie zamerané na after-ripening u mykoheterotrofných rastlín však stále chýbajú. Predchádza sa tak kontaminácii, ktorá môže vo vlhkom prostredí nastať a strata klíčivosti. ([Bidartondo et Bruns 2005](#)) zbierali semená rastlín podčeladi *Monotropoideae* (*Ericaceae*) a vysádzali ich po 2 mesačnom dosušení ako aj Těšitelová et al. ([2012](#)) pred výsevom dosúšajú zrelé tobolky kruštíkov pri izbovej teplote v papierových sáčkoch a pred výsevom semená asi 2 mesiace skladovali pri teplote 4°C. Mnohí autori popisujú len dosušanie semien ([Anderson 1996](#), [Stoutamire 1996](#), [Shimura et Koda 2005](#), [Lauzer et al. 2007](#)) či celých toboliek na vzduchu ([Bruns et Read 2000](#)) pri teplote 4-5°C. Stoutamire ([1996](#)) suší semená rodu *Cypripedium* vzduchom 5 dní pred výsevom a vzduchom suší tobolky *Pterospora andromedea* a *Sarcodes sanguinea* pri izbovej teplote 2-3 týždne aj Bruns et Read ([2000](#)).

Časté je tiež vysušenie semien pomocou silica gelu ([Johnson et al. 2007](#), [Steward et Kane 2006](#)). Leake et al. ([2004](#)) vysúša semená hniliakov 4 týždne v chloride vápenatom pri izbovej teplote, semená boli živé a úspešne klíčili *in situ*. Yoder et al. ([2010](#)) a Zettler et Hofer ([1998](#)) zas dosúšali nad bezvodým CaSO₄ na vysušenie na 7-14 dní na semená ihneď po zbere a potom ich skladovali zmrazené pri (-7°C) a Vejsadová et Malá ([1996](#)) sušila semená na vrstve CaCl₂. Vysušené semená skladovali v teplote -20°C. Johnson et al ([2007](#)) skladuje vysušené semená pred výsevom relatívne teplomilného druhu *Eulophia alta* v -10°C na niekoľko týždňov.

After-ripening sa u semien používa často, semená vďaka tomuto ošetreniu nekontaminujú a after-ripening pravdepodobne zlepšuje aj klíčivosť. Vďaka skladovaniu semien v suchu môže k after-ripening dochádzať veľmi často. Väčšinou sa však uvádza len význam pre obmedzenie kontaminácií či predĺženie životaschopnosti semien v nízkych teplotách. Efekt suchého skladovania bol testovaný len výnimočne. U rodu *Cypripedium* je však známe že požiadavku semien niektorých druhov na stratifikáciu možno nahradiť dlhším skladovaním v chlade a suchu pred výsevom ([Stoutamire 1974](#), [Ballard 1987](#)).

3.1.8 Hubový symbiont

Pre účely tejto práce nie je nevyhnutné popisovať mykoríznu symbiózu, množstvo informácií v češtine poskytuje kniha Gryndlera et al. ([2004](#)).

Najviac prác zaoberajúcich sa vplyvom húb na klíčivosť prachových semien sa týka orchideí a rodu *Monotropa* ([Leake 1994](#)). Tie sú minimálne spočiatku ontogenézy mykoheterotrofné ([Leake 1994](#), [Gryndler et al 2004](#), [Rasmussen et Rasmussen 2009](#)). Predpokladá sa, že dormancia orchideových semien je v prírode mimo iné narušovaná hýfami húb ([Rasmussen 1995](#), [Gryndler et al 2004](#), [Baláž 2011](#)). V literatúre som ale nenašiel podrobnejšie informácie o vplyve húb na prelamanie dormancie semien u rastlín s prachovými semenami. V ranných štádiách života je

u takýchto rastlín nutná kolonizácia hubou. Nutnosť skorej kolonizácie hubou vzrastá kôli faktu že nutričné zásoby pre rast embrya, sú u orchideí obsiahnuté len vo vlastných bunkách embrya, a v semene *Monotropa hypopitys* sú obsiahnuté v iba 9 bunkách veľmi malého endospermu ([Leake et al. 2004](#)). Možný vplyv húb na prelomenie dormancie sa dokladá prácami *in vitro*, kde u niektorých druhov asymbiotické výsevy z neznámych dôvodov neklíčia a klíčia len symbiotické ([Downie 1949](#), [Rasmussen 1995](#)).

Symbiotický výsev dosahuje väčšinou vyššej klíčivosti a k tej dochádza rýchlejšie ([Rasmussen et al. 1990](#), [Harvais et Hadley 1967](#)). Neplatí to však všeobecne, napr. Anderson ([1996](#)) dosiahol zo symbiotickými výsevmi horšie výsledky ako z asymbiotickými.

3.1.9 Klíčenie v prirodzených podmienkach

Na možný priebeh dormancie môžu poukazovať tiež údaje o klíčení v prirodzených podmienkach kde sa semená väčšinou neošetrujú, ale sledujú sa v pôde, pokiaľ nevyklíčia. Zásoba semien v povrchovej vrstve pôdy sa nazýva semenná banka ([Slavíková 1986](#)). Semená označované ako prachové semená sú ťažko dohľadateľné v pôde ak ich chceme skúmať, rovnako ako sú ťažko dohľadateľné po vyklíčení keď sa dlho (aj roky) živia paraziticky. Pokusy s kultiváciou *in vitro* nemusia mať rovnaký výsledok ako pokusy *in situ*. V *in vitro* podmienkach dochádza ku klíčeniu veľmi rýchlo, niekedy v priebehu týždňov či mesiacov ([Rasmussen 1995](#)), aj keď niektoré iné druhy klíčia po dlhej dobe ([Rasmussen et Pedersen 2012](#), [Ponert et al 2013](#)), alebo neklíčia vôbec ([Rasmussen 1995](#)).

Na pokusy s výsevmi *in vivo* sa používa metóda popísaná Rasmussenovou a Whighamom ([1993](#)) kde sa používa nylonový sáčik v ktorom sú uzavreté semená a tie sú uzavreté v dia rámčeku.

Niektoré druhy orchideí ako *Goodyera pubescens* nevydržia v semennej banke dlho, bolo zistené že klíčia už v prvom roku. U druhu *D. lapponica* bolo zistené že semená v semennej banke klíčia hneď po vysievaní ([Øien 2008](#)). *Corallorhiza odontorhiza* ostáva v semennej banke dlhšie a to až do 5 rokov a *Liparis liliifolia* či *Tipularia discolor* zotrývajú na lokalite až takmer 7 rokov ([Whigham et al. 2006](#)). *Galearis spectabilis* či *Platanthera lacera* zotrývajú ako súčasť semennej banky minimálne 3 roky ([Whigham et al. 2006](#)). Stoutamire ([1996](#)) u *Platanthera leucophaea* pozoroval že klíčia po 2 rokoch v podmienkach *in vitro*; klíčivosť u *Cypripedium calceolus* po 4.5 roku zaznamenali aj Rasmussen et Petersen ([2011](#)).

4. Mechanizmy dormancie mykoheterotrofných rastlín

O dormancii semien iných mykoheterotrofných rastlín než orchideí, je veľmi málo informácií, ktoré neumožňujú úvahy o možných mechanizmoch ich dormancie. U orchideí samotných sa väčšina prác nezaobera priamo dormanciou semien, ale snaží sa len nájsť také ošetrenie semien, po ktorom vyklíčia. Z týchto štúdií zaoberajúcich sa klíčením orchideí vyplýva, že majú vonkajšiu aj vnútornú dormanciu, ktorú pojednám oddelene.

4.1 Vonkajšia dormancia

Na existenciu vonkajšej dormancie (fyzikálnej). U semien orchideí poukazuje množstvo prác. Vonkajšia dormancia je spojená s vonkajším aj vnútorným osemením ([Baskin et Baskin 1998](#)). Semená sa pred výsevom štandardne ošetrujú dezinfekčnými roztokmi, ktoré môžu osemenie narušiť ([Rasmussen 1995](#)). Zatiaľčo semená niektorých druhov klíčia ľahko po slabom ošetrení etanolom ([Kmecová 2011](#)), iné druhy vyžadujú hrubšie ošetrenie bez ktorého neklíčia. Spravidla sa používajú roztoky chlórnanov niekedy v kombinácii s etanolom. Nie je jasné, k akým zmenám v osemení behom dezinfekcie dochádza. Osemenie je zjavne tvorené celulóznym materiálom degradovaných bunkových stien, ktorý je navyše impregnovaný hydrofóbnymi látkami ([Veyret 1969](#), [Rasmussen 1995](#)), uvažuje sa predovšetkým o ligníne ([Vasudevan et van Staden 2010](#)), suberíne ([Harvais 1980](#), [Harvais et Hadley 1967](#)), kutíne ([Lee et al. 2005](#), [Yamazaki et Miyoshi 2006](#), [Vasudevan et van Staden 2010](#)) a prípadne aj voskoch. Ošetrenie semien etanolom sa prevádza kôli zvýšeniu zmáčavosti ([Michl 1988](#)), čo by sa dalo vysvetliť vyplavovaním voskovitých látok, ktoré etanol môže rozpúšťať. Nasledujúce ošetrenie chlórnanmy by mohlo napomôcť degradácii lignínu, suberínu či kutínu. Roztoky chlórnanov sú silné oxidačné činidlá s vysokým pH a ako také sa používajú na degradáciu lignínu ([Baipai 1999](#), [Pérez et al. 2002](#), [Camarero et al. 2007](#)). Niektoré ďalšie druhy orchideí však neklíčia ani po tomto ošetrení. U časti z nich pomáha ešte ošetrenie slabším roztokom kyseliny sírovej ([Malmgren 1996](#), [Ponert et al. 2013](#) a ďalší), ktoré by mohlo navodiť degradáciu vrstiev osemení, ktoré sú stabilné pri vysokom pH, ale citlivé ku kyslému prostrediu. Časť druhov orchideí ale v umelých podmienkach asymbiotických kultúr *in vitro* neklíči po žiadnom z vyššie uvedených ošetrení.

U týchto druhov sa všeobecne predpokladá, že ich osemenie narušujú pôdne huby ([Rasmussen 1995](#), [Gryndler et al. 2004](#), [Baláž 2011](#)), nemožno však vylúčiť ani fakt, že v umelých podmienkach pôsobia nejaké faktory navodzujúce vnútornú dormanciu semien. Pre úlohu húb v narušovaní dormancie hovoria výsledky niektorých štúdií, kedy niektoré druhy klíčili len v symbioticky ([Clements et al. 1986](#), [Mashuara et Katsuya 1994](#), [Perkins et al. 1995](#), [McKendrick et al. 2002](#) a ďalší). Na úlohu vonkajšej dormancie zasa poukazuje fakt, že niektoré druhy klíčia len pri výseve nezrelých semien ([Michl 1988](#), [Malmgren 1996](#), [Arditti 2008](#), [Sgarbi et Prete 2009](#), [Malmgren et](#)

[Nyström 2013](#) a ďalší), ktoré ešte nemajú osemenie impregnované hydrofóbnymi látkami.

Podľa niektorých autorov orchidey nemajú fyzikálnu dormanciu, alebo sa vyskytuje výnimočne u rodov ako *Galeola*, *Vanilla* či *Selenipedium* ([Baskin et Baskin 1998](#), [Baskin et Baskin 2004](#)) aj keď tá je definovaná ako nepriepustnosť osemenia pre vodu ([Baskin et Baskin 1998](#)). Fyzikálna dormancia sa ale vyskytuje aj u iných rodov ako *Sobralia* ([Prutsch et al. 2000](#)). Práce popísané vyššie ale popisujú nutnosť odstránenia osemenia skarifikáciou, bez ktorej sa voda nedostane k embryu a semeno nemôže vyklíčiť, jedná sa teda o odstraňovanie fyzikálnej dormancie, preto sa pravdepodobne jedná o fyzikálnu dormanciu ako ju popisujú Baskin et Baskin ([1998](#)).

4.2 Vnútna dormancia

Najnápadnejší jav ktorý poukazuje na vnútornú dormanciu semien orchideí, je asi požiadavka chladnej stratifikácie semien niektorých druhov (napr. [Rasmussen 1992](#), [Steele 1996](#), [Øien 2008](#)). Sú tým známe mnohé orchidey ako napr. *Pseudorchis albida*, *Epipactis palustris* či *Cypripedium calceolus*, čo sú taxóny miernych pásov, ktoré v prírode zrejme klíčia po prejdení chladnej zimy ([Rasmussen 1992](#), [Ponert et al. 2013](#)). Vnútna dormancia sa však môže vyskytovať aj u ostatných orchideí. Zrelé semená obsahujú ABA ([Van Waes 1984](#), [Lee et al. 2007](#)), ktorá inhibuje klíčenie ([Hilhorst 1995](#)). Ďalej bolo zistené, že zle klíčiace *Epipactis heleborine* má v semenách výrazne vyššiu hladinu ABA než dobre klíčiace druhy ([van der Kinderen 1987](#)). Behom pôsobenia chlórnanov na semená môže dochádzať k degradácii ABA ([Lindén 1980](#), [Steele 1996](#)). Je teda možné, že bežne používané ošetrenie semien chlórnanmi spôsobí len narušenie vonkajšej dormancie, ale aj vnútornej cez degradáciu ABA. Cytokiníny ([Van Waes et Debergh 1986](#), [Rasmussen 1995](#), [Steele 1996](#), [Steward et Kane 2006](#), [Pierce et Cerabolini 2011](#)) a etylén ([Johansen et Rasmussen 1992](#), [Nakamura et al. 1975](#)) klíčenie niektorých druhov naopak stimulujú. Údaje o možných signálnych dráhach a ich interakciách však chýbajú. Klíčenie semien môžu ovplyvňovať ešte ďalšie látky. Je dobre známe že mnohé orchidey klíčia *in vitro* len na niektorých médiách. Niekedy možno rozdielne účinky média vysvetliť vysokou osmomolaritou ([Rasmussen 1995](#)) alebo nevhodným zložením ([Rasmussen 1995](#)). V iných prípadoch ale pôvod odlišného správania nie je jasný. V tomto kontexte je zaujímavé zistenie že klíčenie zreých semien *Pseudorchis albida* je silne inhibované nitrátmi, ktoré už vo veľmi nízkych koncentráciách inhibujú klíčenie ([Ponert et al. 2013](#)). Zatiaľ však nie je jasné či sa v tomto prípade jedná o určitý typ dormancie alebo nie.

Dormancia semien mykoheterotrofných rastlín je málo preskúmaná, ak sa ňou nejaké práce venujú popisujú len empiricky stanovené postupy, ktorých cieľom je dosiahnuť klíčenia orchideí. Práce zaoberajúce sa fyziologickou či anatomickou podstatou mechanizmov dormancie je málo, mnohé poskytujú len dohady o možných procesoch prebiehajúcich počas ošetrenia semien, je preto nutný ďalší výskum.

5. Literatúra

- Anderson, A. B. (1990). Asymbiotic germination of seeds of some North American orchids. North American native terrestrial orchids: propagation and production. Chadds Ford, PA: Brandywine Conservancy, 75-80.
- Anderson A. B. (1996) *Arethusa* The reintroduction of *Platanthera ciliaris* in Canada In: Allen C (ed) North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production, Conference Proceedings, The North American Native Terrestrial Orchid Conference, pp 73–77.
- Arditti J., Ghani A.K.A.(2000): Tansley Review No. 110, Numerical and psychical prosperities of orchid seeds and their biological implications – *New Phytologist* 145: 367-421.
- Arditti, J., 2008 *Micropropagation of Orchids* (2nd ed.), vol. II Blackwell Publishing, Oxford (2008) p. 1523
- Albert, V. A. (1990). In situ, fluorochrome-mediated visualization of nuclear and cytoplasmic DNA. II. Extra-embryonal nuclei in *Cypripedium acaule* seeds: persistent evidence of endosperm failure?. *Lindleyana*, 5(3), 151-157.
- Baláž, M. Comparison of orchid mycorrhiza with other mycorrhizal types with respect to nutrient transfers. *Interorchid* 2001, 37-42.
- Bajpai, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 15(2), 147-157.
- Bair, N. B., Meyer, S. E., & Allen, P. S. (2006). A hydrothermal after-ripening time model for seed dormancy loss in *Bromus tectorum* L. *Seed Science Research*, 16(1), 17-28.
- *Ballard, W. W. (1987). Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds. *American Orchid Society Bulletin*, 56.
- * Barthlott, W., & Ziegler, B. (1980). Uber ausziehbare helicale Zellwandverdickungen als Haft Apparat der Samenschalen von *Chiloschista lunifera* (Orchidaceae).(On extensible helical wall thickenings of the testa of *Chiloschista lunifera* (Orchidaceae) as seed attachment mechanisms.). *Ber. Deutsch. Bot. Ges*, 93(2), 391-403. In: Pridgeon 1999
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (1985). The annual dormancy cycle in buried weed seeds: a continuum. *BioScience*, 492-498.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic press.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, X. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15(2), 139-152.
- Baskin, C. C., Zackrisson, O., & Baskin, J. M. (2002). Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (Empetraceae), a circumboreal species with a stony endocarp. *American Journal of Botany*, 89(3), 486-493.
- Baskin, C. C., Zackrisson, O., & Baskin, J. M. (2002). Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (Empetraceae), a circumboreal species with a stony endocarp. *American Journal of Botany*, 89(3), 486-493.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1-16.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2006). The natural history of soil seed banks of arable land. *Weed Science*, 54(3), 549-557.
- Baumann, H., & Künkele, S. R. Lorenz (2006): *Orchideen Europas mit angrenzenden Gebieten*. Ulmer.-Stuttgart.
- Beer, J. G. (1863). *Beiträge zur morphologie und biologie der familie der orchideen*. Gerold.
- Begon M., Townsend C. R., Harper J. R. *Ökologie: Jedinci, populace a společenstvo* (1997), Blackwell publishing
- * Bernard, N. (1899). Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *Comp Rend Acad Sci*, 128, 1253-

1255. In Arditti (1967).
- Bewley, J. D., & Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of. Development and Germination*.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.
- Bewley, J. D., & Black, M. (1985). *Seeds* (pp. 1-27). Springer US.
- Bidartondo, M. I., & Bruns, T. D. (2005). On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade - offs during seed germination and seedling development. *Molecular Ecology*, 14(5), 1549-1560.
- *Borris H., Voigt T. (1986). Symbiotische und asymbiotische Samenkeimung von *Orchis mascula* – Ein Beitrag zum Problem der Spezifität der Orchideenpilze – *Die Orchidee* 37: 222-226,– In: Rasmussen, 1995.
- Botha, F. C., Potgieter, G. P., & Botha, A. M. (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation*, 11(3), 211-224.
- Borris, H. (1969). Samenvermehrung und anzucht Europäischer erdorchideen. In *Proceedings of the 2nd European Orchid Congress* (pp. 74-78).
- Borris, H., & Voigt, T. (1986). Symbiotische und asymbiotische Samenkeimung von *Orchis mascula*–Ein Beitrag zum Problem der Spezifität der Orchideenpilze. *Die Orchidee*, 37, 222-226.
- Bruns, T. D., & Read, D. J. (2000). In vitro germination of nonphotosynthetic, myco - heterotrophic plants stimulated by fungi isolated from the adult plants. *New Phytologist*, 148(2), 335-342.
- * Burgeff, H. (1936). Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer keimpflanzen: mit einem anhang über praktische orchideenanzucht. Gustav Fischer.. In Ponert 2009.
- Butcher, D., & Marlow, S. A. (1989). Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*, 31-38.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, A. T., Romero, J., Gutiérrez, A., & del Río, J. C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1264-1271.
- Carey, P. D. (1998). Modelling the spread of *Himantoglossum hircinum* (L.) Spreng. at a site in the south of England. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126(1 - 2), 159-172.
- Chu Ch.Ch. & Mudge K.W. (1996). Propagation and conservation of Native Lady's slipper orchids (*Cypripedium acaule*, *C. calceolus* and *C. reginae*). In: Allen C (ed) *North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production*, Conference Proceedings, The North American Native Terrestrial Orchid Conference, pp 107–112.
- Clements, M. A., Muir, H., & Cribb, P. J. (1986). A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin*, 437-445.
- Clements, M. A. (1995). Reproductive biology in relation to phylogeny of the Orchidaceae especially the tribe Diurideae.
- *Coke, J. L. (1990). Aseptic germination and growth of some terrestrial orchids. *North American native terrestrial orchid propagation and production*, 90-91.
- Čiháková K. (2010). Rostlinná kompetice v raných fázích ontogeneze. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze.
- Cuming, A. C. (1999). LEA proteins. In *Seed proteins* (pp. 753-780). Springer Netherlands.
- Delforge, P. (2006). *Orchids of Europe, North Africa and Middle East*. A&C Black Ltd. Publishers, London. ISBN-13, 978-0.
- De Pauw, M. A., Remphrey, W. R., & Palmer, C. E. (1995). The cytokinin preference for in vitro germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*, 75(3), 267-275.
- Dowling, N., & Jusaitis, M. (2012). Asymbiotic in vitro germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany*.

- Downie, D. G. (1949). The germination of *Goodyera repens* (L.) R. Br. in fungal extract. In Transactions of the Botanical Society of Edinburgh (Vol. 35, No. 2, pp. 120-125). Taylor & Francis Group.
- Eriksson, O., & Kainulainen, K. (2011). The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 13(2), 73-87.
- *Eiberg H (1970). Asymbiotisk frøspiring og kulturforsøg hos nogle europæiske jordorkideer. Thesis, University of Copenhagen: Plant Physiological Laboratory. In: Rasmussen (1995).
- Fenner, M. (1992). Environmental influences on seed size and composition. *Horticultural reviews*, 13, 183-213.
- Fenner, M. (Ed.). (2000). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Cabi.
- Fenner, M., & Thompson, K. (2005). *The ecology of seeds*. Cambridge University Press.
- Finch - Savage, W. E., & Leubner - Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523.
- *Frosch, W. (1980). Asymbiotische Aussaat von *Orchis morio*. *Orchidee*, 31(3), 123-124. In: Michl 1988a
- Fonnesbech, M. (1972). Growth hormones and propagation of *Cymbidium* in vitro. *Physiologia Plantarum*, 27(3), 310-316.
- Fredrikson, M. (1992). The development of the female gametophyte of *Epipactis* (Orchidaceae) and its inference for reproductive ecology. *American journal of botany*, 63-68.
- Givnish, T. J. (1981). Serotiny, geography, and fire in the Pine Barrens of New Jersey. *Evolution*, 101-123.
- Gryndler, M., Baláž, M., Hršelová, H., Jansa, J., & Vosátka, M. (2004). Mykorrhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin. Academia.
- Hadley, G., & Harvais, G. (1968). The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytologist*, 67(2), 441-445.
- Hailes, N. S. J., & Seaton, P. T. (1989). The effects of composition of the atmosphere on the growth of seedlings of *Cattleya aurantica*. *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology, and management*, 73.
- *Hamada, M. (1939). Studien uber die Mykorrhiza von *Galeola septentrionalis* Reichb. f. Ein neuer Fall der Mykorrhiza-Bildung durch intraradicale Rhizomorpha. *Jap. J. Bot*, 10, 151-211. In: Nakamura 1975
- Hargeup (1947) The spontaneous formation of haploid, polyploid and aneuploid embryos in some orchids. *Kongelige Dansk Videnskabernes Selskabs, Biologiske Meddelelser*, 20, 1-22
- Harper, J.L. (1959). The ecological significance of dormancy and its importance in weed control. *Proceedings of the Fourth International Congress of Crop Protection, Hamburg, 1957*, 415-420.
- *Harvais, G. (1980). Scientific notes on a *Cypripedium reginae* of northwestern Ontario, Canada. *American Orchid Society Bulletin*, 49(3), 237-244. In Steele (1996)
- Harvais, G. (1982). An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *canadian Journal of botany*, 60(12), 2547-2555.
- Harvais, G., & Hadley, G. (1967). The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist*, 217-230.
- Harper, J. L. (1977). *Population biology of plants*. Population biology of plants.
- Hashimoto, Y., Fukukawa, S., Kunishi, A., Suga, H., Richard, F., Sauve, M., & Selosse, M. A. (2012). Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytologist*, 195(3), 620-630.
- Hilhorst, H. W. M., & Karssen, C. M. (1992). Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation*, 11(3), 225-238.

- Hilhorst, H. M. (1995). A critical update on seed dormancy I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5, 61-61.
- Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., & Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 45(3), 131-135.
- Jeřabková K (2006) Výzkum ekologických naroků a optimalního managementu běloprstky bělavé (*Pseudorchis albida*). Diploma thesis, Czech University of Life Sciences, 468 Prague.
- Jersaková J, Malinová T, Jeřabková K, Dotterl S (2011) Biological Flora of the British Isles: *Pseudorchis albida* (L.) A. & D. Love. *J Ecol* 99:1282-1298.
- Ježek Z. (1996) Na lovu mexických orchidejí. moravské vydavatelství Květen, Brno, 122–127.
- *Karssen, C. M., Brinkhorst-Van der Swan, D. L. C., Breekland, A. E., & Koornneef, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 157(2), 158-165. In Fenner 2000.
- *Karasawa, K., & Saito, K. (1982). A revision of the genus *Paphiopedilum* (Orchidaceae). *Bull. Hiroshima Bot. Gard*, (5), 1-69.– In: Arditti et Ghani, 2000.
- Kauth, P. J., Kane, M. E., Vendrame, W. A., & Reinhardt-Adams, C. (2008). Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae): evidence for ecotypic differentiation. *Annals of botany*, 102(5), 783-793.
- Kepczynski J., Kepczynska J., (1997) : Ethylene in seed dormancy and germination *Physiologia plantarum* Vol. 101 Issue: 4 Pages: 720-726
- Kmecová K., (2011) Asymbiotický výsev terestrických orchidejí : vliv dezinfekce na klíčení semen *Dactylorhiza majalis* a *Anacamptis morio*. Středoškolská odborná činnost
- Knudson, L. (1921). La germinacion no simbiotica de las semillas de orquideas. *Bol. Real Soc. Espanola Hist. Nat.* 21:250-260.
- *Koch L. (1882). Die Entwicklung des Samens von *Monotropah ypopitys* L. Pringsheim's Jahrb für wissenschaft. Botanik Band X III, Heft 2. In Leake et al. (2004)
- Koornneef, M., & Karssen, C. M. (1994). 12 Seed Dormancy and Germination. Cold Spring Harbor Monograph Archive, 27, 313-334.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281–307.
- Leake, J. R. (1994). The biology of myco - heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, 127(2), 171-216.
- Lauzer, D., Renaut, S., St-Arnaud, M., & Barabé, D. (2007). In vitro asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 134(3), 344-348.
- Leake JR, McKendrick SL, Bidartondo MI, Read DJ (2004) Symbiotic germination and development of the mycoheterotroph *Monotropah hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Tricholoma* spp. *New Phytologist*, 163, 405– 423.
- Lee, Y. I., Lee, N., Yeung, E. C., & Chung, M. C. (2005). Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(5), 747-753.
- Lee, Y. I., Yeung, E. C., Lee, N., & Chung, M. C. (2006). Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. *Annals of botany*, 98(6), 1311-1319.
- Lee, Y. I., Lu, C. F., Chung, M. C., Yeung, E. C., & Lee, N. (2007). Developmental Changes in

- Endogenous Abscisic Acid Concentrations and Asymbiotic Seed Germination of a Terrestrial Orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(2), 246-252.
- Li BL, Foley ME. (1997) Genetic and molecular control of seed dormancy. *Trends in Plant Science* 2: 384–389.
- *Lindén, B.(1980). Aseptic germination of seeds of northern terrestrial orchids. *Ann. Bot. Fennici*. 17: 174-182: In Steele (1996)
- Lugo, H. L. (1955). The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Botany*, 679-684.
- Luštinec, J., & Žárský, V. (2003). Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Karolinum.
- Martin A.C. (1946) The comparative internal morphology of seeds *Am. Midl. Nat.*, 36 , pp. 513–660
- Malmgren S (1996) Orchid propagation: Theory and Practice. In: Allen C (ed) *North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production, Conference Proceedings, The North American Native Terrestrial Orchid Conference*, pp 11–26.
- Malmgren S, Nyström H (2013) Orchid propagation. <http://www.lidaforsgarden.com/Orchids/engelsk.htm>. Accessed 10 4 2013.
- Matilla A.J., (2000). Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research*, 10, pp 111-126. doi:10.1017/S096025850000012X.
- Matusova R., Rani K., Verstappen F. W.A., Franssen M.C.R., Beale M.H. and Bouwmeester H. J. The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway (2005) *Plant Physiology* vol. 139 no. 2 920-934
- Masuhara, G., & Katsuya, K. (1994). In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 127(4), 711-718.
- McKendrick, S. L., Leake, J. R., Taylor, D. L., & Read, D. J. (2002). Symbiotic germination and development of the myco - heterotrophic orchid *Neottia nidus - avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytologist*, 154(1), 233-247.
- Michl J (1988) Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny I. *Živa* 2: 52 53.
- Murren, C., & Ellison, A. (1998). Seed dispersal characteristics of *Brassavola nodosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 85(5), 675-675.
- Muir, P. S., & Lotan, J. E. (1985). Disturbance history and serotiny of *Pinus contorta* in western Montana. *Ecology*, 1658-1668.
- Miyoshi, K., & Mii, M. (1988). Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia horticultrae*, 35(1), 127-130
- Miyoshi, K., & Mii, M. (1998). Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro. *Physiologia Plantarum*, 102(4), 481-486.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T. R., Seaton, P. T., & Pritchard, H. W. (2011). Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 23(2), 204-212.
- *Nagashima T. Studies on the seed germination and embryogenesis in a few species of Orchidaceae. *Bulletin of Keisen College of Horticulture* 1979;12:77-111. (in Japanese). In Miyoshi et Mii (2006)
- Nakamura, S. J., Uchida, T., & Hamada, M. (1975). Atmospheric condition controlling the seed germination of an achlorophyllous orchid, *Galeola septentrionalis*. *The botanical magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi*, 88(2), 103-109.
- Nakamura, S. J. (1982). Nutritional conditions required for the non-symbiotic culture of an achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis*. *New Phytologist*, 701-715.
- Nakamura S.CH. (1981) Nutritional conditions required for the non-symbiotic culture of an

achlorophyllous orchid *Galeola septentrionalis*

- *Nakamura S.I., Hamada M.(1978) On the seed dispersal of an achlorophyllous orchid, *Galeola septentrionalis* – The Journal of Japanese Botany 53: 260-263, In Ponert 2009
- *Nikolaeva, M.G. (1969) Physiology of deep dormancy in seeds. Leningrad, Russia, Izdatel'stvo 'Nauka'. (Translated from Russian by Z. Shapiro, National Science Foundation, Washington, DC.) In: Baskin J.M. and Baskin C. C. (2004)
- * Nikolaeva, M.G. (1977) Factors controlling the seed dormancy pattern. pp. 51–74 in Khan, A.A. (Ed.) The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Amsterdam, North-Holland. In: Baskin J.M. and Baskin C. C. (2004)
- Nikolaeva, M. G. (2004). On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research*, 14(04), 315-320.
- Ochuodho, J. O., & Modi, A. T. (2007). Light-induced transient dormancy in *Cleome gynandra* L. seeds. *African Journal of Agriculture Research*, 2(11), 587-591.
- Ødum, S. (1965). Germination of ancient seeds. Floristical observations and experiments with archaeologically dated soil samples. *Dansk Bot. Arkiv*, 24(2), 70.
- Øien, D. I., O'Neill, J. P., Whigham, D. F., & McCormick, M. K. (2008). Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid *Dactylorhiza lapponica* (Orchidaceae). In *Annales Botanici Fennici* (Vol. 45, No. 3, pp. 161-172). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Park, E. J., Lee, W. Y., & Ahn, J. K. (2012). In vitro propagation of mycoheterotrophic *Gastrodia elata*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 53(5), 415-420.
- Pavlová, L. (2005). *Fyziologie rostlin*. Karolinum.
- Pérez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T. D. L. R., & Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.
- Perkins, A. J., Masuhara, G., & McGee, P. A. (1995). Specificity of the associations between *Microtis parviflora* (Orchidaceae) and its mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*, 43(1), 85-91.
- Ponert J. (2009). Rané fáze vývoje semenáčků terestrických orchidejí: vliv sacharidů a fytohormonů, diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, 2009
- Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K., & Lipavská, H. (2011). European orchid cultivation—from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2), 95-107
- Ponert et al.:(2013) Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany*, submitted.
- Prutsch, J., Schardt, A., & Schill, R. (2000). Adaptations of an orchid seed to water uptake and storage. *Plant Systematics and Evolution*, 220(1-2), 69-75.
- Pierce, S., & Cerabolini, B. E. L. (2011). Asymbiotic germination of the White Mountain Orchid (*Pseudorchis albida*) from immature seed on media enriched with complex organics or phytohormones. *Seed Science and Technology*, 39(1), 199-203.
- Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., & Rasmussen, F. N. (1999). *Genera Orchidacearum*. Volume 1. General introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae.
- Rasmussen H.N., Andersen T.F. & Johansen B. (1990) Botanical Laboratory, University of Copenhagen, 140 Gothersgade, 1123 Copenhagen K, Denmark Plant, Cell and Environment) 13, 171-177 Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus
- Rasmussen, H. N. (1992). Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum*, 86(1), 161-167.
- Rasmussen, H. N., & Whigham, D. F. (1993). Seed ecology of dust seeds in situ: a new study

- technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany*, 1374-1378.
- Rasmussen H.N. (1995) *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118(3), 334-345.
- Rasmussen H.N., (2011) Methods of studying field germination and seedling physiology: present potential and drawbacks. *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2),55-59
European Journal of Environmental Sciences 69.
- Rasmussen, H. N. and Pedersen, AE H.. (2012): *Cypripedium calceolus* germination in situ: seed longevity, and dormancy breacage by long incubation and cold winters. *European Journal of Environmental Sciences* 1 69-70
- Sharma, J., Zettler, L. W., Van Sambeek, J. W., Ellersieck, M. R., & Starbuck, C. J. (2003). Symbiotic seed germination and mycorrhizae of federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). *The American midland naturalist*, 149(1), 104-120.
- Schwilk, D. W., & Ackerly, D. D. (2001). Flammability and serotiny as strategies: correlated evolution in pines. *Oikos*, 94(2), 326-336.
- Sgarbi E., Grimaudo M., & C. Del Prete. (2009) In vitro asymbiotic germination and seedling development of *Limodorum abortivum* (Orchidaceae) *Plant Biosystems*, Vol. 143, 1,114–119
- Slavíková, J. (1986). *Ekologie rostlin*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova.
- Steele WK (1996) Large Scale Seedling Production of North American *Cypripedium* Species. In: Allen C (ed) *North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production*, Conference Proceedings, The North American Native Terrestrial Orchid Conference, pp 11–26.
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 147-158.
- Stoutamire, W.P. (1963). Terrestrial orchid seedlings. *Australian plants*, 2, 119-22. In: Rasmussen (1995).
- *Stoutamire, W.P. (1974). Terrestrial orchid seedlings. In *The orchids. Scientific studies*, ed. C.L. Withner, pp. 101-28. New York: Wiley. In: Rasmussen (1995).
- Stoutamire (1996) *Arethusa bulbosa* Life cycle, propagation and production In: Allen C (ed) *North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production*, Conference Proceedings, The North American Native Terrestrial Orchid Conference, pp 55 – 62.
- *Swamy B.G.L., (1942). Female gametophyte and embryogeny in *Cymbidium bicolor* Lindl. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section B* 15, 194-201 In Pridgeon 1999
- Swamy B.G.L.(1943a). Embryology of Orchidaceae – *Current Science* 12:13-17,
- *Swamy B.G.L. (1943b). Gametogenesis and embryogeny of *Eulophia epidendreae* Fischer. & proceedings of the National Institute of Sciences of India, 9, 59-65. In Pridgeon 1999
- *Swamy B.G.L. (1944) Embryo sac and the embryo of *Satyrium nepalense* Don. *Journal of the Indian Botanical Society*, 23, 66-70 In Pridgeon 1999
- Swamy, B. G. L. (1945). Embryo sac and fertilization in *Cypripedium spectabile*. *Botanical Gazette*, 291-295.
- *Swamy B.G.L. (1946a) Embryology of *Habenaria*. *Proceedings of National Institute of Sciences of India*, 12: 413-26 In Pridgeon 1995
- Swamy, B. G. L. (1947). On the life-history of *Vanilla planifolia*. *Botanical Gazette*, 449-456.
- Swamy, B. G. L. (1948b). The embryology of *Epidendrum prismatocarpum*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 75(3), 245-249.
- Swamy, B. G. L. (1949a). Embryological studies in the Orchidaceae. I. Gametophytes. *American* 38

- Midland Naturalist, 41(1), 184-201.
- Swamy, B. G. L. (1949b). Embryological studies in the Orchidaceae. II. Embryogeny. American Midland Naturalist, 202-232.
- Těšitelová, T., Těšitel, J., Jersáková, J., Říhová, G., & Selosse, M. A. (2012). Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. American Journal of Botany, 99(6), 1020-1032.
- Tomita, M. (1998). *Oakes* var. *bulbosa* (Orchidaceae) In vitro. Plant Biotechnology, 15(2), 83-86.
- Johansen, B., & Rasmussen, H. (1992). Ex situ conservation of orchids.
- Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. Plant cell, Tissue and organ culture, 90(3), 313-323.
- Ueda, H., & Torikata, H. (1969a). Organogenesis in the meristem tissue cultures of cymbidiums. II. Effects of growth substances on the organogenesis in dark culture - 園芸學會雜誌 J. Jpn. Soc. Hort. Sci, 38, 78-83.
- Ueda, H., & Torikata, H. (1969b). Organogenesis in the meristem culture of cymbidiums III. Histological studies on the shoot formation at the rhizome-tips of *Cymbidium goeringii* Reichb. F. cultured in vitro. - 園芸學會雜誌 J Japan Soc Hort Sci, 38, 263-266.
- *van der Kinderen, G. (1987). Abscisic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. Lindeleyana, 2, 84-7. In: Rasmussen (1995).
- *Van Waes J (1984) In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideën. Thesis, Rijkuniversiteit Gent. In: Rasmussen (1995).
- Van Waes, J. V., & Debergh, P. C. (1986). In vitro germination of some Western European orchids. Physiologia Plantarum, 67(2), 253-261.
- Vasudevan, R., & Van Staden, J. (2010). In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. Scientia Horticulturae, 123(4), 496-504.
- Vejsadová H., Gutzerová N. (1997): Mikropropagační metody a jejich potenciální využití pro reintrodukcce ohrožených bylin a dřevin. Acta Průhoniciana 64: 72–80.
- Vejsadová, H., & Malá, M. (1996). Seed germination of some terrestrial orchids under aseptic conditions. Acta Průhoniciana, 63, 77-84.
- Vejsadova, H. A. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. Acta Biologica Cracoviensia. Series; Botanica, 48, 109-113.
- *Veyret, Y. (1969). 3. La structure des semences des Orchidaceae et leur aptitude à la germination in vitro en cultures pures. In Rasmussen 1992
- Viémont, J. D., & Crabbé, J. (2000). Dormancy in Plants: From Whole Plant Behaviour to Cellular Control: [papers Presented at the 2nd International Symposium on Plant Dormancy Held in Angers in July 1999]. Cabi.
- Vlčko, J., Dítě, D., & Kolník, M. (2003). Vstavačovitě Slovenska. Orchids of Slovakia. ZO SZOPK Orchidea.
- Vleeshouwers, L. M., Bouwmeester, H. J., & Karssen, C. M. (1995). Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology. Journal of Ecology, 1031-1037.
- Whigham, D. F., O'Neill, J. P., Rasmussen, H. N., Caldwell, B. A., & McCormick, M. K. (2006). Seed longevity in terrestrial orchids—potential for persistent in situ seed banks. Biological conservation, 129(1), 24-30.
- Whitlow C. (1996) Mass Production of *Calopogon tuberosus* In: Allen C (ed) North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production, Conference Proceedings, The North American Native Terrestrial Orchid Conference, pp 5–10.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. Plant and soil, 159(2), 291-295.

- Wodrich, K. H. (1997). Growing South African indigenous orchids. AA Balkema.
- Wotavová-Novotná, K., Vejsadová, H., & Kindlmann, P. (2007). Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia plantarum*, 51(1), 198-200.
- Yamazaki, J., & Miyoshi, K. (2006). In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98(6), 1197-1206.
- Yannetti, R. A. (1996). *Arethusa bulbosa* life cycle, propagation, and production. In North American native terrestrial orchid conference. Native Orchid Conference, Germantown, MD(pp.27-42).
- Yoder, J. A., Imfeld, S. M., Heydinger, D. J., Hart, C. E., Collier, M. H., Gribbins, K. M., & Zettler, L. W. (2010). Comparative water balance profiles of Orchidaceae seeds for epiphytic and terrestrial taxa endemic to North America. *Plant Ecology*, 211(1), 7-17.
- Zettler, L. W., & Hofer, C. J. (1998). Propagation of the little club-spur orchid *Platanthera clavellata* by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*, 39(3), 189-195.
- *Ziegler H. (1981). Mikromorphologie der Orchideensamen unter Berücksichtigung taxonomischer Aspekte – Ph.D. thesis, Ruprecht Karls Universität, Heidelberg – In: Rasmussen (1995)

Sekundárne citácie sú označené hviezdíčkou (*).