

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Tomáš Figura

Ekofyziologický význam extrémní citlivosti orchidejí k nitrátům
Ecophysiological relevance of extreme sensitivity of orchids to nitrates

Diplomová práce

Školitel práce: RNDr. Jan Ponert

Praha, 2016

“Nie globálne otepľovanie, alebo turizmus, ale dusík je najväčší nepriateľ prirodzených ekosystémov, normálne padajú takto krychličky dusíku na nás z neba a ničia nám tu krásne hlavne oligotrofné miesta.....a to Ťa taká krychlička môže aj zabiť keď na Teba spadne!”

Nemenovaný slovenský botanik

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval 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, 15. 8. 2016

Podpis

Abstract

Many orchid species are seriously endangered at present. Reasons for their disappearing from natural habitats remain often unclear. Orchids depend on mycorrhizal symbiosis in nature, however only little is known about this symbiosis. Seeds of some species do not germinate *in vitro*, making their cultivation for scientific and rescue purposes impossible. We found that seed germination of one of such reluctant species, *Pseudorchis albida*, is strongly inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. As this species prefers oligotrophic mountain meadows, nitrate-induced inhibition probably take place in natural conditions. Surprisingly, we found similar but slightly weaker inhibitory effect also in typical mesophilic species and even in slightly eutrophic ones. The sensitivity to nitrates correlates with trophic level of studied species. This inhibitory effect of nitrates could be weakened by application of a range of growth regulators, including auxins, cytokinins and gibberellins, and also by mycorrhizal fungi. The action of nitrate reductase is essential for this inhibitory effect of nitrates. Experiments with NO donors, scavengers, and NO quantification are pointing right at NO as compound which perhaps mediates nitrate inhibitory effect. Based on these results, the nitrate inhibitory effect on orchid seed germination seems to be a part of a complex regulatory network.

Keywords: nitric oxide, in vitro , asymbiotic, protocorm , PTIO, SNP, tungstate, seed, germination, dormancy

Abstrakt

Mnoho orchidejí je v současnosti silně ohrožených a důvody jejich úbytku z přirozených stanovišť v mnoha případech neznáme. Orchideje jsou v přírodě závislé na mykorrhizní symbióze, ale znalostí o tomto soužití je velice málo. Některé druhy navíc neklíčí v podmínkách *in vitro*, což znemožňuje jejich kultivaci jak pro vědecké, tak pro ochranné účely. Zjistili jsme, že klíčení semen jednoho takového druhu, *Pseudorchis albida*, je silně inhibováno nitráty, a to dokonce při jejich extrémně nízkých koncentracích. Vzhledem k tomu že tento druh osidluje oligotrofní horské louky, pozorovaná inhibice by se mohla uplatňovat i v přírodě. Zajímavé je, že podobný i když slabší inhibiční efekt jsme pozorovali také u mezofilních druhů a dokonce i u mírně eutrofních. Citlivost k nitrátům přitom koreluje s úživností stanoviště studovaných druhů. Pozorovaný inhibiční efekt je možné oslabit aplikací auxinů, cytokininů i giberelinů, anebo také symbiotickými houbami. Pro inhibiční efekt nitrátů je nezbytná aktivita nitrátoreduktázy. Experimenty s donory a zhášeci NO a s kvantifikací NO ukazují, že NO pravděpodobně zprostředkovává tento inhibiční efekt. Inhibiční efekt nitrátů na klíčení semen orchidejí se tedy zdá být součástí komplexní signální sítě.

Klíčová slova: oxid dusnatý, *in vitro*, asymbiotický, protokorm, PTIO, SNP, wolframan, semeno, klíčivost, dormance

Cíle práce

Hlavním cílem projektu je zjistit možný fyziologický význam extrémní citlivosti některých orchidejí k dusičnanům. Pro splnění hlavního cíle byly stanoveny dílčí cíle:

1. Zjistit, zda je extrémní citlivost k dusičnanům specifikem druhu *Pseudorchis albida*, nebo zda se uplatňuje i u jiných druhů orchidejí.
2. Otestovat vliv NH_4^+ na klíčení semen vybraných druhů orchidejí.
3. Zjistit, zda může být reakce citlivých druhů na dusičnany ovlivněna působením fytohormonů.
4. Pomocí analýzy obsahů endogenních sacharidů v mladých protokormech poodhalit možný účinek dusičnanů na růst protokormů bezprostředně po vyklíčení.
5. Zjistit, zda je pro inhibiční efekt dusičnanů nutná aktivita nitrátreduktázy.
6. Zjistit, zda se při dusičnany vyvolané inhibici klíčení uplatňuje NO.
7. Zjistit, zda NO může ovlivňovat klíčení semen orchidejí.
8. Zjistit, zda mohou inhibiční efekt dusičnanů oslabit mykorhizní houby.

Pod'akovanie

Toto pod'akovanie je síce zo srdca, ale nenavštevujem kardiológa a nemožno teda tvrdiť že nasledovné riadky sú zo zdravotného hľadiska v poriadku.

Výzkum bol podporený Grantovou agentúrou Univerzity Karlovy v Praze (projekt č. 365115) a fondom výtvarníka pána Radka Labuťi z Prahy (F.R.L. 2016). Obom sponzorom som povďačný. Hlavná vďaka patrí UTSR a UTPR, môjmu školiteľovi Honzovi Ponertovi a Thorovi. Ďakujem aj hadovi Midgarðsormr za to že sa neukázal a nezničil mi pokusy a Fenrirovi že nezožral slnko, bez ktorého by som mal depresie. Veľká vďaka patrí samozrejme aj mojej konzultantke Helene Lipavskej ako človeku s kopou rád a to nielen vedeckého rázu a môjmu vozidlu VW Passat B6 Variant a jeho servismanovi Zdenkovi za urýchlenie presunov. Ďakujem aj Vlastimilovi Mikoláškovi za zasvätenie do tajov privátnictva a tiež celej laborke 007 okrem Hany Ševčíkovej. Za pomoc pri riešení taxonomických (a iných) problémov ďakujem Danovi Dítě. Za informácie o lokalitách a inú pomoc ďakujem Jardovi Rydlovi, Jiřímu Echiovi Hadincovi, za štatistické rady aj po 22:00 hodine veľmi pekne aj Martinovi Weiserovi, a za FCM pomoc vždy na mailu dostupnému Pavlovi Trávničkovi, Jane a Petrovi Vítovi a vlastne obom teamom cytometrických laboratórií (Průhonice, PřF UK). Ďakujem aj Kláre Čihákovéj bez ktorej by som bol z chémie tak tupý jako po absolvovaní gymplu a vlastne skoro všetkým pracovníkom katedier Botaniky a Experimentálnej biologie rastlin PřF UK v Prahe a Botanickému ústavu SAV napr. najsamľepšiemu Milanovi a ďalším jedincom tam pracujúcim za ďalšie drobnosti ktoré obohatili môj život. Takisto nesmiem zabudnúť na mrtvú rybu kde nepravidelne ale zato často načerpávam sily po dlhom dni počas ktorého jej len lačne pozerám z okna 105ky na bránu. Ďakujem aj personálu lab 008 hlavne nutričnej odborníčke Edite Tylovej a Alešovi Soukupovi. Z rád zahraničných odborníkov i nadšencov ďakujem za rady hlavne Hanne Nina Rasmussen, Svante Malmgren a Ardi Malaj z Lis. Za recentnú pomoc s fluorometriou ďakujem Dominikovi Pinkasovi a jeho neúprosnej školiteľke Gabriele Seydlovej a tiež Jeníčkovy Pilátovej za neoceniteľnú pomoc při tvorbe obalu práce. Nielen vedecký a prírode blízky ľudia majú zásluhy. Ďakujem kamionistovi Василий za zjednodušenie prechodu hranicami a АНТОН za pomoc keď som v meste Мукачево zabudol vypnúť svetlá a nemohol som naštartovať, príslušníkovi polície ČR Mirkovi za to že mi nedal dňa 25.11.2011 pokutu a drogovu závislej Kláre za to že dňa 18.2.2012 nenakazila môjho kamaráta Lukáša. Ďakujem tiež vode ዕጽጺጠኛ ktorá uhasila môj smäd pri zbere vzoriek. Ďakujem aj

مصطفى عبد الله za to že dňa 21.3.2014 při ústí rieky ماسة الوطني متنزه سوس odišiel a nenaplnil svoje plány, šaline 52 za odvoz do postele, ďalej čokoláde Υγείας, tetám na albertove za zvýšené dávky jedla, poľskej sieti Biedronka a čínskemu obchodníkovi na Lípovej za doplnenie hladiny cukrov. Za fyzickú podporu Ďakujem Jakubovi Starostovi a Stanislavovi Vosolsobě za to že je. Za ďalšiu neoceniteľnú pomoc potom Adriatikovi Lajthiza, Shoferovi Lulzim Kuçone, pani zo Syllbicë (ľavý breh potoka asi 3 shtepi v smere od Tropojë), a ďalej Tatuanovi, Malimu, Erimu, Marcelimu a Rickovi z Nemercke (neďaleko Sopiku). Ďakujem aj akaricídu Vertimec za to že roztoče už nežerú moje experimenty. V poslednej rade Ďakujem svojej najbližšej rodine za trpezlivosť, pretože nie som psychicky stabilný človek a při písaní som nebol vždy najpríjemnejší. Všetkým menovaným sa zároveň ospravedlňujem že som ich otravoval keď som miečo potreboval.

Na druhej strane by som rád vynadal operátorovi ktorý zrušil sim kartu ktorá mala tajomníkovi katedry poslat SMS keď sa pokazila 006ka... keďže simku zrušili všetko mi tam chciplo! Taktiež človeku ktorý mi vybral experimenty z tmy na svetlo v chladovej komore. Toto nie je sranda!

Obsah

1. Teoretický úvod	13
1.1 Systematika orchidejí	13
1.2 Dusík v rostlinách.....	15
1.2.1 Funkce N v rostlinách.....	15
1.2.2 Příjem N rostlinou	15
1.2.3 Asimilace dusíku v rostlině	19
1.2.4 Signalizační funkce N v rostlinách.....	21
1.2.5 Kontaminace N v přírodě a legislativa	27
1.2.6 Zjišťování účinku NO v rostlině.....	28
1.3 Klíčení semen orchidejí a jeho regulace	29
1.3.1 Stavba semen	29
1.3.2 Dormance.....	29
1.4 Vliv N na orchideje	31
2 Metodika	34
2.1 Zdroje semen	34
2.2 Příprava semen k výsevu.....	35
2.3 Desinfekce semen.....	35
2.4 Příprava kultivačního média.....	36
2.5 Výsev semen a kultivace	38
2.5.1 Asymbiotický výsev semen	38
2.5.2 Symbiotický výsev	39
2.6 Hodnocení experimentu	39
2.6.1. Počítání semen a protokormů	39
2.7. Statistické hodnocení.....	41

2.8 Cytometrie (FCM).....	42
2.9 Zjišťování obsahu jednotlivých forem N v rostlině	44
2.9.1 Aplikace donorů a zhášečů NO	44
2.9.2 Aplikace wolframnanu	44
2.9.3 Lokalizace NO.....	45
2.9.4. Kvantifikace NO.....	45
2.10 Analýza rozpustných sacharidů v protokormech	46
2.11 Analýza obsahu škrobu v protokormech.....	47
3. Výsledky	48
3.1 Vliv NO ₃ ⁻ na klíčení a růst protokormů některých druhů orchidejí	48
3.1.1 <i>Anacamptis laxiflora</i>	48
3.1.2 <i>Anacamptis morio</i>	49
3.1.3 <i>Dactylorhiza majalis</i>	49
3.1.4 rod <i>Gymnadenia</i>	51
3.1.5 <i>Himantoglossum robertianum</i>	59
3.1.6 <i>Nigritella rhelicani</i>	61
3.1.7 <i>Ophrys neglecta</i>	62
3.1.8 <i>Pseudorchis albida</i>	63
3.2. Symbiotické výsevy	65
3.3 Vliv donorů a zhášečů NO na klíčivost vybraných druhů orchidejí	66
3.3.1 SNP	66
3.3.2 PTIO	70
3.3.3 cPTIO.....	73
3.4 Analýzy obsahu NO v protokormech.....	76
3.4.1 Lokalizace NO	76

3.4.2 Měření koncentrace NO v protokormech	77
3.5 Obsah endogenních sacharidů v protokormech	79
3.6 Vliv wolframenu na klíčení semen.....	81
3.7 Vliv kontrolních látek na klíčení některých druhů orchidejí.....	83
3.7.1. CaCl ₂	83
3.7.2 MgSO ₄	85
3.7.3 NaCl.....	86
3.8 Vliv NH ₄ ⁺ na klíčení a růst protokormů <i>Gymnadenia conopsea</i>	88
3.9 Vliv fytohormonů na inhibiční efekt NO ₃ ⁻	88
3.9.1 Vliv auxinů na inhibiční efekt NO ₃ ⁻	88
3.9.2 Vliv cytokininů na inhibiční efekt NO ₃ ⁻	91
3.9.3 Vliv GA ₃ na <i>Gymnadenia conopsea</i>	96
4. Diskuze	99
4.1. Efekt NO ₃ ⁻ na klíčivost vybraných druhů.....	99
4.2 Efekt fytohormonů na inhibici klíčení semen orchidejí způsobenou NO ₃ ⁻	101
4.3. Vliv mykorhizních hub na inhibici klíčení semen orchidejí způsobenou NO ₃ ⁻	103
4.4 Vliv NO na klíčení semen orchidejí	103
4.5 Efekt NO ₃ ⁻ na růst protokormů orchidejí	105
5. Závěry	106
6. Literatura.....	107
Příloha I.....	138
Příloha II	140

Seznam použitých zkratek

ABA -	kyselina abscisová
acos -	funkce arkuskosinus
AMK –	aminokyseliny
ANOVA	analýza variací
asin –	arkus sinus
atan –	arkus tangens
ATP-	adezintrifosfát
b –	nabobtnané embryo
BAP -	benzylaminopurin
bs –	nabobtnané semeno
cos –	kosinus
ds –	mrtvé semeno
EtOH-	etanol
GA ₃ -	kyselina gibberelová (GA ₃)
GOGAT-	glutamátsyntáza
GS-	glutamínsyntetaáza
HR-	hypersenzitivní reakce
log-	logaritmická funkce
N0 –	varianta média MON bez přidaného NO ₃ ⁻ v médiu
N1 -	varianta média MON s 1 mg NO ₃ ⁻ /l v médiu
N2 –	varianta média MON s 2 mg NO ₃ ⁻ /l v médiu
N10-	varianta média MON s 10 mg NO ₃ ⁻ /l v médiu
N50 –	varianta média MON s 50 mg NO ₃ ⁻ /l v médiu
N100 -	varianta média MON se 100 mg NO ₃ ⁻ /l v médiu
NAA -	kyselina naftyloctová
NO -	oxid dusnatý
NOS-	NO syntáza
NiR-	nitritreduktáza

NR-	nitrátreduktáza	
ns –	nezralé semeno	
o -	osemení	
PCD--	programovaná buněčná smrt	
p -	protokorm	
PTIO -	2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide	
cPTIO -	2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide	potassium
salt		
sin –	sinus	
sqrt -	druhá odmocnina	
s –	semeno	
SNP –	sodium nitroprusside	
SNAP -	S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine	
tan –	tangens	

1. Teoretický úvod

1.1 Systematika orchidejí

Čeleď vstavačovitých (*Orchidaceae*) je jedna z největších čeledí světa, s počtem druhů převyšujícím 25000 ([WCSP 2016](#)). Čeleď *Orchidaceae* se nachází na bázi řádu *Asparagales* a dělí se na 5 podčeledí: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Epidendroideae*, *Orchidoideae* a *Vanilloideae* ([Pridgeon et al. 1999](#)). Pro tuto práci využívané evropské orchideje patří do podčeledi *Orchidoideae*, tribu *Orchideae* a podtribu *Orchidinae* ([Chase et al. 2015](#); tab. 1, obr. 1). Rodový koncept byl převzat podle nejnovější práce zabývající se kompletní systematikou orchidejí ([Chase et al. 2015](#)). Druhový koncept byl převzat z databází [The Plant List \(2016\)](#); [IPNI \(2016\)](#) a [WCSP \(2016\)](#) s výjimkou vysoce komplikovaného rodu *Ophrys*, který klasifikují podle ([Delforge 2006](#)).



Obrázek 1: Druhy orchidejí používané v této práci a. *Anacamptis laxiflora* b. *Anacamptis morio*, c. *Dactylorhiza majalis* d. *Gymnadenia conopsea* e. *Gymnadenia odoratissima* f. *Himantoglossum robertianum* g. *Nigritella rhelicanii* h. *Ophrys ficalhoana*-taxon ze stejné skupiny jako *Ophrys neglecta* (skupina *Ophrys tenthredinifera*).

Tab. 1 popisuje platná jména druhů použitých v této práci s nejčastěji používanými synonymy (synonyma dle: [The Plant List 2016](#), platná jména podle [Chase et al. 2015](#)).

Platné jméno	Nejčastější synonyma
<i>Anacamptis morio</i> (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase	<i>Orchis morio</i> L.
<i>Anacamptis laxiflora</i> (Lam.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase	<i>Orchis laxiflora</i> Lam.
<i>Dactylorhiza majalis</i> (Rchb.) P.F.Hunt & Summerh., Watsonia 6: 130 (1965).	<i>Orchis majalis</i> Rchb.
<i>Himantoglossum robertianum</i> (Loisel.) P.Delforge	<i>Barlia robertiana</i> (Loisel.) Greuter
<i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R.Br. in W.T.Aiton	-
<i>Gymnadenia densiflora</i> (Wahlenb.) A.Dietr.	<i>Gymnadenia conopsea</i> subsp. <i>densiflora</i> (Wahlenb.) K.Richt.
<i>Gymnadenia odoratissima</i> (L.) Rich.	-
<i>Gymnadenia rhellicani</i> (Teppner & E.Klein) Teppner & E.Klein	<i>Nigritella rhellicani</i> Teppner & E.Klein
<i>Ophrys neglecta</i> Parl.	<i>Ophrys tenthredinifera</i> subsp. <i>neglecta</i> (Parl.) E.G.Camus, Bergon & A. Camus; <i>Ophrys tenthredinifera</i> Willd.
<i>Pseudorchis albida</i> (L.) Á.Löve & D.Löve	<i>Gymnadenia albida</i> (L.) Rich.

1.2 Dusík v rostlinách

1.2.1 Funkce N v rostlinách

Jedna z nejdůležitějších minerálních živin pro rostliny je dusík (N). V závislosti na věku rostliny, orgánu a stupni vývoje je obsah N v sušině 2-5 %. Je součástí mnoha základních látek v rostlině jako proteiny, chlorofyl nebo nukleové kyseliny ([Marschner 1995](#), [Gutiérrez 2012](#)). Ovlivňuje rostlinu na mnohých úrovních, a to například celkovou stavbu rostliny, její sacharidový metabolismus, fotosyntézu a celkově i metabolismus uhlíku, transport látek ([Paul et Stitt 1993](#), [Makino et Osmond 1991](#), [Peuke et al. 1998](#)), obsah prvků v rostlině ([Kohl et al. 1998](#)), hormonální rovnováhu (např. cytokininy, ABA; [von Wirén et al. 2000](#)) nebo ontogenetický vývoj ([McKenzie 1998](#)).

Anorganické formy N mohou být v rostlinách nejen živinami, ale i působit jako signál ([Domingos 2015](#), [Scheible et al. 1997](#), [Crawford 1995](#)). V rostlinách například nitrát (NO_3^-) ovlivňuje růst hlavního kořene ([Marschner 1995](#), [Brouwer 1962](#)) i postranních kořenů ([Stitt 1999](#)) a mění poměr prýt:kořen, indukuje metabolismus organických kyselin a inhibuje metabolismus škrobu ([Scheible et al. 1997](#)). Spolupůsobí také v signálních drahách s fytohormony atp. (více kapitola [1.2.5.3](#)). Dále také oxid dusný (NO) ovlivňuje téměř všechny fyziologické procesy od klíčení až po senescenci ([Benson-Bard et al. 2008](#), [He et al. 2004](#), [Lamattina et al. 2003](#)), například interakce s mikroorganismy, reakce na abiotické stresy či otevírání průduchů ([Mur et al. 2013](#)). NO je přitom častá znečišťující látka v ovzduší ([Liu et al. 2013](#)).

1.2.2 Příjem N rostlinou

Až 98 % N se v půdě vyskytuje v organické formě, přímo nedostupné pro některé rostliny. Rostliny přijímají nejvíce anorganické formy, které vznikají jen velmi málo, a proto je nutná jejich konverze z organických forem - mineralizace ([Engels et Marschner 1995](#)). Nezáleží jenom na množství a dostupnosti v substrátu, ale také na preferenci konkrétního druhu jaká forma N bude přijata ([von Wirén et al. 2000](#), [Falkengren-Grerup 1994](#), [Falkengren-Grerup et Lakkenborg-Kristensen 1994](#)). Nejčastěji je N přijímán v anorganické formě jako NO_3^- a amonný iont (NH_4^+ ; [Engels et Marschner 1995](#)).

V provzdušněných půdách a při vyšším pH převažuje příjem NO_3^- a v půdách s nižším pH

jako například v lese nebo arktických podmínkách převažuje příjem NH_4^+ nebo dokonce AMK (aminokyseliny; [Maathuis 2009](#)). NH_4^+ je spíše přímán i v anaerobních podmínkách zatopených oblastí, kde nitrifikace je inhibována ([Liu et al. 2015](#)). Pokud NO_3^- není přijatý rostlinami či mikroorganismy, tak se často a rychle vyplavuje. Jen zřídka vytváří povrchový komplex s půdními minerály a většina půdních typů absorbuje spíše kationty než anionty ([Kiminis 1997](#)). Koncentrace NO_3^- v půdním roztoku varíruje v závislosti na půdním typu, aktivitě mikrobů atp. ([Miller et al. 2007](#)), a může být v řádu stovek μM nebo u hnojených půd i 20-70 mM ([Reisenauer 1966](#)). Vzhledem k tomu, že koncentrace takto kolísá, tak rostliny musí mít vyvinutý způsob regulace příjmu NO_3^- . NO_3^- mění stavbu kořene, ovlivňuje svůj příjem a transport, a to vše přes komplexní signalizační dráhy, které jsou spouštěny při dostatku nebo absenci NO_3^- ([Ruffel et al. 2011](#), [Miller et al. 2007](#)).

Druhá nejvíce přijímaná forma N je NH_4^+ . I když v provzdušněné půdě bývá jen málokdy v koncentraci vyšší než $50\mu\text{M}$, u mnoha rostlin je intenzivně přijmán ([Marschner 1995](#), [Lea et Morot-Gaudry 2001](#)).

Jak bylo napsáno výše v textu, N může být přijímaný i v organických formách, hlavně jako AMK ([Ghosh et Burris 1950](#); [Virtanen et Linkola 1946](#); [Brigham 1917](#)), kterých je v půdě dostatek ([Näsholm 2009](#)). Příjem organických forem N může být pro rostlinu důležitější, než se dlouho myslelo ([Jones et al. 2005](#)), přestože pozornost se věnuje hlavně anorganickým formám, kterými se (spolu s organickou močovinou) hnojí. Organické sloučeniny jako např. močovina a AMK mají větší význam při snížené dostupnosti minerálních forem (při nízké rychlosti mineralizace) a při nižším pH ([von Wirén et al. 1997](#), [Kielland 1994](#)).

Příjem AMK jako zdroje N byl popsán jak u arktických rostlin ([Henry et Jefferies 2002](#), [Kielland 1994](#), [Schimel et Chapin 1994](#)), alpinských a subalpinských *Cyperaceae* ([Raab et al. 1999](#), [Lipson et Monson 1998](#)), a pak také u boreálních druhů ([Näsholm et al. 1998](#)), temperátních ([Finzi et Berthrong 2005](#), [Falkengren-Grerup et al. 2000](#)), mediteránních ([Rains et Bledsoe 2007](#), [Hawkins et al. 2005](#)), ale také u africké rostliny *Chamaegigas interpidus* rostoucí na substrátech deficientních na živiny ([Schiller et al. 1998](#)). V současnosti je ale známo více rostlin schopných přijmout a využít AMK ([Näsholm et al. 2009](#)), a to dokonce včetně polních plodin ([Okamoto et al. 2003](#); [Näsholm et al. 2000, 2001](#); [Yamagata et Ae 1996](#)).

Příjem N probíhá většinou z půdního roztoku, odkud je přijímaný plasmatickou membránou (PM) epidermálních a kortikálních buněk v kořenech a ve výjimečných případech i v listech, nebo

může být transportován apoplastem až po endodermis ([Lea et Morot-Gaudry 2001](#), [Masclaux-Daubresse 2010](#), [Forde 2000](#), [Peuke et al. 1998](#), [Fernandes et Rossiello 1995](#)) a jeho rychlost se v různých částech kořene liší v závislosti na jeho stáří a stavbě ([Colmer et Bloom 1998](#), [Gao et al. 1998](#)). Nejintenzivněji je absorbován v oblasti za kořenovou špičkou a směrem k bázi postupně klesá v závislosti na stavbě kořene ([Colmer et Bloom 1998](#)).

Jen část absorbovaného NO_3^- kořeny je v nich i asimilována, ale většina, a to hlavně při dostatku NO_3^- , je u většiny druhů transportována xylémem do prýtu a asimilována tam (Andrews 1986). Jestliže je NO_3^- v dostatku, může být transportován do vakuoly (Forde 1999). Remobilizace NO_3^- ze starších listů do mladších, probíhá i floémem ([Fan et al. 2012](#)) a popsán je také přechod NO_3^- mezi xylémem a floémem ([Hsu et Tsay 2013](#)).

Z výše popsaných forem N, které jsou patrně jeho hlavními přijímanými formami, v rostlině může vznikat řada dalších, především NO_2^- a NO.

1.2.2.1 Transportéry N

Protože se tato práce zaměřuje na NO_3^- , budu se dále zabírat jen transportéry anorganických forem N.

1.2.2.1.1 Transportéry NO_3^-

Pro příjem NO_3^- je nezbytný aktivní transport, a to i v případě, že je přítomen ve vysokých koncentracích. Existuje důkaz, že transmembránový příjem NO_3^- probíhá pomocí H^+ symportu ([Walker 1995](#), [Glass et al. 1992](#)).

Kořeny rostlin mohou mít více systémů příjmu NO_3^- do kořenů, existují jak vysokoafinitní, tak nízkoafinitní, přičemž nejdůležitější, a v literatuře nejvíc popisovány, jsou dva s vysokou afinitou a jeden s nízkou afinitou. První z vysokoafinitních systémů známý jako iHATS (inducible high-affinity transport system) je silně indukován externím NO_3^- . Druhý vysokoafinitní systém nazývaný cHATS je konstitutivně exprimován ([Aslam et al. 1992](#)). cHATS mají vyšší afinitu pro NH_4^+ než iHATS, které mají ale při určitých koncentracích větší kapacitu pro příjem NO_3^- ([Forde 1999](#)). Nízkoafinitní (LATS) transportéry, které jsou nejspíše konstitutivně exprimovány, jsou nejdůležitější, když je externí koncentrace NO_3^- vyšší než 1mM.

Fyziologická data naznačují, že regulace jednotlivých komponent příjmu NO_3^- je ale komplexnější (více v [Forde 2000](#)).

Na základě molekulárních studií transportérů NO_3^- v rostlinách se zjistilo, že existují až 4 genové rodiny kódující NO_3^- transportéry u *Arabidopsis thaliana*, a to NRT1/PTR, NRT2, CLC a SLAC/SLAH. Celkem je v těchto 4 skupinách 73 genů a z nich 24 kóduje NO_3^- transportéry ([Liu et al. 2015](#), [Krapp et al. 2014](#)).

První skupina NRT1/PTR, která by se dle návrhu Lérán et al. ([2014](#)) měla označovat jako NPF, zahrnuje první identifikovaný transportér NO_3^- (NPF 6,3; [Tsay et al. 1993](#)), který je součástí signální dráhy spouštějící růst kořene do NO_3^- bohatých míst ([Remans et al. 2006](#)). U *Arabidopsis thaliana* 16 z 53 proteinů z této skupiny se podílí na transportu NO_3^- ([Krapp et al. 2014](#)). Členové této rodiny transportují kromě NO_3^- také AMK, peptidy, glukosinoláty, auxiny a ABA ([Boursiac 2013](#), [Nour Eldin et al. 2012](#), [Kanno et al. 2012](#), [Krouk et al. 2010](#), [Jeong et al. 2004](#), [Zhou et al. 1998](#)). Transportéry z této rodiny jsou nízkoafinitní pro NO_3^- kromě NPF 6.3 ([Krapp 2014](#)).

Všechny transportéry ze skupiny NRT2 se zdají být u rostlin vysoce afinitní a transportující jen NO_3^- ([Krapp et al. 2014](#)). I když je zde možnost, že tak jako u bakterií a kvasinek ([Machin et al. 2004](#), [Fernandez et Galvan 2007](#)), i u vyšších rostlin transportují také NO_2^- ([Sugiura et al. 2007](#), [Pike et al. 2004](#)). Tak jako NPF, NRT2 rodina jsou H^+ symportéry.

Třetí skupinou je rodina CLC (chloride channels). Dlouho panovala myšlenka, že transportují jen chloridy, ale De Angeli et al. ([2006](#)) ukázali studiem mutantů *A. thaliana*, že CLCa protein může být H^+ antiporter s 2 molekulami NO_3^- . CLCa je důležitý při akumulaci NO_3^- ve vakuole a podobnou roli jako CLCa může mít i CLCb ([von der Fecht-Bartenbach et al. 2010](#)). Role dalších 5 genů z této rodiny v rostlinách není známa ([Barbier-Brygo et al. 2011](#)).

Poslední, čtvrtou skupinou jsou geny z rodiny SLAC/SLAH (slow anion channel). Tyto proteiny jsou zapojeny v aniontových tocích zavírání průduchů ([Negi et al. 2008](#), [Vahisalu et al. 2008](#)).

Výše popsaná data se vztahují k *Arabidopsis thaliana*, i když k podobným zjištěním se dospělo i zkoumáním jiných rostlin jako např. ječmen (*Hordeum*; [Trueman et al. 1996](#); [Vidmar et al. 2000](#)), tabák (*Nicotiana plumbaginifolia*; [Quesada et al., 1997](#); [Krapp et al. 1998](#)), sója (*Glycine max*, [Amarasinghe et al. 1998](#)), *Medicago trunculata*; [Yendrek et al. 2010](#), [Morere-Le Pawen et al. 2011](#)) a rýže (*Oryza sativa*; [Lin et al. 2000](#)).

1.2.2.1.2 Transportéry NH_4^+

NH_4^+ je přijímán rychleji než NO_3^- za potřeby méně energie ([Bloom et al. 1992](#)) a není

z kořene dál transportován dálkovým transportem. Nalezeny byly alespoň dva kineticky odlišné komponenty příjmu NH_4^+ , nízkoafinitní saturovatelný (LATS) a vysokoafinitní nesaturovatelný (HATS; [Ullrich et al. 1984](#)).

HATS jsou regulovány obsahem N v rostlině, při jeho úbytku se zvyšuje aktivita HATS, ale zvýšená koncentrace NH_4^+ vede k potlačení aktivity HATS ([Wang et al. 1993](#)). Aktivita LATS vzrůstá lineárně se zvýšením koncentrace NH_4^+ . Příjem NH_4^+ z půdního roztoku je poháněn NH_4^+ transportéry, které byly identifikovány a částečně charakterizovány u různých rostlinných druhů ([Sonoda 2003](#)). První izolovaný rostlinný transportér NH_4^+ byl AtAMT1 izolovaný z *Arabidopsis thaliana* ([Ninnemann 1994](#)). Poději, byly v huseníčku nalezeny další příbuzné transportéry ([Yuan et al. 2009](#), [von Wirén et al. 2000](#), [Gazzarrini 1999](#)) a byly identifikovány také v dalších druzích rostlin, jako jsou rýže (*Oryza sativa*; [von Wirén et al. 1997](#), [Suenaga et al. 2003](#)), rajče (*Solanum lycopersicum*; [Becker et al. 2002](#), [von Wirén et al. 2000b](#), [Lauter 1996](#)), řepka (*Brassica napus*; [Pearson et al. 2002](#)), štirovník (*Lotus japonicus*; [Simon-Rosin et al. 2003](#), [Salvemini et al. 2001](#)) či sója (*Glycine max*; [Kobae et al. 2010](#)).

1.2.3 Asimilace dusíku v rostlině

Po příjmu NO_3^- je nutná jeho redukce. Redukce NO_3^- probíhá v rostlině v závislosti na věku, druhu a aktuálních podmínkách v nadzemní či podzemní části. U některých rostlin je upřednostňována redukce v nadzemní (např. vytrvalé rostliny mírného pásma) někde podzemní části (např. rostliny tropické a subtropické oblasti; [Bush 1999](#), [Jiang et Hull 1999](#)). Pokud je ale dostupnost NO_3^- nízká, většina je zpracovaná v kořenech a xylémem transportovaná ve formě redukovaných sloučenin N, především AMK ([Marschner 1995](#), [Bush 1999](#), [Lea et Ireland 1999](#)).

Redukce NO_3^- začíná přeměnou na NO_2^- pomocí enzymu nitrátreduktázy (NR). Redukce NO_3^- na nitrit (NO_2^-) v rostlině probíhá v cytoplazmě, nezávisle na tom, zda k ní dochází v kořenech nebo v prýtu ([Meyer et Stitt 2001](#)). NR funguje jako cytoplazmatický homodimer a každá podjednotka obsahuje 3 prostetické skupiny: flavinadenindinukleotid, Fe-hem a molybdenový kofaktor ([Campbell 1999](#), [Meyer et Stitt 2001](#)). NR je regulovaná na transkripční i posttranslační úrovni, patrně především 14-3-3 proteinem a fotosyntézou ([Lambeck 2012](#), [Heidari 2011](#), [Lillo 2008](#)).

Vzniklý NO_2^- je přemístěn do plastidů a následně redukován na NH_4^+ . Reakce je

katalyzovaná enzymem nitritreduktázou (NiR). NiR je monomerní polypeptid obsahující sirohemovou prostetickou skupinu ([Marschner 1995](#)). Gen NIR1 pro NiR je pozitivně regulován např. světlem, sacharidama, glutaminem ale i transkripční faktor HY5 ([Huang et al. 2015](#)). Celá přeměna NO_3^- na NH_4^+ je energeticky velice náročná a vyžaduje 15 molekul ATP na molekulu NO_3^- ([Salsac et al. 1987](#)).

Vzniklý NH_4^+ je detoxifikován (asimilován) do AMK cestou GS/GOGAT, a to tak, že je za katalýzy enzymem glutaminsyntetázou (GS) navázán na glutamát za vzniku glutaminu, přičemž většina je asimilována v cytoplasmě a plastidech ([Andrews et al. 2013](#)). Glutamin potom slouží jako zdroj aminoskupiny pro syntézu nové molekuly glutamátu z 2-oxoglutarátu transaminační reakcí.

Přenos aminoskupiny je katalyzován glutamátsyntázou (GOGAT), také známou jako glutamin:2-oxoglutarát aminotransferáza ([Lea et Miffin 2011](#), [Cren et Hirel 1999](#), [Ireland et Lea 1999](#)). GS je v rostlině ve dvou izoformách, a to cytoplazmatická GS1 vyskytující se v cytoplasmě buněk kořene (NH_4^+ z redukce nitrátu v kořenech) floému a listů a GS2 vyskytující se v plastidech buněk kořene a jiných nefotosyntetizujících pletiv, ale také v chloroplastech ([Andrews et al. 2013](#), [Cren et Hirel 1999](#)). Primárním produktem asimilace N v rostlině jsou tedy AMK ([Bush 1999](#)).

1.2.3.1 Syntéza NO v rostlině

NO (oxid dusnatý) je v rostlinách syntetizován několika různými cestami, a to buď enzymaticky nebo neenzymaticky. V literatuře jsou popisovány hlavně dvě enzymatické cesty, a to syntéza NO v rostlině pomocí NR a pomocí enzymu NO syntetázy (NOS).

Cesta vedoucí přes NOS je popsána u savců, ale v rostlinách nebyla identifikována.

NR primárně přeměňuje NO_3^- na NO_2^- , ale v NAD(P)H dependentní reakci může nitrit konvertovat také na NO ([Dean et Harper 1988](#), [Bright et al 2006](#), [Crawford 2006](#)). Kromě NR je v rostlinách NO produkován oxidací L-argininu na L-citrulín ([Asai 2008](#)), cestou, kterou u savců zajišťuje NOS. Který enzym je za tuto reakci odpovědný u rostlin bylo dlouhou dobu předmětem intenzivních výzkumů. Existence takového enzymu byla na základ biochemických experimentů pozorována u řady rostlin ([Leshem 1996](#), [Ninnemann et Maier 1996](#), [Cueto et al. 1996](#)), ale identifikace genů, které ho kódují, se dlouho nedařila. Rostliny totiž nemají geny, které by vykazovaly sekvenční podobnost se savčími NOS ([Guo et al. 2003](#)). Teprve v roce 2003 byl objeven NOS v *Arabidopsis thaliana* (ATNOS1; [Guo et al. 2003](#)), který tuto reakci vykonává, ale

jeho sekvence nebyla podobná žádnému jinému proteinu se známou funkcí ([Guo et al. 2003](#)).

Kromě NR a NOS je ale více různých cest vzniku NO v rostlině ([Yu et al. 2014](#), [Gupta et al. 2011](#); [Mur et al. 2013](#)). Rozdělit by se daly na oxidační a redukční. Mezi oxidační patří jeho produkce z L-argininu, polyaminu a hydroxylaminu, a redukční s nitritem jako substrátem, a to již zmiňovaná NR, nebo na PM umístěný enzym nitrit:NO oxidoreduktáza, která může být dalším zdrojem NO v rostlině ([Stohr et Stremmlau 2006](#)), stejně jako redukce NO_2^- v mitochondriích. Další enzymatický způsob je například enzymem xanthinoxidoreduktázou, která redukuje NO_2^- za vzniku NO a je přítomna v peroxizomech ([Godber et al. 2000](#)). Reakce však funguje jen v anaerobních podmínkách ([del Rio et al. 2004](#)). NO může ale vznikat i neenzymaticky, redukcí apoplastického NO_2^- ([Bethke et al. 2004](#)) nebo světlem poháněnou konverzí karotenoidy z NO_2^- ([Neil et al. 2003](#), [Cooney et al. 1994](#)). Spermin a spermidin také indukovaly uvolňování NO, ale mechanismus zůstává nejasný ([Yu et al. 2014](#)).

1.2.4 Signalizační funkce N v rostlinách

Jak již bylo zmíněno v kapitole [1.2.1](#), signalizace různých forem N je pro rostliny zcela zásadní. Signální úlohu mají NO_3^- , NO ([Domingos et al. 2015](#), [Crawford 1995](#)) a možná také NO_2^- ([Wang et al. 2007](#)). Výzkum signalizace jednotlivých forem N v rostlinách je obtížným problémem. Například NO_2^- je v rostlinách přítomný ve velice nízkých koncentracích ([Marschner 1996](#)). Přitom je také zdrojem signálu odlišného od signalizace NO_3^- či NH_4^+ ([Wang et al. 2007](#)). V takovém případě je prakticky jedinou možností experimentální práce příprava transgenických rostlin s upravenou aktivitou vybraných enzymů. V některých situacích lze využít i citlivých detekčních metod, aplikace specifických inhibitorů či dodání látek, které danou formu N zhášejí či naopak produkují.

1.2.4.1 Signalizace NO_3^-

V literatuře je uváděno, že NO_3^- působí jako signální molekula, která nezávisle na svojí asimilaci řídí metabolismus a vývoj rostliny jako např. indukci metabolismu organických kyselin a potlačování metabolismu škrobu u tabáku ([Crawford et Glass 1998](#), [Scheible et al. 1997](#)). Spouští také geny spojeny s NiR, NR, nitrátovými transportéry, ferredoxin reduktázou, enzymy

pentózofosfátového cyklu ale také gen kódující enzymy v glykolýze a metabolismu trehalóza-6fosfátu či metabolismu a transportu železa a příjmu a redukci sulfátů (Wang et al. 2003). Bylo také pozorováno, že může narušovat dormanci semen (Hilhorst et Karrsen 1998, Derx et Karssen 1993, Alboresi et al. 2005), měnit růst kořene (Remans et al. 2006) i bočních kořenů (Stitt 1999) a zvyšovat poměr prýt:kořen (Scheible et al. 1997). Prodlužování bočních kořenů je stimulováno lokálním zdrojem NO_3^- a pravděpodobně NRT2.1 je senzorem tohoto signálu (Little et al. 2005). Nitrát je schopný regulovat velmi rychle expresi mnoha genů (shrnutí v Krapp et al 2014), včetně například genů přímo nebo nepřímo ovlivňujících redukci nitritu a genů kódujících NR, transportér NRT1 a GS (Wang et al. 2000).

Bylo zjištěno, že gen ANR1 je klíčový regulátor odpovědi rostliny na lokalizovaný zdroj NO_3^- (Zhang et Forde 1998). Po inaktivaci tohoto genu prodlužování bočních kořenu nereagovalo na zdroj NO_3^- (Forde et Walch-Liu 2009).

Studium efektu NO_3^- je ale prakticky nemožné oddělit od efektu NO, který vyvolává podobné reakce rostlin (viz následující kapitola 1.2.4.2). Někteří autoři se proto domnívají, že veškeré pozorované reakce rostlin na NO_3^- mohou být zprostředkovány skrze signalizaci NO (Andrews 2013).

1.2.4.2 Signalizace NO_2^-

Bylo popsáno, že nitrit indukuje klíčení u více rostlinných druhů (Hendricks et Taylorson 1974, Cohn et al. 1983). V té době se ale neuvažovalo o roli NO jako signální molekuly a proto je možné že tato indukce může být také způsobena NO, který z nitritu může vznikat (Wang et al. 2007). Wang et al. (2007) naproti tomu zjistili že právě NO_2^- indukuje genovou expresi mnoha genů způsobujících asimilaci NH_4^+ a NO_3^- ale i C a N metabolismus a navrhují, že nitrit by mohl být lepší signální molekulou než nitrát. Zdá se tedy, že i samotné NO_2^- je zdrojem signálu, nicméně tato problematika vyžaduje další studium.

1.2.4.3 Signalizace NO

Toxický plyn NO je v nízkých koncentracích jedna z nejdůležitějších signálních molekul živých organismů (Mur et al. 2013, Delledonne 2005, Lamattina et al. 2003, Schmidt et Walter 1994), která v rostlinách ovlivňuje vícere fyziologické procesy (Lamattina et al. 2003, Benson-Bard et al. 2008, He et al. 2004) jako interakce s mikroorganismy či otvírání průduchů (Mur et al.

[2013](#)). Do pozornosti se dostal například díky tomu, že reguluje interakce rostliny s patogenem ([Mur et al. 2013](#), [Delledonne et al. 1998](#), [Durner et al. 1998](#)). Následující kapitola shrnuje nejvíc zkoumané oblasti signalizace NO, a to hlavně ty, které jsou důležitými zjištěními pro tuto práci.

1.2.4.3.1 Úloha NO při klíčení a dalším růstu a vývoji

NO má vliv na rostlinu od klíčení po senescenci. Zajímavé například je, že by se mohl podílet na procesech zprostředkovaných světlem. Do této kategorie spadá i pro tuto práci důležité klíčení semen ([Beligni et Lamattina 2000](#)), které může být urychleno NO skrze potlačení syntézy etylénu ([Lindermayr 2005](#)). Pomocí tohoto zjištění můžeme částečně vysvětlit klíčení dormantních semen indukovaných dýmem. Dým totiž obsahuje NO₂, který je produktem oxidace NO ([Keeley et Fotheringham 1997](#)) a indukční efekt dýmu mohl být způsoben právě NO. Že se mohlo jednat o NO, mohou svědčit i práce využívající donory NO. Podobně jako Beligni et Lamattina ([2000](#)), pozorovali po aplikaci SNP (sodium nitroprusside) - donoru NO stimulaci klíčení semen, tak i Giba et al. ([1994](#)) pozorovali po přidání donoru zvýšení klíčivosti semen jak u *Paulownia tomentosa*, tak i u *Stellaria media* ([Giba et al. 1992](#)). U *Paulownia tomentosa* se i po aplikaci nitrátu (KNO₃, 10 mM) snížila potřeba ozáření semen červeným světlem ([Grubišić et Konjević 1990](#)), a tak se zdá, že NO je zapojený ve fytochromem kontrolovaném klíčení semen ([Giba et al. 1998](#)). Nitrit zde podporoval klíčení za nízkého pH, kdy z něho vzniká NO ([Giba et al. 1998](#)). Přidání SNP (koncentrace 0.1-800 μM) indukovalo také klíčivost *Lupinus luteus* ([Kopyra et Gwózdź 2003](#)) a potlačovalo inhibiční efekt těžkých kovů a salinity na růst kořenů. Roli NO na prolamování dormance a klíčení semen se zabývali detailně i v práci Giba et al. ([2006](#)). Výše popsané informace můžou být přesto rozporuplné, protože podle Giba et al. ([1994](#)) neexistuje důkaz, že by NO byl fyziologicky aktivní v procesech spojených s klíčením semen, a navrhují i další možné vysvětlení - a to, že SNP, které se spolu se SNAP nejčastěji používá při výzkumu NO, má schopnost přijímat elektrony ([Bates et al. 1991](#)). Na druhou stranu Bethke et al. ([2005](#)) používali také čistý plynný NO a potvrdili indukční efekt NO na klíčení semen *Arabidopsis thaliana*. K produkci NO v rostlině v této práci použili SNP, nitrit ale i přidání kyanidu, vše s dobrými výsledky. Lze proto usoudit že NO je opravdu potřebné pro zrušení dormance ([Bethke et al. 2005](#)). Bethke et al. ([2005](#)) dále uvažují o propojení ABA a etylénu s NO ([Bethke et al 2004](#)). To potvrzuje i práce Gniazdowska et al. ([2007](#)), která inhibitorem etylénu zvrátila indukční efekt NO u *Malus*. Navrhují také, že NO indukuje klíčení stimulací syntézy etylénu a věnují se tomu i v další práci ([Gniazdowska et al.](#)

[2007](#)). Zdá se, že existuje propojení etylénu s NO ale také s ABA při regulaci dormance a klíčení ([Arc et al. 2013](#)).

I po vyklíčení, je ještě etiolovaný semenáč také ovlivněn NO, který, jak se zdá, navozuje de-etiolizaci a pak také ovlivňuje prodlužování hypokotylu a internodií ([Beligni et Lammatina 2000](#)). Už dlouho je známo, že NO má také vliv na další růst rostlin. U rostlin rajčat byl například pozorován inhibiční (40-80 ppm), ale i stimulační efekt NO (0-20 ppm), přičemž bylo pozorováno, že odrůda, která byla NO nejvíc stimulována je odrůda často pěstována ve sklenících, které bývají NO kontaminovány ([Anderson et Mansfield 1979](#)). Podobné pokusy byly provedeny i na salátu ([Hufton et al. 1996](#)), ale i s hrachem, kde nízké koncentrace NO zvyšovaly růst listů a naopak vysoké koncentrace růst inhibovaly ([Leshem et al. 1996](#)). Nejenom nadzemní, ale i podzemní části rostliny může ovlivnit NO, který se pravděpodobně uplatňuje také v kontrole růstu kořene kukuřice (*Zea mays*). V tomto případě byla nalezena NOS v částech pletiva, které se právě dělí ([Ribeiro et al. 1999](#), [Gouvea et al. 1997](#)). I pozdější studie zkoumající mutanty huseníčku (*A. thaliana*) zjistily, že zvýšení koncentrace NO snížilo auxinový transport, čím byl ovlivněn růst kořene ([Fernandez-Marcos et al. 2011](#)).

NO také ovlivňuje pohlavní rozmnožování. Ovlivňuje regulaci prorůstání pylové láčky ([Prado et al. 2004](#)), přičemž pyl samotný uvolňuje NO ([Bright et al. 2009](#)), nebo se také může uplatňovat např. v pylové inkompatibilitě ([Wilkins et al. 2011](#)). Bylo také pozorováno, že NO opozdil kvetení u *Arabidopsis thaliana* ([He et al. 2004](#), [Kwon et al. 2012](#)) a nepřekvapí ani, že NO pravděpodobně zpomaluje i senescenci ([Neill et al. 2003](#)) a může nepřímo ovlivnit zrání semen ([Beligni et Lammatina 2000](#)) či plodů ([Leshem et Wills 1998](#), [Leshem et al. 1998](#)).

1.2.4.3.2 Úloha NO v interakci rostlin s jinými organismy

NO je pro rostlinu velice důležitý také v interakcích s mikroorganismy, a to jak s patogenními, tak symbiotickými. Interakce NO s jinými organismy jsou v recentní době intenzivně studovány. U *Fabaceae* je např. nutný k optimálnímu navázání symbiomy mezi *Medicago trunculata* a *Sinorhizobium meliloti*. V dospělých nodulech vede zvýšení endogenního NO k poklesu fixace N a dřívější senescenci nodulů ([Cam et al. 2012](#)). Naopak snížení obsahu NO vede ke zpoždění jejich senescence ([Cam et al. 2012](#)). NO je zapojený v utváření symbiomy a pohánění fixace N spojováním redoxních sensorů a hemových skupin jako leg-hemoglobin a FixL ([Mathieu 1998](#)). Řešená je i otázka, kde v symbiotickém vztahu NO vzniká. Bakteriální flavohemoglobin

druhu *S. melilotii* ovlivňuje úroveň NO v nodulech a tato bakterie má dva způsoby, které kontrolují obsah NO a které jsou nezbytné k udržení efektivní fixace N₂ (Meilhoc et al. 2013). NO může ale vznikat v nodulu nejen v bakteriích ale i v rostlinné cytoplazmě (Sánchez et al. 2010, Horchani et al. 2011).

Co se týče interakcí s patogeny, NO se dostal do pozornosti i proto že se uplatňuje také v rezistenci rostliny k patogenům (Mur et al. 2006). Infekce tabáku virem tabákové mosaiky vedla k zvýšené aktivitě NOS (Durner et al. 1998). Podobné zvýšení aktivity NOS u tabáku bylo pozorováno i při infekci *Ralstonia solanacearum* (Huang et Knopp 1998). Rychlá akumulace NO byla pozorována také u sóji a *Arabidopsis thaliana*, a to jak v reakci na houbového tak i v reakci na bakteriální patogen (Delledonne 1998). NO také indukoval akumulaci fytoalexinu rishitinu u hlíz bramboru (Noritake 1996). Tato indukce byla inhibována zhasičem cPTIO anebo radikálovým vychytávačem Tiron, což naznačuje, že NO indukuje aktivitu fytoalexinu (Noritake 1996).

NO může i zvýšit obsah chlorofylu v listech hrachu (Leshem et al. 1997) a po infekci bramboru *Phytophthora infestans* zpomaluje jeho ztrátu (Lazalt et al. 1997). Tato schopnost zadržování chlorofylu může být spojena s tím, že NO zvyšuje dostupnost železa (Graziano et al. 2002).

1.2.4.3.3 NO při stresu

NO může být také zapojený do indukce hypersensitivní reakce (HR). např. u *A. thaliana*, kde suspenze buněk po napadení bakterií vytvářela víc NO, který pak indukoval PCD nezávisle na ROS (Clarke 2000). Předchozí výsledky však popisují funkci NO v HR jak nezávisle, tak společně s ROS (Yun et al. 2011, Delledonne 1998, Durner et al. 1998). Další výsledky naznačují, že je nutný určitý poměr mezi produkcí ROS a NO, aby došlo k HR (Delledonne et al. 2001), nebo k HR může vést působení NO s H₂O₂ (de Pinto et al. 2002). de Pinto et al. (2002) ale narozdíl od Clarke (2000) nezjistili samotný indukční efekt na PCD, což vysvětlují rozdílným použitým rostlinným materiálem. de Pinto et al. (2002) dále popisují navýšování hladiny antioxidantů pomocí NO, což souhlasí i se staršími zjištěními (Beligni et Lamattina 1999).

I PCD, která nastává po mechanickém poškození, může být navozena NO. Centrifugace navodila navýšení NO, které předcházelo DNA fragmentaci následné buněčné smrti apoptózou (Pedroso et al. 2000).

NO dále funguje i jako signální molekula při abiotickém stresu jako je například nedostatek

vody či zasolení ale i v chladovém a stresem vysokou teplotou ([Neill 2002](#), [Neil et al. 2007](#), [Cantrell et al. 2011](#), [Yu et al. 2013](#)). Zvýšené hladiny NO naměřili u hrachu Leshem et Haramaty ([1996](#)) při vadnutí, naproti tomu přesný opak naměřili Magalhaes et al. ([2000](#)) u *A. thaliana*. NO může vést i ke zlepšení rezistence ke stresu, např. zvýšit resistenci rostlin k chladu ([Lamattina et al. 2001](#))

1.2.4.3.4 Interakce NO s fytohormony a účast v signálních drahách

NO interaguje s fytohormony. Může indukovat tvorbu kyseliny salicylové ([Durner et al., 1998](#)) a jeho syntéza může být indukována například cytokininy ([Tun et al. 2001](#)). NO může také napodobovat efekt cytokininu (betalainová akumulace, [Scherer et Holk 2000](#)). Později bylo také dokumentováno, že NO zprostředkovává auxinovou odpověď vyvolávající větvení laterálních kořenů u okurky ([Pagnussat et al. 2002](#)) a pozastavuje vývoj hlavního kořene a podporuje růst bočních kořenů u rajčete ([Correa-Aragunde et al. 2004](#)) a *A. thaliana* ([Méndez-Bravo et al. 2010](#)). Nejvíce byla ale zkoumána spojitost NO s ABA a etylénem. NO je například signální komponentou v ABA indukovaném zavírání průduchů ([Neill et al. 2002](#), [Garcia-Mata et Lamattina 2002](#), [Desikan et al. 2002](#)). Zdá se, že ABA indukovaná produkce H₂O₂ pohání tvorbu NO, který indukuje zavírání průduchů ([Bright et al. 2005](#)). Je dále pravděpodobné, že NO indukuje zavírání průduchů skrze aktivaci MAPK (mitogen-activated protein kinase) signální kaskády ([Zhang et al. 2007](#), [Bright et al. 2006](#)).

Více prací se zabývá také vztahem NO a etylénu. Po zvýšení koncentrace NO aplikací SNAP za stresových podmínek se snížila syntéza etylénu u hrášku ([Leshem et Haramaty 1996](#)), ale Magalhaes et al. ([2000](#)) pozoroval opačný efekt u *Arabidopsis*, což mohlo být způsobeno tím že v každé práci byl použit jiný donor v jiné koncentraci, nebo také různou reakcí daného druhu. Je déle známo, že etylén navozuje zrání plodů, v poslední době se ale zdá, že právě NO může inhibovat syntézu etylénu, a zpomalit tak zrání a senescenci plodů ([Leshem et Wills 1998](#), [Leshem et al. 1998](#)) nebo zrání semen ([Beligni et Lammatina 2000](#)).

Dodáním donorů NO k rostlinám nebo buněčné suspenzi tabáku se spustila exprese obranných genů kódujících pathogenesis-related (PR)-1 protein a fenylalaninamoniaklyázu (PAL; [Durner et al. 1998](#)). Tyto geny byly také indukovány cGMP a cyklickou ADP ribosou (Cadpr; [Durner et al. 1998](#)). Ošetření NO spustilo dočasný nárůst cGMP podobný tomu, který je popsán po indukci NO při uvolnění hladkých svalů u zvířat ([Durner et al. 1998](#), [Stamler 1994](#)). Navíc aktivace exprese PAL genu NO byla potlačena guanylátcyklázovými inhibitory ([Durner et al. 1998](#)). Je

možné, že cGMP se také účastní v indukci transkripce PAL a chalkonsyntázy v NO ošetřené suspenzi buněk sóji ([Bowler et al. 1994](#), [Delledonne 1998](#)).

Zdá se, tato signální molekula je velice významná nejenom u živočichů ale i u rostlin. Je důležitá snad ve všech procesech probíhajících v rostlině a pořád jsou publikována další data o jejím významu.

1.2.5 Kontaminace N v přírodě a legislativa

Hlavní formou N, jejíž koncentrace v prostředí se dlouhodobě sledují, je bezesporu nitrát. Koncentrace nitrátů v půdním roztoku na přirozených stanovištích se pohybují od 0,1 - 100 mg/l NO_3^- ([Callesen et al. 1999](#); [Pedersen et al. 2007](#); [Fetter et al. 2012](#)). Hygienický limit na obsah dusičnanů v pitné vodě v EU je 50 mg/l. Reálně bylo například v Pražské vodě průměrně za červenec 2016 naměřeno 18,6 mg/l dusičnanů ([PVK 2016](#)), ale například ke dni 3. 8. 2006 to byl obsah NO_3^- 37,6 mg/l (Želivka) a 19,2 mg/l (Káraný; [PVK 2006](#)).

Podle dokumentu Commission of the European Communities ([2007](#)) obsah dusičnanů v mnohých evropských zdrojích vod již překračuje 100 mg/l. Jedná se o veliký problém, kterému je přikládána v recentní době náležitá pozornost. Existuje např. tzv. nitrátová směrnice, což je předpis EÚ 91/676/EHS vytvořen pro ochranu vod před znečištěním NO_3^- ze zemědělství, která je v ČR implementována v třech předpisech. V zákoně č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon) ve znění pozdějších předpisů, dále v nařízení vlády č. 262/2012 Sb., o stanovení zranitelných oblastí a akčním programu, v zákoně o hnojivech č. 156/1998 Sb., ve znění pozdějších předpisů..). V zákoně je definován pojem "zranitelné oblasti", které jsou definovány jako území, kde se koncentrace NO_3^- zejména v pitné vodě pohybuje nad 50 mg/l nebo této hodnoty mohou dosáhnout.

Kontaminaci prostředí amonným dusíkem a nitritem je věnována výrazně menší pozornost. Vyhláška č. 252/2004 Sb. Stanovuje hygienický limit pro NO_2^- i NH_4^+ který je pro oba stejný a dokonce 10 násobně nižší než pro NO_3^- (0,5mg/l).

1.2.6 Zjišťování účinku NO v rostlině

Nejpravděpodobnějším kandidátem, který by v rostlinách mohl způsobovat inhibiční efekt NO_3^- , je zřejmě NO. Proto se jeho studiu detailně věnuji v této práci a z toho důvodu také dále popisuji, jeho studia možnosti.

1.2.6.1 Aplikace donorů a zhášeců NO

Účinek NO se nejčastěji zjišťuje pomocí jeho zhášeců a donorů. Nejčastěji používané zhášecé NO jsou PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid) a cPTIO (2-(4-Carboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid draselná sůl; [Pagnussat et al. 2002](#), [Ruan et al. 2014](#), [Tun et al. 2006](#) a další). Zhášec PTIO je lipofilnější než cPTIO, proto je možné očekávat, že PTIO lépe proniká plasmatickou membránou. Výhodou cPTIO je zase rozpustnost ve vodě a vyšší reaktivita ([Akaike et al. 1993](#), [Nakatsubo et al. 1998](#)). PTIO a cPTIO jsou většinou používány v koncentracích 5 - 400 μM , ale také až 0,2 mM ([Pagnussat et al. 2002](#), [Ruan et al. 2014](#), [Tun et al. 2006](#) a další).

Nejčastější donory NO pak jsou SNP (sodium nitroprusside) a SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin; [Neil et al. 2002](#), [Pagnussat et al. 2002](#), [Garcia-Mata et Lammattina 2001](#), [Beligni 2000](#) a další).

Z NO donorů je za účinnější považován SNAP ([Floyszak-Wieczorek 2006](#)), který se ale rychleji rozkládá (doporučení Sigma). NO donory SNP a SNAP jsou používány v experimentech s rostlinami v koncentracích 0,1-20-500 μM ([Neil et al. 2002](#), [Pagnussat et al. 2002](#), [Garcia-Mata et Lammattina 2001](#), [Beligni et al. 2000](#) a další).

1.2.6.2 Aplikace barviva detekujícího NO

Koncentraci NO v rostlinných pletivech můžeme pozorovat pomocí detekčního fluorescenčního barviva schopného průchodu buňkou, které se navazuje na NO (diaminorhodamin-4M acetoxymethyl esteru - DAR-4M-AM; [Tun et al 2006](#), [Tun et al. 2008](#), [Kikushi et. al 2008](#)) za vzniku červeně svítícího produktu. Hodnoty excitace a emise tohoto barviva udávané v různých zdrojích se liší, podle specifikací výrobce ([Sigma Aldrich 2016](#)) nutno počítat s rozpětím excitačních (552 - 562 nm) a emisních (575 - 580 nm) vlnových délek. V praxi používaná excitace je 543 - 560 nm a emise 570 - 575 nm ([Corpas et al. 2009](#), [Shimoda 2009](#), [Tun et al 2008](#), [2006](#), [Kojima 2001](#)). Mezi barvivy reagujícími s NO jako např. DAR-4M nebo DAF-2 DA se jedná o nejvíce

specifické a stabilní barvivo, které má vyšší intenzitu fluorescence po reakci s NO než jiné ([Kojima 2000](#), [Kojima 2001](#)). DAR-4M AM však může mírně reagovat také s jinými molekulami jako dehydroaskorbát, takže je výsledky nutné interpretovat ve vztahu k dalším experimentům ([Nagata et al. 1999](#), [Zhang et al. 2002](#), [Ye et al. 2008](#)).

Délka inkubace se také liší v různých pracích v rozmezí 15 minut až 18 hodin a používá se v koncentracích 1-5 μM ([Kikushi et al. 2008](#), [Corpas et al. 2009](#), [Shimoda 2009](#), [Tun et al. 2008](#), [2006](#)).

1.3 Klíčení semen orchidejí a jeho regulace

Stavba semen orchidejí je mezi rostlinami specifická a regulace klíčení jejich semen si proto na závěr zaslouhuje samostatné pojednání.

1.3.1 Stavba semen

Všechny druhy orchidejí jsou v přírodě více či méně závislé na houbovém symbiontu a to alespoň ze začátku svého vývoje ([Smith et Read 2008](#)).

Většina rostlin má semena, která jim umožňují přečkat nevhodné podmínky a vyklíčit v co nejvhodnější době. Právě mykoheterotfí (kam patří také orchideje) a parazitické rostliny mají nejmenší semena mezi krytosemennými rostlinami ([Leake 1994](#), [Eriksson et Kainulainen 2011](#)), která mohou mít hmotnost jen 1 μg ([Ziegler 1981](#)). Taková semena bývají vytvářena ve velkých množstvích ([Arditti et Ghani 2000](#)) a označují se jako tzv. prachová semena.

Zralá semena orchidejí obsahují jen embryo obalené dvěma vrstvami osemení. Embryo se dále vyvíjí mimo mateřskou rostlinu a po vyklíčení se nazývá protokorm ([Johansen 1950](#), [Pridgeon et al. 1999](#)).

1.3.2 Dormance

To že semena nevyklíčí za nevhodných podmínek zabezpečuje jistý vnitřní blok - dormance ([Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006](#)). Stejně jako u většiny ostatních rostlin, i u semen orchidejí můžeme rozlišit fyzikální a fyziologickou dormanci ([Figura 2013](#)).

1.3.2.1. Fyzikální dormance

Na existenci fyzikální dormance u semen orchidejí poukazuje několik faktů. U orchidejí je zapříčiněna 2 vrstvami osemení ([Veyret 1969](#), [Sgarbi et Prete 2009](#)), přičemž vnitřní vrstva se může skládat i z více než jedné dále odlišitelné vrstvy ([Beer 1863](#), [Yamazaki et Miyoshi 2006](#), [Vasudevan et van Staden 2010](#)).

Osemení zralých semen je patrně špatně propustné a hydrofobní. V tomto kontextu je nápadné rutinní ošetřování semen před výsevem žíravinami. Semena se před výsevem desinfikují nejenom pro odstranění kontaminací, ale také kvůli narušení jejich dormance ([Rasmussen 1995](#)). Některá semena klíčí již po ošetření etanolem ([Kmecová 2011](#)), ale mnohé další druhy vyžadují silnější oxidační agens, jako jsou chlornany (např. [Ponert et al. 2013](#)). U druhů, kde ani kombinace chlornanu a etanolu není dostačující se navíc využívá kyselina sírová ([Malmgren 1996](#)).

Předpokládá se, že v přírodě fyzikální dormanci narušují houby ([Gryndler et al. 2004](#), [Baláž 2011](#)).

1.3.2.2 Fyziologická dormance

Fyziologická (vnitřní) dormance se nejnápadněji projevuje nutností stratifikace semen mnoha hlavně temperátních druhů (např. [Rasmussen 1992](#), [Steele 1996](#), [Øien 2008](#)), které klíčí až po periodě chladu ([Rasmussen 1992](#), [Ponert et al. 2013](#)). U ostatních druhů se ale fyziologická dormance může uplatňovat také. Zralá semena mohou obsahovat ABA ([Van Waes 1984](#), [Lee et al. 2007](#)), která inhibuje klíčení ([Hilhorst 1995](#)). U obtížně klíčících druhů byla v semenech pozorována vyšší hladina ABA, než u těch, které klíčí dobře ([van der Kinderen 1987](#)). K degradaci ABA může docházet během desinfekce semen chlornany ([Lindén 1980](#), [Steele 1996](#)). Klíčení semen orchidejí oproti tomu mohou stimulovat přidané fytohormony, především cytokininy ([Pierce et Cerabolini 2011](#), [Steward et Kane 2006](#), [Steele 1996](#), [Van Waes et Debergh 1986](#), [Rasmussen 1995](#)) a etylén ([Nakamura et al. 1975](#)). Klíčení můžou ovlivňovat i jiné látky. Specifické druhy orchidejí klíčí často na specifickém médiu. Může to být způsobeno rozdílnou osmolaritou nebo nevhodným složením média ([Rasmussen 1995](#)), ale v některých případech nejsou důvody, proč rostliny neklíčí jasné. Dormanci by například mohl narušovat i NO_3^- který prokazatelně snižuje

klíčivost u *P. albida* ([Ponert et al. 2013](#)).

Nutno také zmínit že většina hlavně temperátních druhů orchidejí vyžaduje alespoň ze začátku kultivace tmu ([Van Waes et Debergh 1986](#), [Arditti 2008](#), [Anderson 1996](#), [Sgarbi et Prete 2009](#), [Harvais et Hadley 1967](#), [Rasmussen 1990](#)). Jedná se pravděpodobně o mechanismus, který má zabezpečit že semeno vyklíčí pod zemí ([Stoutamire 1996](#)).

1.4 Vliv N na orchideje

Při kultivaci orchidejí v podmínkách in vitro je velmi důležité minerální složení média. Z dostupných údajů se jako jedna z nejdůležitějších jeví právě forma N ([Tavares et al. 2012](#)). Většina médií, i ta pro temporální orchideje, úspěšně používaná na kultivaci orchidejí in vitro obsahují anorganický dusík ve formě NO_3^- , NH_4^+ nebo nejčastěji obou forem spolu ([Ponert et al. 2013](#); [Malmgren et Nyström 2016](#), [Rasmussen 1995](#)). V asymbiotických kulturách musí být v médiu forma N, kterou rostlina může využít v přiměřených koncentracích ([Rasmussen 1995](#)). Po přidání NH_4^+ do média vede jeho příjem k uvolňování H^+ , což okyseluje substrát ([Fitter et Hay 1987](#)) a může inhibovat růst vápnomilných rostlin, a naopak příjem NO_3^- vede k nárůstu pH.

Efekt anorganického N v médiu na klíčení orchidejí byl zkoumán opakovaně. Stimulační efekt nitrátů na klíčení orchidejových semen byl pozorován u tropické *Bletilla striata* ([Ichihashi et Yamashita 1977](#), [Ichihashi 1978](#)), ale i semenáče temperátní *Dactylorhiza praetermissa* reagovaly pozitivně na přidání NH_4NO_3 ([Dijk et Eck 1995](#)). Nemusíme jít daleko – i naše mezofilní *Neottinea ustulata* se může objevit na 5 let opuštěném poli (vlastní pozorování) nebo např. spíše lesní druh *Epipactis helleborine* je nalézán na poloruderálních stanovištích ([Procházka 1980](#), [Procházka et Velíšek 1983](#), [Wittig et Wittig 2007](#)), nebo dokonce i na sójovém poli, které se pravděpodobně hnojilo ([Rydlo 2008](#)). Ostatně osídlování různých poloruderálních habitatů nalezneme i u řady mediteránních druhů ([Delforge 2006](#)). Změna úživnosti stanoviště ale očividně neprospěla např. prstnatci *D. majalis* rostoucímu na holandských sečených loukách. Na louce s jeho výskytem došlo po hnojení NPK hnojivem k poklesu početnosti tohoto druhu, snížení jeho biomasy a k poklesu kvetoucích jedinců, *D. majalis* zde byla posléze vytlačena expanzivními druhy ([Dijk et Olf 1994](#)). Negativní efekt anorganických forem N je pozorován častěji než pozitivní, a to u mnohých druhů orchidejí ([Eiberg 1970](#); [Van Waes et Debergh 1986](#); [Rasmussen 1995](#); [Kauth et al. 2006](#); [Sgarbi et al. 2009](#)). Např. semenáče *Dactylorhiza incarnata* byly citlivé na aplikaci NH_4NO_3 ([Dijk et Eck 1995](#)) a např. semenáče hybridní *Cattleya* nebyly schopné využít NO_3^- prvních 60 dní vývoje

narozdíl od NH_4^+ ([Raghavan et Torrey 1964](#)). U *Phalaenopsis amabilis* se zdá dle [Tavares et al. \(2012\)](#) vhodnější používat v MS médiu ([Murashige et Skoog 1962](#)) poloviční nebo ještě nižší koncentrace anorganických forem N v médiu.

Z anorganických forem (NO_3^- , NH_4^+) se jako vhodnější jeví NH_4^+ (např. [Díaz-Álvarez 2015](#), [Majerowicz 2000](#), [Hew et al. 1993](#)). Jak epifytické, tak i terestrické druhy vykazují často preferenci k organickému dusíku (AMK) oproti NO_3^- či NH_4^+ ([Nadarajan et al. 2011](#), [Sgarbi et al. 2009](#), [Kauth et al. 2006](#), [Rasmussen 1995](#), [Eiberg 1970](#), [Van Waes et Debergh 1986](#), [Lugo-Lugo 1955](#)) a pozorována byla dokonce i schopnost přijímat přímo močovinu (*Phalaenopsis*; [Trépanier et al. 2009](#)). Celá řada kultivačních médií obsahuje nějaké AMK, buď přímo jako složky média nebo v extraktech z ovoce či zeleniny (např. kokos, banán, ananas, brambor; [Harvais 1984](#), [Borris 1969](#), [Ponert 2009](#)) v podobě yest extractu, caseinu nebo peptonu (Fast 1982, [Michl 1988](#), [Malmgren 1989](#), [Ponert et al. 2013](#)). [Malmgren \(1993\)](#) pozoroval zlepšený růst a vývoj orgánů, když problematicky klíčovím druhům jako *Cypripedium calceolus* nahradil anorganický N plně organickým, ale i dobře klíčící eutrofní druhy *Anacamptis laxiflora* a *Ophrys sphegodes* vyžadovaly v médiu přítomnost jak anorganického, tak organického N v podobě casein hydrolyzátu nebo glutaminu ([Mead et Bulard, 1975, 1979](#)). U tropického zástupce *Galeola septentrionalis* pozoroval [Nakamura \(1982\)](#) nejlepší výsledky za použití směsi AMK anebo močoviny, jednotlivé AMK neměli efekt a podobné výsledky s hydrolyzátem proteinů dosáhli i [Vacín et Went \(1949\)](#). Pro klíčení nezralých semen tropických druhů se z 18 AMK jako nejvhodnější ukázal arginin, který byl stejně dobrým zdrojem N jako NH_4NO_3 ([Spoerl 1948](#)). Není ale jasné, která AMK je esenciální a [Harvais \(1972\)](#) a [Harvais et Raitsakas \(1975\)](#) navrhuji kyselinu asparagovou, glutamovou, arginin a derivát AMK ornithin, zatímco [van Waes \(1984\)](#) dosahoval lepších výsledků s glutaminem než s kyselinou glutamovou. Glutamin se osvědčil i pro výživu *Catasetum fimbriatum* ([Majerowicz 2000](#)). Pro klíčení evropských terestrických druhů se mezi zdroji AMK osvědčil nejvíce casein hydrolyzáta a glutamin ([Van Waes et Debergh 1986](#)). Nutno poznamenat že nejen u anorganických forem ale i v případě AMK může vysoká koncentrace např. peptidů vést k odumírání protokormů (*Cypripedium*, *Ophrys*, *Orchis*; [Malmgren 1989](#)). Horší schopnost využívat anorganické formy N může souviset s mykorrhizní symbiózou, která je nezbytná alespoň pro juvenilní orchideje a AMK pravděpodobně proudí právě přes houbového symbionta ([Dijk et Eck 1995](#), [Read et al. 1989](#)). Fakt, že kořenový systém orchidejí je jen málo vyvinutý, jen potvrzuje představu že mykorrhizní houba, která má mnohem větší dosah na živiny v substrátu, je

velice důležitá pro minerální výživu orchideje ([Smith et Read 1997](#), [Brundrett 2002](#)). Z půdy mohou být organické formy N jako AMK přijímány pomocí hub, které je mohou získávat z organických zbytků nebo AMK mohou být přímo syntetizovány houbami. Harvais et Raitsakas ([1975](#)) si myslí, že kyselina glutamová a asparagová jsou dominantní AMK v hyfách v případě, že je houba pěstována jen s organickými formami N. Ektomykorhizní houby ([Read et al. 1989](#)) stejně jako arbuskulární mohou využít NO_3^- a NH_4^+ ([Johansen 1993](#)), což může platit i pro orchideoidní houby. V tomto kontextu je také zajímavé zjištění, že při symbiotických kulturách bylo pozorováno, že při vyšších koncentracích (nad 3mM NH_4NO_3) mají houby negativní efekt na klíčení orchidejí ([Dijk 1990](#)). Podobné výsledky, kde ustálená symbióza byla pozorována na 10mg/l NO_3^- a vyšší koncentrace vedly k parazitizmu houby, dosáhli i Beyrle et al. ([1991](#)). Práce Wu et al. ([2013](#)) zabývající se *Cymbidium goeringii* popisuje, že nemykorizní rostliny přijímají NO_3^- zatímco mykorizní NH_4^+ a navrhuje, že mykorizní houby by mohly ovlivnit schopnost rostliny přijímat tu či onu formu N. V tomto kontextu je zajímavé, že mykorizní inokulace může zvýšit aktivitu NR, NiR a také GS ([Hajong et al. 2013](#)).

Jiné práce pozorovaly v asymbiotických kulturách 4 druhů orchidejí zajímavé prostorové odlišení aktivity enzymů NR a GS. Aktivita obou je celkově nízká. Aktivita NR byla vyšší v apikální části kořenů a nižší v listech. Naopak GS měla vyšší aktivitu v listech a nižší v kořenech ([Majerowicz et al. 2000](#), [He et al. 1993](#)). Je proto možné, že NO_3^- se u orchidejí přednostně redukuje v kořenech a NH_4^+ se přednostně redukuje v nadzemní části.

Zmiňované práce se ale zabývají relativně vysokými koncentracemi iontů, jen výjimečně se vyskytujícími v přírodě, nebo poukazují na relativně slabou inhibici ([Eiberg 1970](#); [Van Waes et Debergh 1986](#); [Rasmussen 1995](#); [Sgarbi et al. 2009](#)). N a jeho atmosférická depozice by mohl být ohrožením pro orchideje ([Díaz-Álvarez 2015](#)). Podle našich dřívějších zjištění ([Ponert et al. 2013](#)) je klíčivost druhu *Pseudorchis albida* inhibována již při 2 mg/l NO_3^- a při 100mg/l neklíčí vůbec. Tento fakt by mohl být přímo odpovědný za vzácnost mnohých druhů.

2 Metodika

Experimenty probíhaly na Katedře Experimentální biologie rostlin PřF UK v Praze.

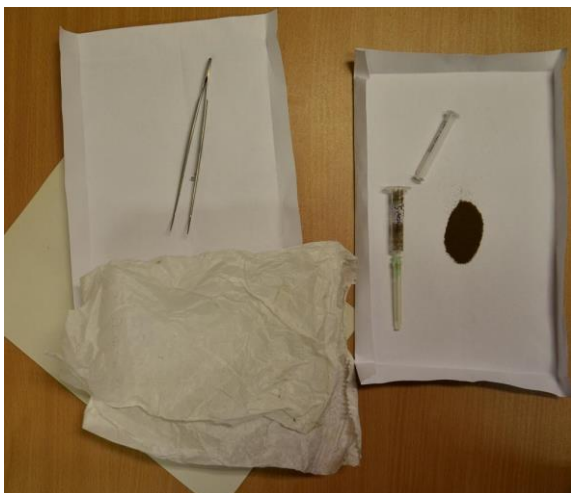
2.1 Zdroje semen

Zdroje semen jsou sepsané v tabulce 2.

Tab. 2 Zdroje semen

Druh	Zdroj	původ matečných rostlin
<i>Anacamptis morio</i>	BZ Praha Troja	Itálie, Apulie
<i>Anacamptis laxiflora</i>	BZ Praha Troja	Itálie, Kampánie
<i>Dactylorhiza majalis</i>	BZ Praha Troja	ČR, Rádlo u Jablonce
<i>Himantoglossum robertianum</i>	BZ Praha Troja	Řecko, Peloponés
<i>Gymnadenia conopsea</i>	BZ Praha Troja	ČR, Bílé Karpaty
<i>Gymnadenia densiflora</i>	BZ Praha Troja	ČR, Bílé Karpaty
<i>Gymnadenia odoratissima</i>	BZ Praha Troja	ČR, Bílé Karpaty
<i>Gymnadenia rhelicanii</i>	BZ Praha Troja	Itálie, Giardino alpino Saussurea, Loc. Pavillon Mont Frety, Courmayeur AO
<i>Ophrys neglecta</i>	BZ Praha Troja	Itálie, Kampánie
<i>Pseudorchis albida</i>	Přírodovědecká fakulta Jihočeské Univerzity	ČR, Šumava, N 49°5', E13°33'

2.2 Příprava semen k výsevu



Obrázek 2: Papír se zahnutými okrajemi a semena vyčištěna od zbytků osemení

Zralá semena byla po dosušení při teplotě 20-25°C umístěna do papírových sáčků podle Ponerta (2009); protože v igelitovém hrozi spaření a elektrostatické nalepení na stěny sáčku. Semena byla vyčištěna od zbytků semeníků pomocí pinzety se zahnutým koncem a natřásáním papíru se zahnutými okraji (obr. 2). Následně byla semena umístěna do stříkačky 5 ml Luer s nasazenou jehlou 0,8x40 (Medicor Neomed, Hungary), která měla v hrdle vloženou síťku pro sítotisk. Do stříkačky nebylo nikdy umístěno víc semen než objem 0,1 ml; v případě že semen z jediné lokality bylo víc, byla

rozdělena do více stříkaček, kde nebyla skladována déle než 10 hodin před výsevem, aby v případě, že nebyla dostatečně vysušena nehrozilo jejich napadení houbami.

Použitá semena byla vždy čerstvá, (nejvíc rok od zberu). Jedinou výjimkou byli semena *H.robertianum*, které byly v době výsevu 6 let staré.

2.3 Desinfekce semen

Semena v stříkačce (časy desinfekce a roztoky použité u jednotlivých druhů jsou popsány v tab. 3) byla desinfikována nejprve v roztoku čistého 70% etanolu po dobu 4-5 minut, pak byla promyta 3x v autoklávované deionizované vodě, pak 0-10 minut desinfikována v 2% roztoku H_2SO_4 a přímo vložena do roztoku $Ca(ClO)_2$ na 4-10 minut. Roztok $Ca(ClO)_2$ byl připravovaný vždy čerstvý podle Ponerta (2009) z 10 g chlórového vápna a 50 ml destilované vody, ponechán odstát hodinu, pak přefiltrován přes filtrační papír a přidána kapka smáčedla Tween 20. Nakonec byla semena 3x propláchnuta deionizovanou vodou autoklávovanou v erlenmayerových baňkách zakrytých alobalem. Alobal byl opálený nad plynovým kahanem, a pak přes něj byla propíchnuta jehla a nasátá voda. Celá desinfekce semen probíhala v laminárním flow-boxu, ale důslednější sterilní práce probíhala až od aplikace $Ca(ClO)_2$ (chirurgické rukavice, sterilizované plochy boxu).

Semena ve vodě po sterilizaci nezůstala déle než 1 hodinu a došlo okamžitě k výsevu - aby voda nepůsobila dále na vydesinfikovaná semena. Všechny roztoky byly do stříkačky nasávány do objemu asi 2-3 ml.

Tabulka 3.- časy desinfekce (minuty) a použitá desinfekční činidla, H₂O byla deionizovaná

druh	ETOH	H ₂ O	H ₂ SO ₄	Ca(ClO) ₂	H ₂ O
<i>G. conopsea</i>	5	3x	10	5	3x
<i>G. odoratissima</i>	5	3x	10	5	3x
<i>G. densiflora</i>	5	3x	10	5	3x
<i>A. morio</i>	4	3x	-	4	3x
<i>A. laxiflora</i>	4	3x	-	4	3x
<i>H. robertianum</i>	4	3x	-	4	3x
<i>D. majalis</i>	4	3x	-	4	3x
<i>P. albida</i>	5	3x	10	10	3x
<i>O. neglecta</i>	4	3x	-	4	3x
<i>G. rhelicanii</i>	5	3x	10	5	3x

2.4 Příprava kultivačního média

V asymbiotických výsevech bylo používáno výhradně médium “MON” (viz Příloha I) připravené podle Ponert et al. (2013), a pro symbiotické výsevy modifikované médium OMA (3 g/l mleté ovesné vločky, 10 g/l agar; [Perotto et al. 2014](#), [Ercole et al. 2015](#); viz Příloha I) s různými koncentracemi dusičnanů (1, 2, 10, 50 a 100 mg/l NaNO₃, dále jen dusičnanová řada a jednotlivé varianty dále jako N0, N1, N2, N10, N50 a N100). Do médií byly dále přidávány růstové regulátory, donory a zhášeče NO, inhibitor NR wolframan. Všechny experimenty zjišťující efekt NO₃⁻ na klíčivost jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4: Přehled experimentů a druhů, na kterých byly provedeny

Druh/ experiment	dusičnan ová řada	fytohormon	NH ₄ ⁺	osmoticky aktivní látky	Donory, zhášeče	Wo4	Symbiotic ký výsev
<i>A. morio</i>	Ano	-	-	-	-	-	-
<i>A. laxiflora</i>	Ano	-	-	-	-	-	-
<i>D. majalis</i>	Ano	-	-	-	PTIO, cPTIO, SNP	-	-
<i>H. robertianum</i>	Ano	-	-	-	-	-	-
<i>G. conopsea</i>	Ano	NAA, BAP, kinetin, GA ₃	Ano	NaCl, CaCl ₂	PTIO,cP TIO, SNP	Ano	Ano
<i>G. densiflora</i>	Ano	-	-	-	-	-	-
<i>G. odoratissima</i>	Ano	-	-	-	-	-	-
<i>G. rhelicanii</i>	Ano	-	-	-	-	-	-
<i>P. albida</i>	Ano	-	Ano	NaCl, CaCl ₂	-	-	-
<i>O. neglecta</i>	Ano	-	-	-	cPTIO	-	-

Zásobní roztoky dusíkatých a osmoticky aktivních látek byly připravovány jako roztoky 0.1 g/ml a na každou sérii byl použit nový zásobní roztok. V případě používání donorů a zhášečů NO byla vynechána varianta 50 mg/l NO₃⁻ a v případě pokusu s *Nigritella cf. rhelicanii* byla použita i varianta 2 mg/ml.

Složky média byly rozpouštěny postupně za stálého míchání v deionizované vodě (vodivost max y 0.01 μS). Médium bylo připravováno v objemu 1-2 l a následně rozděleno na varianty a byl přidán NaNO₃. Každá série média byla označena a na výsev na každé z variant byla použita média z minimálně 2 sérii. Médium bylo autoklávováno (Tuttnauer 2540 EK-N; 20 min, 121 °C, 144

kPa).

2.5 Výsev semen a kultivace

Výsev semen probíhal v sterilních podmínkách v laminárním flow-boxu (pokračování z kapitoly 2.3). Filtrem ucpaná jehla byla nahrazena novou širší jehlou (1,8 x 40 (15Gx1½“, Luer-Lock, Dispomedicor Rt, Hungary) a semena v suspenzi byla vystříkána na připravené kultivační médium v petriho miskách. Používány byly buď misky s průměrem 9 cm (v tomto případě bylo nalito průměrně 28 ml média na misku) nebo 6 cm (v tomto případě bylo nalito 10 ml média na misku). Semena na médiu byla kruhovými pohyby rozmístěna rovnoměrně na povrchu média. Petriho misky byly utěsněny parafilmem, označeny a umístěny buď do chladové komory (4°C) nebo přímo do kultivační místnosti s 20°C (viz tab. 5). Po 12 týdnech resp. 3 měsících byly výsevy z chladu a tmy přemístěny do kultivační místnosti s teplotou 20 °C přičemž byly vždy ponechány ve pro světlo nepropustných černých plastových krabicích (tab. 5).

Tab. 5 Přehled kultivačních dob

rody	4°C (Chladová komora)	20 (+-27) °C (Kultivační místnost S06)
<i>Gymnadenia</i>	3 měsíce	4 měsíce
<i>Pseudorchis</i>	3 měsíce	8 měsíců
<i>Ophrys</i> , <i>Anacamptis</i> , <i>Dactylorhiza</i> , <i>Himantoglossum</i>	-	2 měsíce

2.5.1 Asymbiotický výsev semen

Většina experimentů probíhala bez symbiotické houby v petriho misce s externím zdrojem cukru v médiu, mikro a makroprvky v podobě média MON s dusičnanovou řadou, které fungovaly jako náhrada mykorrhizního symbionta.

2.5.2 Symbiotický vysev

V případě symbiotického výsevu byla semena vysévána na modifikované médium OMA s NaNO_3 v koncentraci 0, 1, 10, 50 nebo 100 mg/l, na které byla přesně den po výsevu naočkována houba B1 (*Ceratobasidium sp.*) nebo houba Q404. Obě houby jsou izoláty dlouhodobě používané pro symbiotické kultivace různých druhů orchidejí. Kultury byly poskytnuty Hardy Orchid Society, Velká Británie. Naočkování proběhlo vložení 1 cm² velkého kousku média s kultivovanou houbou. Houby byly kultivovány v klimaboxu při 20°C na médiu OMA.

2.6 Hodnocení experimentu

Hodnocení experimentů (sčítávání semen a focení petriho misek) probíhalo vždy v rozmezí 3 dní ode dne hodnocení (součet obou sloupců tabulky 5). Kvůli objemu některých experimentů nebylo možné vždy hodnotit celý pokus najednou. Protokomy, které ještě neměly vytvořen znatelný prýt, byly sbírány na analýzu endogenních sacharidů a pro zjišťování obsahu NO.

2.6.1. Počítání semen a protokormů

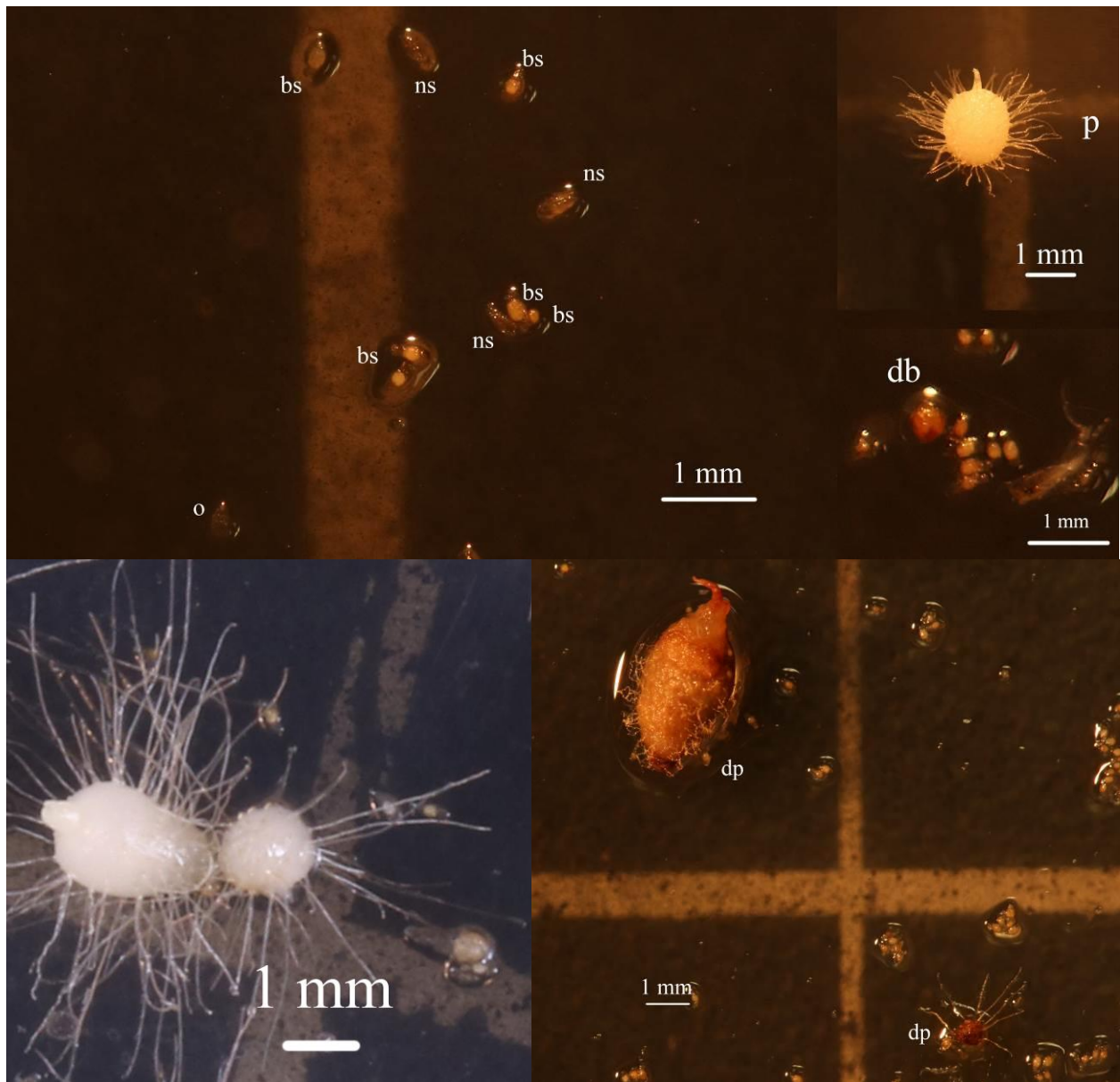
Semena byla pozorována stereomikroskopem (Krüss, MSZ 5400 Stereo Zoom Microscope, zvětšení 40×) a byla sečtena všechna semena na petriho miskách. Fotografie na zjišťování délky protokormů byly pořízeny DSLR (z anglického digital single-lens reflex camera, digitální jednooká zrcadlovka) Canon 760D s objektivem Canon EF 100 mm f/2,8 Macro USM případně DSLR Nikon D7000 s objektivem Micro Nikkor 55/2,8 MF. V ojedinělých případech, kdy bylo na misce příliš mnoho objektů, bylo sečteno $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ nebo jenom $\frac{1}{4}$ misky, ale to jenom v případě že bylo napočítáno víc než 100 objektů. Pozorované objekty byly zařazeny do kategorií (rozepsáno v tab. 6, jednotlivé kategorie obr. 3). Klíčivost byla počítána jako podíl kategorií „b“, „db“, „p“ a „dp“ ze všech kategorií kromě „o“ a „ns“. Útvary „ds“, „db“ a „dp“ byly jenom nahnědlé, tudíž pravděpodobně odumíraly, ale nebyly pravděpodobně ještě odumřelé. Jejich přítomnost vyjadřuje v této práci mortalita. Mortalita se počítala jako podíl zhnědnutých vyklíčených objektů (tj. dp a db) ke všem kategoriím objektů kromě „ns“ a „o“. Celková mortalita se počítala jako podíl všech zhnědnutých objektů (tj. dp, db a ds) ke všem kategoriím objektů kromě „ns“ a „o“. Podíl špatných semen (kategorie „ns“ a „o“) ke všem objektům se počítal jako kontrola kvality. Nejdelší průměr

protokormů byl změřen z fotografií programem ImageJ 1.50i, funkcí measure length (pixely byly pomocí vyfoceního měřítka převedeny na metrické jednotky).

Tab. 6: Kategorie pozorovaných objektů

Zkratka objektu	Typ objektu
p	protokorm s vlásky
b	protokorm bez vlásků dále označován jako “bobtnající embryo” (b) což byl útvar, který se už zjevně dělí a protrhnul osemení
dp	hnědnoucí protokorm
db	hnědnoucí protokorm bez vlásků
s	zralé, ale nevyklíčené semeno (u starších experimentů tato kategorie zahrnuje i kategorie bs a ds, u novějších rozlišuji i tyto dvě kategorie navíc, přičemž s je chápáno jako semeno již schopné vyklíčit ale nebobtnající
bs	bobtnající semeno
ds	hnědnoucí bobtnající semeno
o	osemení bez embrya
ns	nezralé semeno s nedostatečně vyvinutým embryem

Klíčivost byla počítána jako podíl kategorií „b“, „db“, „p“ a „dp“ ze všech kategorií kromě „o“ a „ns“. Útvary „ds“, „db“ a „dp“ byly jenom nahnědlé, tudíž pravděpodobně odumíraly, ale nebyly pravděpodobně ještě odumřelé. Jejich přítomnost vyjadřuje v této práci mortalita. Mortalita se počítala jako podíl zhnědnutých vyklíčených objektů (tj. dp a db) ke všem kategoriím objektů kromě „ns“ a „o“. Celková mortalita se počítala jako podíl všech zhnědnutých objektů (tj. dp, db a ds) ke všem kategoriím objektů kromě „ns“ a „o“. Podíl špatných semen (kategorie „ns“ a „o“) ke všem objektům se počítal jako kontrola kvality. Nejdelší průměr protokormů byl změřen z fotografií programem ImageJ 1.50i, funkcí measure length (pixely byly pomocí vyfoceního měřítka převedeny na metrické jednotky).



Obrázek 3: Kategorie pozorovaných objektů

2.7. Statistické hodnocení

Statistická analýza byla provedena programem R verze 3.2.4 (R Development Core Team 2016) Dataset vložený do programu obsahoval počty objektů v jednotlivých kategoriích a vypočítanou klíčivost, podíl špatných a mrtvých semen. Rozdíly mezi měřeními byly statisticky testovány pomocí ANOVA, následovanou Tukey–Kramerovým testem ([Kramer 1956](#)) pro data s normálním (gaussovým) rozdělením. Pro velikosti protokormů byla použita hierarchická ANOVA.

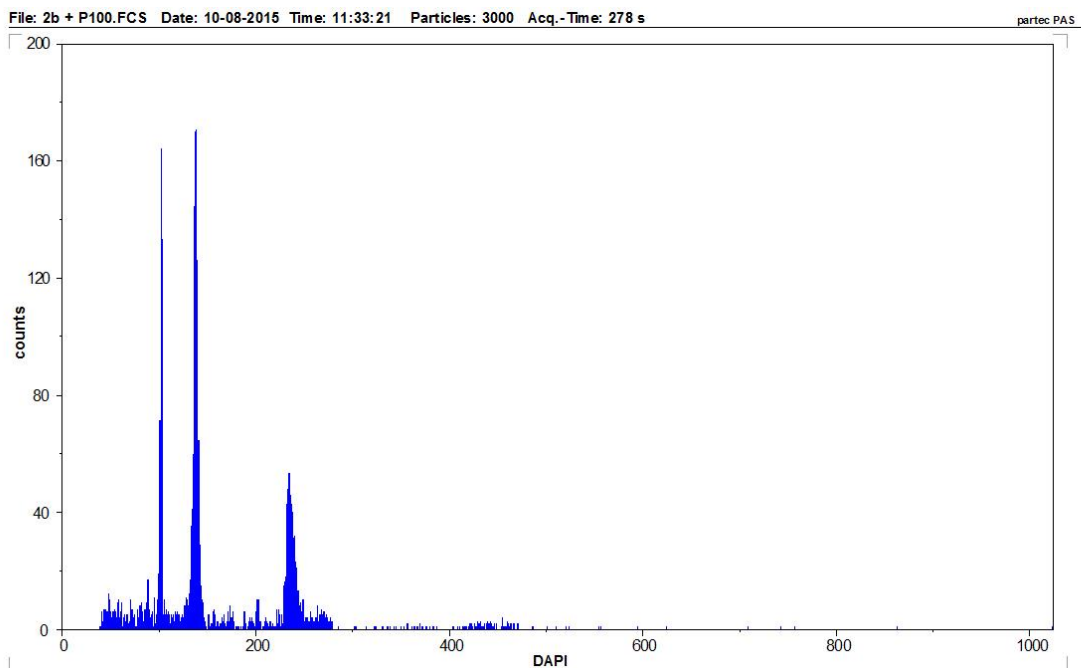
V případě že data neměla normální rozdělení, byla transformována funkcemi log, sqrt nebo sin, cos, tan, asin, acos, atan podle konkrétní povahy dat.

Dataset obsahoval pro kontrolu i kód použitého média a varianty sterilizace (použité stříkačky ze které byla semena vysévána na konkrétní misku), kde se stejným způsobem, jako bylo popsáno výše, statisticky hodnotil možný vliv efektu použité varianty média a varianty sterilizace.

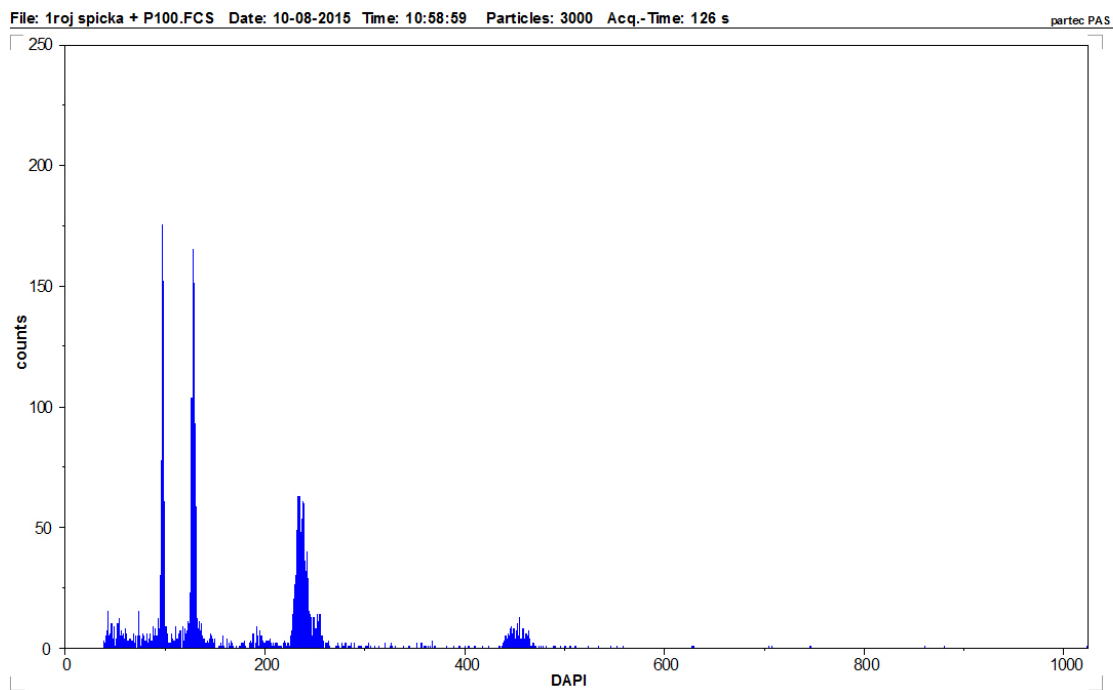
2.8 Cytometrie (FCM)

Odlišení těžce odlišitelných druhů *G. conopsea* a *G. densiflora* bylo potvrzeno DNA průtokovou cytometrií (FCM).

Špičky listů byly posekány žiletkou se standardem (výrazně menší kousek než vzorek) a v Petriho misce smíchány s Otto I pufrem ([Trávníček et al. 2010](#), [Doležel 2007](#), [Otto 1990](#)). Jako standard byl použit hrách *Pisum sativum* s „peakem“ na relativní fluorescenci kolem 100 ([Suda 2005](#), [Chumova 2015](#)). Suspenze byla pak filtrována přes nylonovou síťku s porozitou 42 μm , obarvena pomocí 4',6-diamidino-2-phenylindol - DAPI a po 5 minutách analyzována přístrojem Partec CyFlow cytometr (Partec GmbH., Münster, Germany) a následně analyzována programem Partec FloMax Software verze 2.4d. Výsledky měření jsou zobrazeny na obr 4. *G. conopsea* a na obr 5. *G. densiflora*. Tyto dva druhy se dají rozeznat podle vzájemného postavení „peaků“ (jejich relativní vzdálenosti) i podle postavení vůči „peaku“ hrachu. U *Gymnadenia conopsea* (obr. 4) je poměr mezi peaky (mezi jejich vzdálenostmi) menší než u *G. densiflora* (obr.5). Poměr mezi „peakem“ 2C a P/2C je u *G. conopsea* přibližně 1.6 zatímco u *G. densiflora* přibližně 1.75.



Obrázek 4: Relativní fluorescence jader *G. conopsea*, osa x: relativní fluorescence, osa y: počet jader, „peak“ 2C zde není vidět, interní standard *Pisum sativum* má „peak“ na relativní fluorescenci 102.34, následují „peaky“ 2C+P (138,01), 2C+3P (236,39) a 2C+7P



Obrázek 5: Relativní fluorescence jader *G. densiflora*, osa x relativní fluorescence, osa y: počet jader, „peak“ 2C zde není vidět, interní standard *Pisum sativum* má „peak“ na relativní fluorescenci 98,32 následují „peaky“ 2C+P (128,42), 2C+3P (236,98) a 2C+7P

2.9 Zjišťování obsahu jednotlivých forem N v rostlině

2.9.1 Aplikace donorů a zhášečů NO

Zjišťování obsahu NO probíhalo pomocí aplikace donorů SNP (Sodium nitroprusside; Sigma-Aldrich), SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine; Sigma-Aldrich) a zhášečů NO (PTIO, cPTIO; Sigma-Aldrich), které byly přidávány do kultivačních médií s dusičnanovou řadu bez varianty N50, která byla vynechána pro úsporu nákladů na aplikaci zhášečů NO. Dusičnanová řada v experimentech s donory a zhášeči byla tedy N0, N1, N10 a N 100. V tabulce 7. je přehled rozpouštědel pro jednotlivé donory a zhášeče a koncentrace, ve kterých byly použity.

Tab. 7. Přehled použitých koncentrací pro jednotlivé donory a zhášeče a jejich rozpouštědla.

donor/zhášeč	Rozpouštědlo	koncentrace v médiích
PTIO	Etanol	10 μ M, 100 μ M, 1mM
cPTIO	H ₂ O	10 μ M, 100 μ M, 1mM
SNP	Etanol	10 μ M, 100 μ M, 1mM

Zhášeče PTIO a cPTIO byly přidávány do média po autoklávování, když mělo médium teplotu asi 40°C filtrací (filtry 0,45 μ m) protože se teplem ničí, přičemž v prvním experimentu, kde bylo cPTIO použito a rozpouštěno bylo v etanolu, byla filtrace vynechána z důvodu vysokých ztrát roztoku ve filtru. Sice je SNAP považován za účinnější donor NO ([Floyszak-Wieczorek 2006](#)), rychleji se ale rozkládá i za laboratorní teploty, proto byl prozatím z mých experimentů vynechán a jako jediný donor byl použit SNP. SNP se při klávování v cukerném roztoku rozkládá ze 40 %, proto byl do média přidáván filtrací až po klávování, když mělo médium teplotu asi 40°C (filtry 0,45 μ m). Roztok SNP byl připraven bezprostředně před přidáním do média, aby se co nejméně vystavoval světu a docházelo co nejméně k fotodegradaci (doporučení výrobce [Sigma Aldrich 2016](#)).

2.9.2 Aplikace wolframanu

Wolframan sodný (Na₂WO₄; Sigma-Aldrich), byl přidáván do média ve formě roztoku (rozpuštěn v H₂O), před klávováním v podobě vodného roztoku a experimenty s ním měly 3 varianty (kontrolní varianta bez wolframátu, 50 mg/l a 100 mg/l).

2.9.3 Lokalizace NO

Protokormy byly podélně přeříznuty žiletkou na poloviny, inkubovány v roztoku 10 μ M detekční barvy DAR-4M-AM ve fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,2M) po dobu 45 minut, převedeny do pufru a následně pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus Provis AX70, excitací zeleným světlem (excitační filtr BP 510–550nm). Zásobní roztok barvy byl skladován ve tmě při -20°C.

2.9.4. Kvantifikace NO

2.9.4.1 Příprava extraktu z protokormů

Protokormy (varianty N0 a N100) o celkové čerstvé hmotnosti zhruba 50 mg byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a rozdrceny kulovým mlýnkem (10min, frekvence 30) v mikrozkuvkách se dvěma nerezovými kuličkami. Ke zmraženým vzorkům bylo přidáno 0,5 ml chlazeného (4°C) fosfátového pufru (pH 7,4, 0,2M), vzniklá směs byla vortexována a centrifugována 10 min v chlazené centrifuze (4°C, 13000 ref). Supernatant byl následně odpipetován a 10x zředěn, přičemž byl neustále držen v ledu. Zásobní roztok barvy DAR-4M-AM byl připravován stejným způsobem, jako v předchozí kapitole 2.10.3.

2.9.4.2 Měření na fluorometru

Na fluorometru byla následně pro kontrolu změřena fluorescence extraktu z *H. robertianum*, poté byla přidána barva DAR-4M-AM (Sigma-Aldrich) pro výslednou koncentraci v kyvetě (používány byly křemenné kyvety o min. měřitelném objemu 50 μ l) 1 μ M. Po 10 min měření byl přidán zhášecí NO PTIO (1,54 μ L roztoku 0,1mg/l). Po dalších 5 min byl přidán donor NO SNAP pro výslednou koncentraci v kyvetě 1 μ M. Koncentrace a složení zásobních roztoků jsou uvedeny v tab. 8. Další experiment měl za cíl ověřit, zda je odezva fluorescence barvy citlivá ke koncentraci NO. Nejprve byla změřena fluorescence fosfátového pufru (pH 7,4) s 1 μ M barvou. Po 10 s byl přidán donor NO SNAP pro výslednou koncentraci v kyvetě 0.05, 0.075 a 0.1 mM.

Následně jsme přistoupili k porovnání obsahu NO ve dvou variantách protokormů *D. majalis*, konkrétně N0 a N100. Na fluorometru byla nejprve pro kontrolu změřena fluorescence extraktu a v čase 10 s přidána barva pro výslednou koncentraci v kyvetě 0,1 mM. Měření byla

ukončena po 30 min.

Pro každou výslednou křivku byly odečteny tři blízké hodnoty fluorescence po delším čase měření (444,446 a 448 s v případě pokusu s přidáváním různé koncentrace SNAP; 1956, 1958 a 1960 s v případě pokusu s rostlinným materiálem) a zprůměrovány. Od získaných hodnot byla pro korekci pozadí odečtena hodnota průměru třech blízkých hodnot ze začátku měření, kde se již ustálil průběh křivky (pokus ze SNAP: $t=58,60$ a 62 s a pokus s rostlinným materiálem $t= 226,228$ a 230 s)

2.10 Analýza rozpustných sacharidů v protokormech

Protokormy byly ihned po otevření petriho misky vloženy do mikrozkušavek 2 x propíchlým víčkem, byla zjištěna jejich čerstvá hmotnost a pak byly okamžitě ponořeny do tekutého dusíku. Následně byly vzorky lyofylizovány v zařízení Lyovac 20 hodin, poté byla zjištěna jejich suchá hmotnost a do každé mikrozkušavky byl přidán 0,5 ml 80% metanolu. Vzorky byly inkubovány v termobločku (Grant QBT1) při 75°C po dobu 15 minut a pak byl metanol odpařen ve vakuové odparce Speedvac po dobu 3 hodin (program s vakuem pro alkohol V-AL). Dále byla přidána ultračistá voda (MiliQ) podle suché hmotnosti vzorku (podle tabulky 8), vzorky byly vloženy do ultrazvukové lázně (Bandelin RK31) na 15 minut a pak centrifugovány (Eppendorf centrifuge 5415 D) na 14000 rcf po dobu 10 minut.

Tab. 8 Přidávání MiliQ podle suché hmotnosti vzorku

hmotnost vzorku	<5mg	5 – 10mg	10 - 20mg	20 – 30 mg
přidaná MiliQ	0,3 ml	0,5	1	1,5

Z centrifugovaných vzorků byl odebrán supernatant a ten byl filtrován membránovým filtrem Millex Milipore ($0,45\ \mu\text{m}$) do nových mikrozkušavek. Vzorky byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s refraktometrickou detekcí (refraktometr Shodex RI-71; ChromJet; předkolonka naplněna IEX Pb form $8\ \mu\text{m}$, kolona $250 \times 8\ \text{mm}$ naplněna IEX Pb form $8\ \mu\text{m}$; Watrex, Praha, Česká Republika. Objem injektovaného vzorku byl $50\ \mu\text{l}$ a chromatogramy byly upravovány pomocí software Clarity 5.0.4.158.

2.11 Analýza obsahu škrobu v protokormech

Pelety, které zůstaly z přípravy vzorků na analýzu rozpustných sacharidů, jsem používal dál v tomto experimentu. K peletům byl přidán 1 ml MiliQ vody, vzorek byl zvortexován

dále uložen do ultrazvukové lázně na 15 minut a centrifugován 15 minut na 14000 rcf, stříkačkou byl odsát supernatant a tento postup byl zopakován 4x. Vzorky byly poté uloženy do mrazáku (-18°C). Po rozmražení bylo přidáno 0,5ml 0,1M acetátového pufru (pH 4.5) do každé mikrozkušavky, vzorky byly poté autoklávovány programem 5-slow 121, (autokláv Tuttnauer 2540EK-N; 20 min, 121 °C, 144 kPa). Po vychladnutí vzorků v lednici na 4°C bylo přidáno 100 µl enzymatického roztoku (30U α-amylázy; Sigma 35U/mg a 60U amyloglukázy; Sigma 70U/mg) a tato směs byla inkubována při 40°C 14 hodin. Enzymy byly následně inaktivovány teplotou 95°C po dobu 5 minut a vzorky pak odpařeny na vakuové odparce SpeedVac do sucha (program V-AQ pro vzorky s vodou ve vakuu) nejprve 2h při 60°C a pak 1h na 45°C. Obsah mikrozkušavky byl pak nesuspendován v odpovídajícím množství MiliQ vody (podle tabulky 9.) mikrozkušavky vloženy do ultrazvukové lázně (15 minut) a centrifugovány (10 minut, stejné přístroje) a supernatant byl přefiltrován do nové mikrozkušavky. Obsah glukózy vzniklý štěpením škrobu byl měřen stejně jako v případě rozpustných sacharidů.,

Tab. 9 Přidávání MiliQ podle suché hmotnosti vzorku

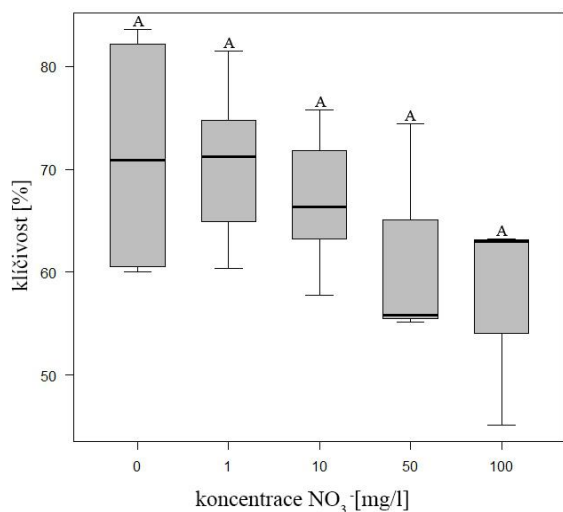
hmotnost vzorku	<5mg	5 – 10mg	10 - 20mg	20 – 30 mg
přidaná MiliQ škroby	0,3	0,3	0,5	1

3. Výsledky

Celkově bylo ve všech experimentech v této práci napočítáno dohromady 528176 objektů v 37 výsevových pokusech.

3.1 Vliv NO_3^- na klíčení a růst protokormů některých druhů orchidejí

3.1.1 *Anacamptis laxiflora*

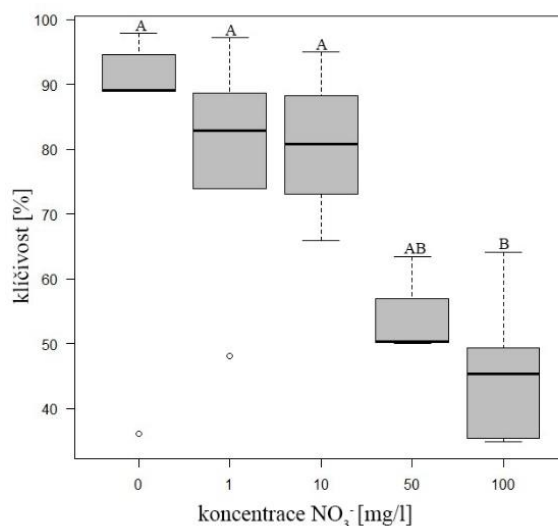


Obrázek 6.: Vliv NO_3^- na klíčivost semen *A. laxiflora*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky nelišící se varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA).

S počtem opakování $n = 4 - 5$ ($\text{N0-0 mg NO}_3^-/\text{l}$: 4, $\text{N1-10 mg NO}_3^-/\text{l}$: 5, $\text{N10-50 mg NO}_3^-/\text{l}$: 4, $\text{N100-100 mg NO}_3^-/\text{l}$: 5) na variantu z celkového počtu 23 nekontaminovaných misek bylo napočteno 6466 objektů s průměrem 281 ± 738 objektů na misku. Klíčivost semen nebyla sice průkazně ovlivněna NO_3^- ($F_{[4,17]}=1,538$ $\alpha=0,236$; obr. 6), ale byl zde jasný trend poklesu klíčivosti s vyššími koncentracemi NO_3^- . Mortalita protokormů „dp“ a bobtnajících embryí „db“ se mezi variantami nelišila ($\chi^2_{(4)} = 4.0533$, $p = 0.3988$), a ani nevykazovala žádný trend.

3.1.2 *Anacamptis morio*

S počtem opakování $n=3-6$ na variantu (N0-5, N1-6, N10-4, N50-3, N100-6) a celkově 24 nekontaminovaných misek bylo napočítaných 4702 objektů. Průměrný počet objektů na misku byl 196 ± 156 . Inhibiční efekt nitrátů na klíčivost *Anacamptis morio* byl průkazný ($F_{[4,19]}=5.264$ $\alpha=0,00502$) s velkým poklesem klíčivosti na dvou nejvyšších koncentracích NO_3^- (obr. 7). Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($\chi^2_{(4)} = 5.5156$, $p = 0.2384$) bez znatelného trendu.



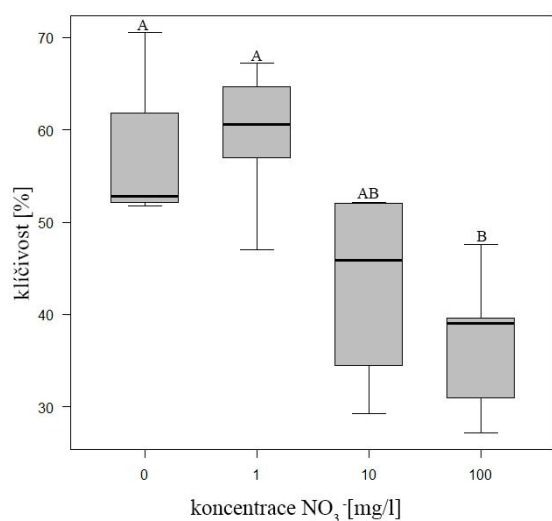
Obrázek 7: Vliv NO_3^- na klíčivost semen *A. morio*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test)

3.1.3 *Dactylorhiza majalis*

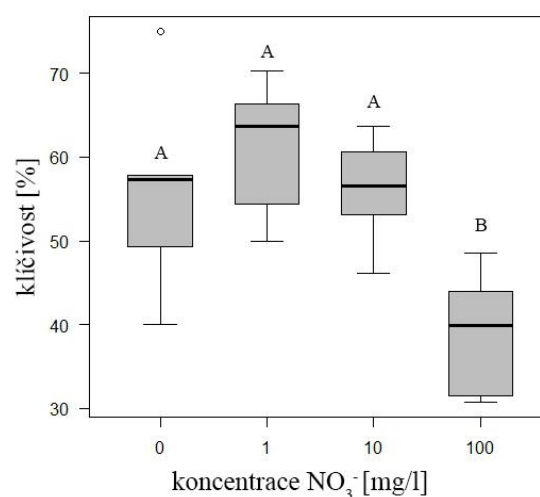
S počtem opakování $n= 3-5$ (N0:4, N1:5, N10:4, N100:5) misek na variantu a celkově 18 nekontaminovaných misek bylo napočítaných 1874 objektů. Průměrný počet objektů na misku byl 104 ± 91 . Inhibiční efekt NO_3^- na klíčení semen *Dactylorhiza majalis* byl průkazný ($F_{[3,14]}=6.93$ $\alpha=0,00432$; obr. 8a). Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($F_{[3,14]}=0,451$, $\alpha=0,721$) a všechny mrtvé objekty ($F_{[3,14]}=1,103$, $\alpha=0,381$) byly v rámci variant dusičnanové řady rozděleny náhodně.

Celý tento pokus byl opakován ještě jednou jako kontrola pokusu s cPTIO. Zde bylo 3811 objektů s počtem opakování $n = 4-6$ misek (N0:8, N1:7, N10:6, N100:5) na variantu a s celkovým počtem 22 nekontaminovaných misek a s průměrem 141 ± 402 objektů na misku. Výsledky byly velice podobné, inhibiční efekt nitrátů byl potvrzen se stejným snížením klíčivosti na variantě N0, nejvyšší klíčivosti na variantě N1 a následným snižováním klíčivosti, přičemž na N100 byla klíčivost výrazně nižší ($F_{[3,17]}=6,347$, $\alpha=0,00439$, obr. 8b). Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($F_{[3,17]}=1,76$, $\alpha=0,193$), stejně tak jako mortalita všech mrtvých objektů ($F_{[3,17]}=2,016$, $\alpha=0,15$), a obojí bez výrazného trendu.

a



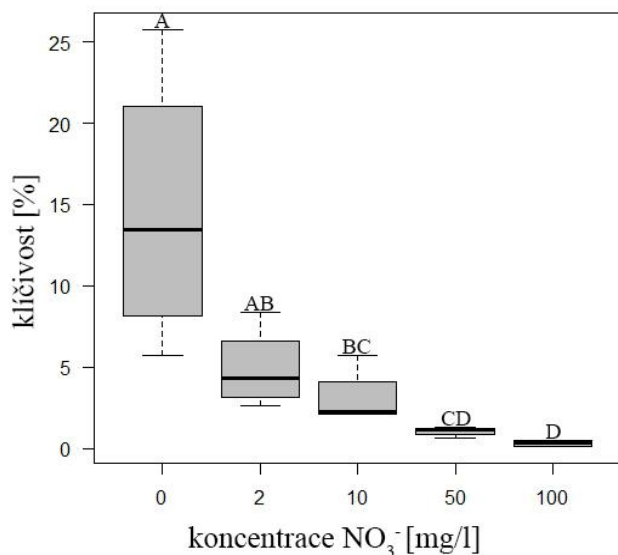
b



Obrázek 8: Vliv NO₃⁻ na klíčivost semen *D. majalis*. a. první pokus, b. opakování, Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.1.4 rod *Gymnadenia*

3.1.4.1 *Gymnadenia conopsea* agg.

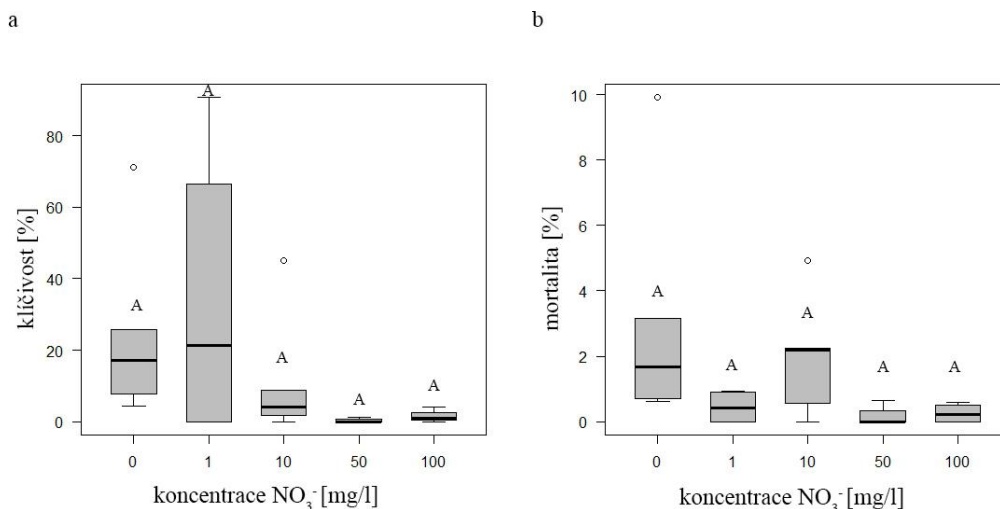


Obrázek 9: Vliv NO_3^- na klíčivost *G. conopsea*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

Nebyly zde pozorovány signifikantní rozdíly mezi variantami dusičnanové řady ($\chi^2_{(4)} = 9.2561$, $p = 0.05501$; obr. 10a), byl zde ale znatelný trend potvrzující inibiční efekt nitrátů. Na koncentracích 50 a 100 mg/l NO_3^- byla klíčivost téměř nulová. Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami nelišila ($F_{[4,18]} = 3,323$ $\alpha=0.229$; data transformována funkcí sqrt, obr 10b).

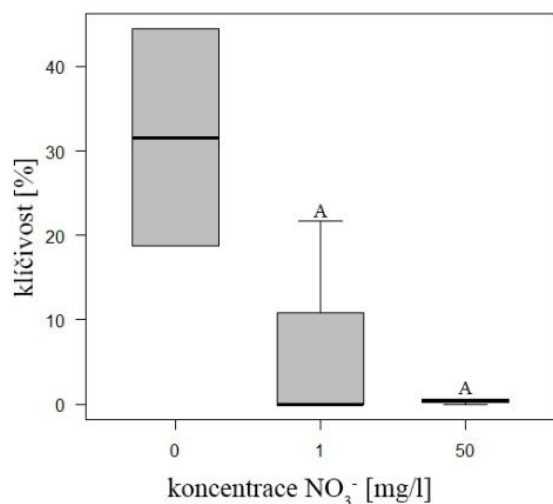
G. conopsea agg. bez známé ploidie byla testována na dusičnanové řadě s s počtem opakování $n=(2)$ 3-4 misek na variantu, s celkovým počtem 21637 napočítaných objektů na 17ti miskách. Průměrně bylo na misce 1272 ± 772 objektů. Rozdíly klíčivosti semen mezi variantami dusičnanové řady byly průkazné ($F_{[4,12]}=20.31$, $\alpha= 2,83 \times 10^{-5}$, log transformace, Obr. 9). Mortalita (objekty „p“ a „b“) klesala se zvyšujícím se obsahem N v médiu ($F_{[1,15]}=9.106$, $\alpha=0,00866$). Inhibiční efekt nitrátů v tomto experimentu byl druhý nejsilnější pozorovaný po *Pseudorchis albida*.

Při opakování pokusu bylo napočítáno 5437 objektů na $n=4-6$ miskách (celkem 24



Obrázek 10: Vliv dusičnanů na a. klíčivost a b. mortalitu „p“ a „b“ u *G. conopsea*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti (mortality), stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

Druhé opakování mělo kvůli vysoké kontaminovanosti jenom 1325 objektů (na 9 miskách) s $n=2-4$ objektů na misku, s průměrem 147 ± 82 objektů na misku. Rozdíly mezi variantami byly



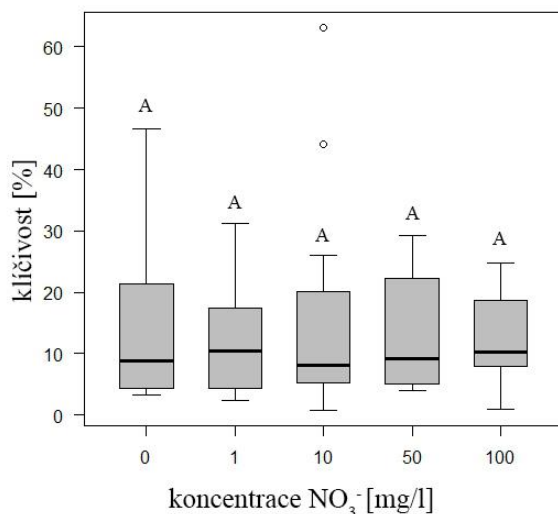
Obrázek 11: Vliv dusičnanů na klíčivost „p“ a „b“ u *G. conopsea*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty, varianta N50 se nehodnotila protože měla jen 2 opakování ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

signifikantní, a potvrdily inhibiční efekt nitrátů na klíčení *Gymnadenia conopsea* ($F_{[1,5]}=0.623$, $\alpha=0,0466$; data transformována funkcí sqrt; obr. 11), u kontroly však byly vysoké kontaminace kvůli infekci roztočů, proto v ní chybí varianta N100 a varianta N0 měla jen 2 opakování. Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami nelišila ($F_{[2,6]}=0.155$, $\alpha=0,86$).

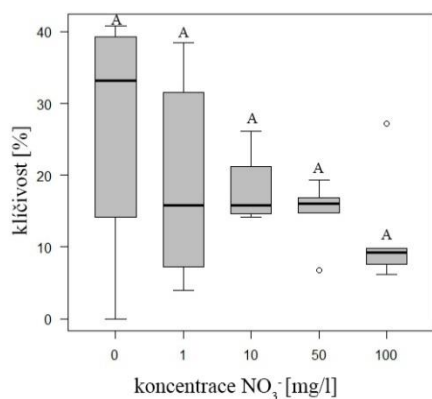
Ve třetím opakování tohoto pokusu bylo napočítáno 16659 objektů na $n=11-17$ miskách (64 celkově) na variantu s průměrem 260 ± 455 objektů na misku. Tento experiment vykazoval odlišné výsledky od předchozích. Klíčivost se zde nelišila mezi variantami dusičnanové řady

($F_{[4,59]}=0.302$, $\alpha= 0.875$, log transformace; obr. 12) a byla bez znatelného trendu, což se neshoduje s předešlými zjištěními. Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila

($F_{[4,59]}=0.908$, $\alpha= 0.466$) stejně tak jako mortalita všech objektů ($F_{[4,59]}= 2.257$, $\alpha= 0.0737$);).



Obrázek 12: Vliv NO₃⁻ na klíčivost *G. conopsea*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivostí, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).



Obrázek 13: Vliv dusičnanů na klíčivost semen *G. conopsea*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivostí, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

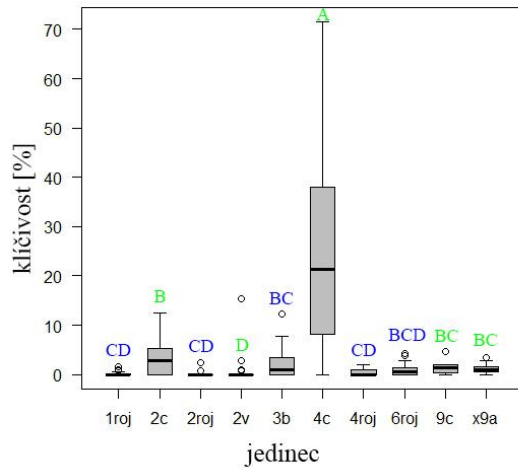
Poslední, páté opakování pokusu mělo dohromady 7189 objektů na 35 miskách s počtem opakování $n=5-6$ na variantu a průměrem 205 ± 186 objektů na misku. Klíčivosti se mezi variantami dusičnanové řady v tomto případě statisticky nelišily, ale vykazovali klesající trend se stoupající koncentrací NO₃⁻ v médiu ($\chi^2_{(4)} = 5.0934$, $p = 0.2778$; obr. 13). Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($\chi^2_{(4)} = 7.6926$, $p = 0.1035$), stejně tak jako mortalita všech objektů ($\chi^2_{(4)} = 5.2927$, $p = 0.2586$).

3.1.4.2 *Gymnadenia conopsea* (tetraploid) a *Gymnadenia densiflora* (tetraploid)

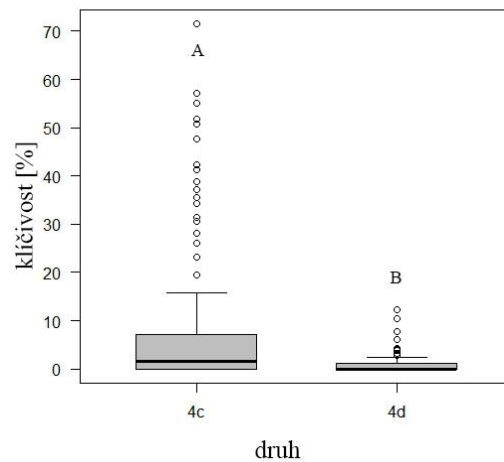
Vzhledem ke komplikované taxonomii komplexu *Gymnadenia conopsea* agg. byly porovnávány odezvy semen jednak všech jedinců cytometricky určených jako *G. densiflora* a *G. conopsea* zvlášť, ale také odezvy jednotlivých rostlin.

Klíčivosti jedinců tetraploidní *G. densiflora* a *G. conopsea* se mezi sebou lišily, rostlina „4c“ měla výrazně nejlepší klíčivosti (*G. conopsea*), a lišila se od všech ($F_{[9,236]} = 23.35$, $p = <2 \times 10^{-16}$; log transformace; obr 14a). Celkově jedinci *G. conopsea* klíčily lépe než *G. densiflora* ($F_{[9,244]} = 17.57$, $p = 3,88 \times 10^{-5}$; transformace obrácenou hodnotou; obr 15b). Výše rozepsané dva výsledky zahrnují klíčivosti na všech variantách dusičnanové řady, podobné výsledky byly však dosaženy i za vyhodnocování klíčivosti jen z varianty N0.

a)

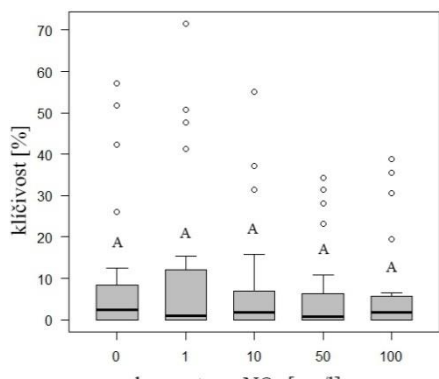


b)



Obrázek 14: Klíčivost a. všech jedinců tetraploidní *G. conopsea* (zelené) a tetraploidní *G. densiflora* (modré) a b. porovnání všech rostlin určených jako tetraploidní *G. conopsea* (4c) a tetraploidních *G. densiflora* (4d). Boxploty znázorňují mediány klíčivosti, rozdílná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.1.4.2.1 *Gymnadenia conopsea* (tetraploid)

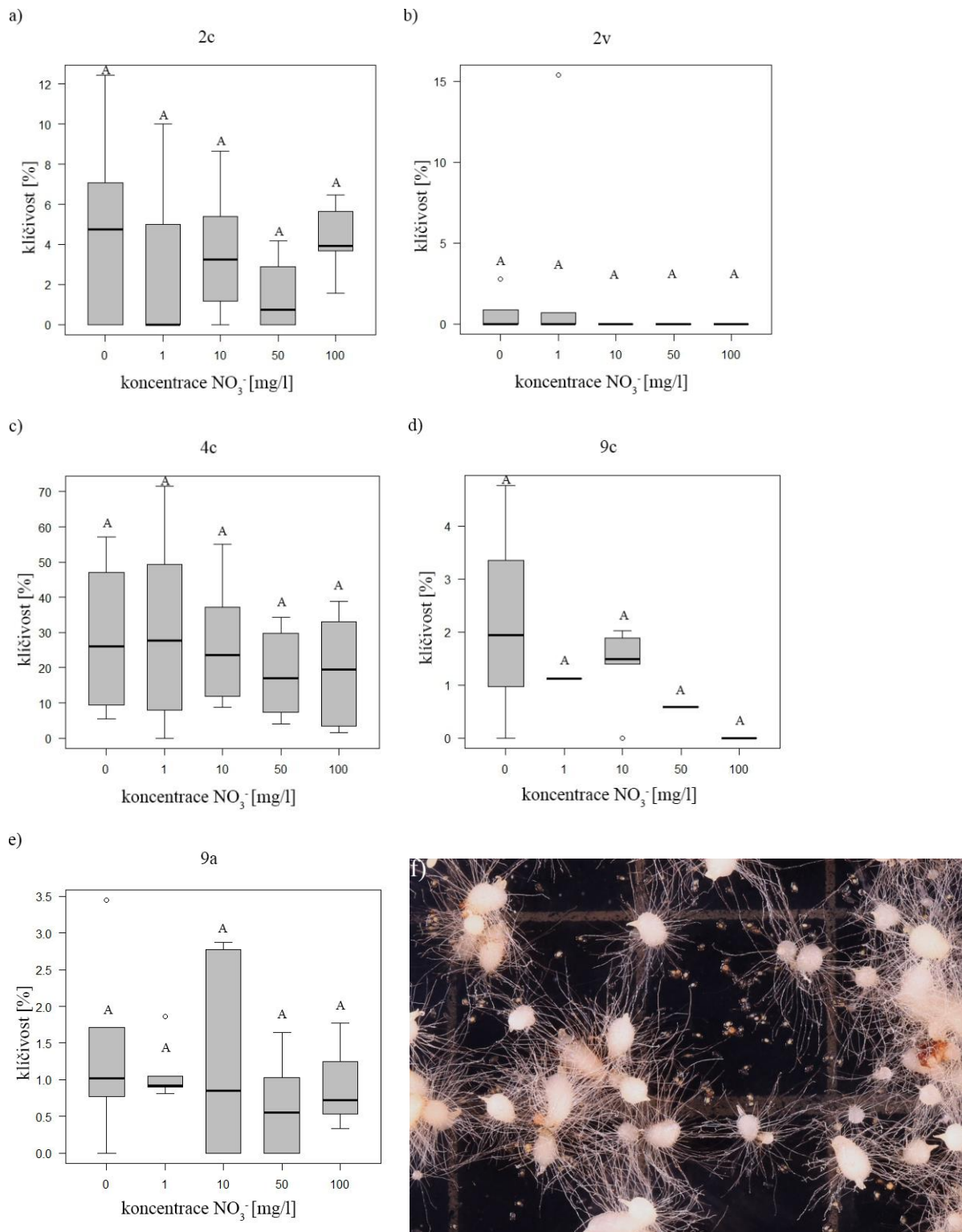


Obrázek 15: Klíčivost *G. conopsea* na dusičnanové řadě. Boxploty znázorňují mediány klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

V tomto pokusu bylo napočteno 24404 objektů a průměrem na miskou $192,157 \pm 277$ objektů na 127 miskách s počtem opakování $n = 11-36$ na jedince (x9a:25, 4c:36, 2v:27, 2c:27, 9c: 11). Cytometrická analýza označila 5 rostlin za tetraploidní *Gymnadenia conopsea*. Klíčivosti všech těchto jedinců se mezi variantami dusičnanové řady nelišily ($F_{[1,122]} = 0.273$, $\alpha = 0,895$; data transformována funkcí sqrt; obr. 15) ale vykazovali mírný pokles klíčivosti se stoupající koncentrací NO_3^- v médiu. Mortalita „dp“ a „db“ se v rámci variant dusičnanové řady nelišila ($F_{[1,122]} =$

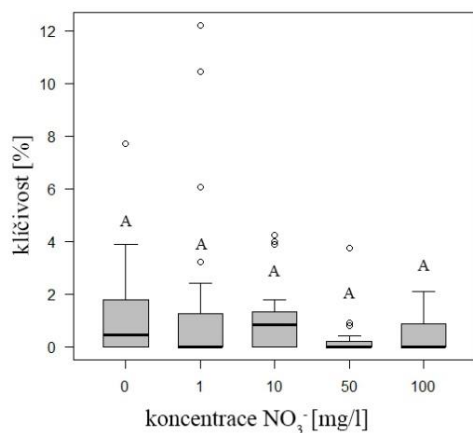
0.567 , $\alpha = 0,687$; data transformována funkcí sqrt) stejně tak jako mortalita všech objektů ($\chi^2_{(4)} = 1.8271$, $p = 0.7675$) bez znatelného trendu.

Klíčivost ani jednoho jedince se mezi variantami dusičnanové řady nelišila signifikantně a nepotvrdila tak inhibiční efekt NO_3^- na klíčení semen. Kromě rostliny 9c nebyl znatelný ani trend potvrzující inhibiční efekt NO_3^- na klíčení semen. U této rostliny ale nebylo možné jako u jediné provést statistické hodnocení kvůli malému počtu opakování (Obr. 16a-e). Mortalita „dp“ a „db“ stejně tak jako mortalita všech objektů se mezi variantami dusičnanové řady ani u jediné testované rostliny nelišila ani nevykazovala trend. Obr. 16f zachycuje protokormy rostliny 4c po 7 měsících kultivace.



Obrázek 16: Klíčivost tetraploidní *G. conopsea* na dusičnanové řadě, jedinci a. 2c, b. 2v, c. 4c, d.9c, e. 9a a f. ukázka protokormů rostliny 4c. Boxploty znázorňují mediány klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

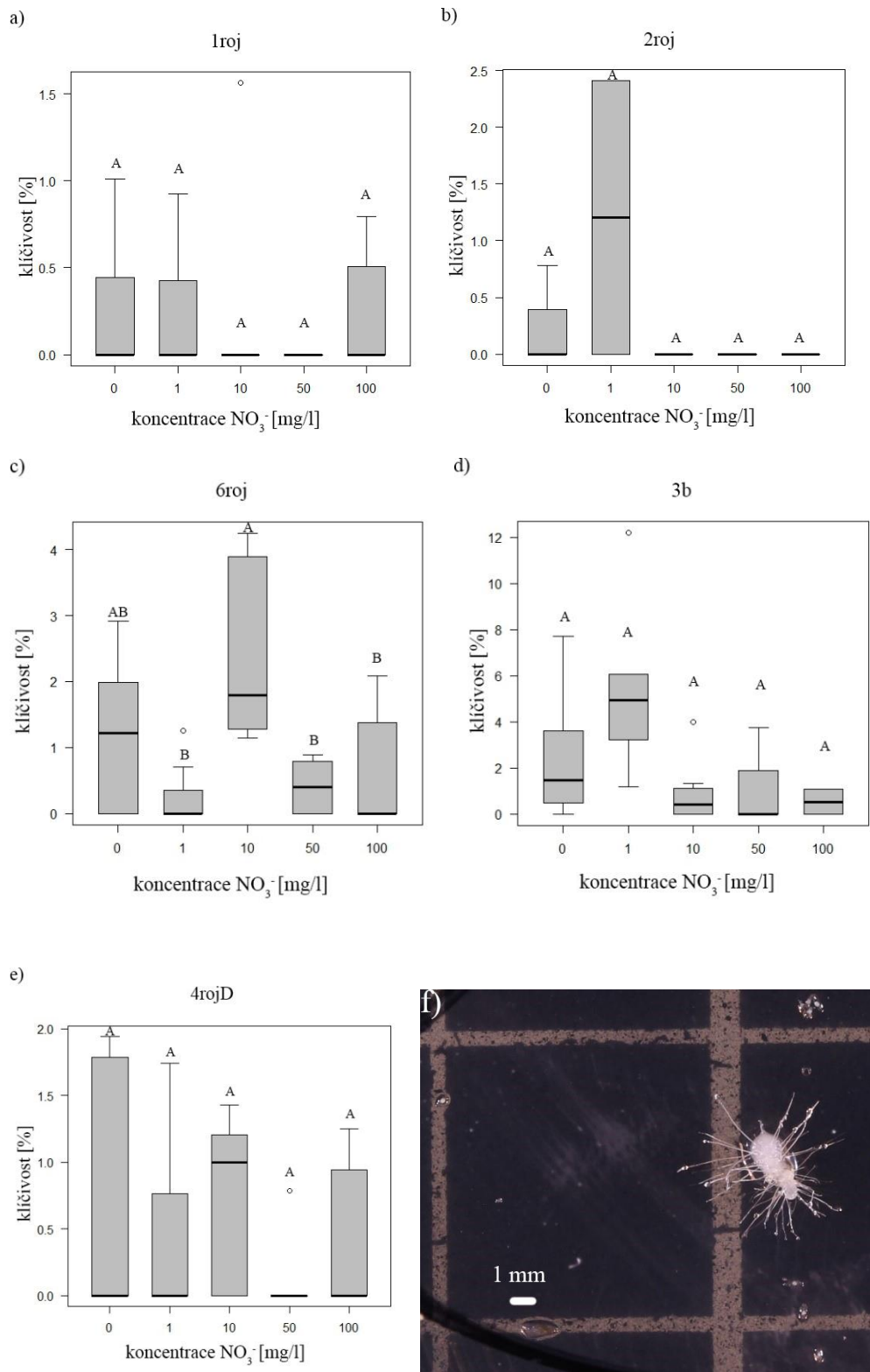
3.1.4.2.2 *Gymnadenia densiflora* (tetraploid)



Obrázek 17: Klíčivost *G. densiflora* na dusičnanové řadě, boploty znázorňují mediány klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

V tomto pokusu bylo napočteno 22663 objektů s průměrem 190 ± 333 objektů na misku s počtem opakování $n = 9-28$ (1roj: 28, 4rojD:28, 2roj:9, 6roj:22, 3b:27) dohromady na 119 miskách. Cytometrická analýza označila 5 rostlin za tetraploidní *G. densiflora*. Klíčivosti všech těchto jedinců se mezi variantami dusičnanové řady nelišily ($\chi^2_{(4)} = 7.7346$, $p = 0.1018$) jen s velmi mírným trendem snižováním klíčivosti (Obr. 17) se zvyšujícím se obsahem NO_3^- v médiu. Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($\chi^2_{(4)} = 6.3285$, $p = 0.1759$) stejně tak jako mortalita všech objektů ($\chi^2_{(4)} = 2.9561$, $p = 0.5652$), obojí bez znatelného trendu.

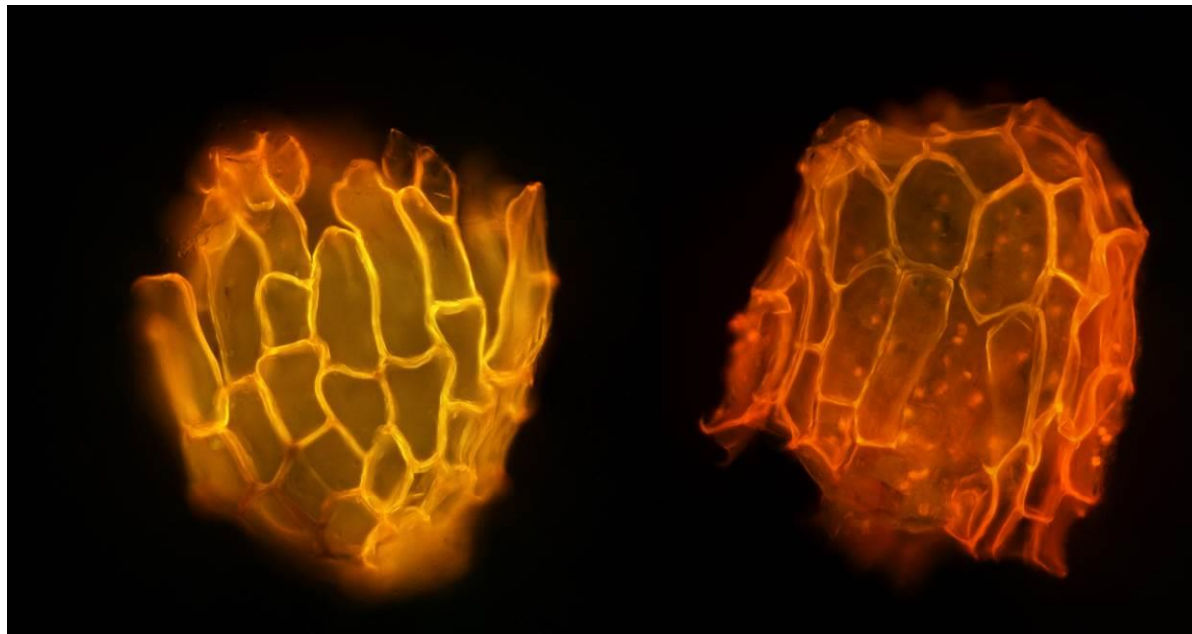
Jenom jeden jedinec tetraploidní *G. densiflora* měl průkazně rozdílné klíčivosti v rámci variant dusičnanové řady (6roj; $F_{[4,23]} = 4.583$, $\alpha = 0,00721$, Obr. 18c.) ale v žádném případě se nepotvrdil inhibiční efekt nitrátů (Obr. 18a,b,c,d,e). Mortalita „dp“ a „db“ stejně tak jako mortalita všech objektů se mezi variantami dusičnanové řady ani u jediné testované rostliny nelišila ani nevykazovala trend. Ukázkový protokorm rostliny 1roj je na obr. 18f.



Obrázek 18: Klíčivost tetraploidní *G. densiflora* na dusičnanové řadě. Jedinci a. roj1, b. roj2, c. roj6, d. 3b, e. 4rojD a f. protokorm rostliny 1roj. Boxploty znázorňují mediány klíčivostí, stejná písmena znázorňují statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.1.4.2 *Gymnadenia odoratissima*

Ani po 3 měsících inkubace v chladu a dalších 4 měsících v teple nevyklíčilo na žádné variantě ani jedno semeno, i když semena se při výsevu jevila jako životaschopná (obr. 19)

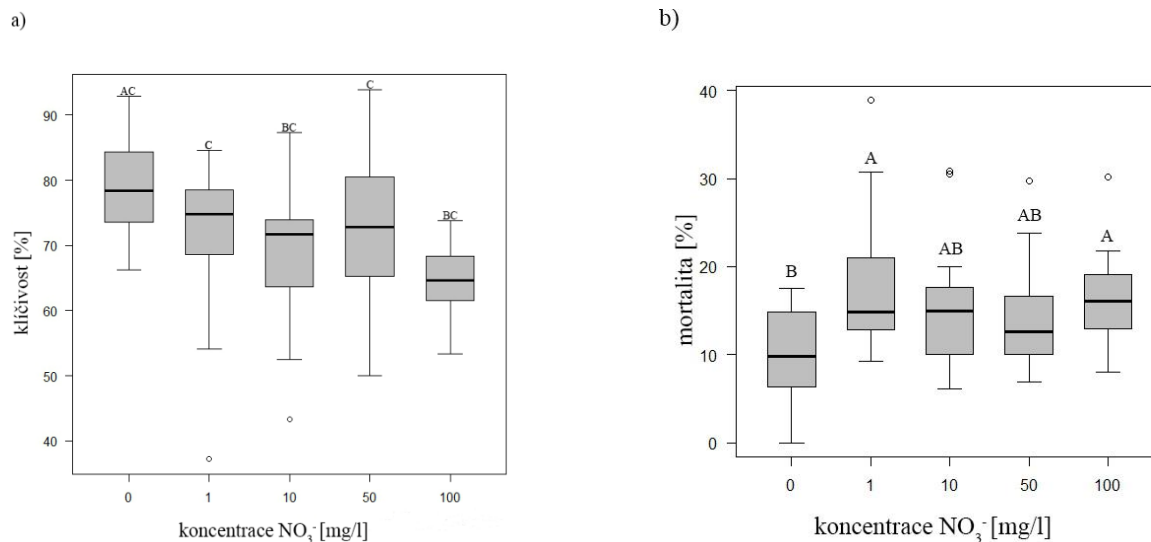


Obrázek 19: Semena *Gymnadenia odoratissima*, fluorescence indukovaná modrým světlem, barveno propidiumjodidem. Semeno nalevo je pravděpodobně živé, propidiumjodid se nedostal k embryu zatímco semeno napravo má jádra buněk obarvena propidiumjodidem což naznačuje, že je mrtvé.

3.1.5 *Himantoglossum robertianum*

3.1.5.1 Klíčivost semen

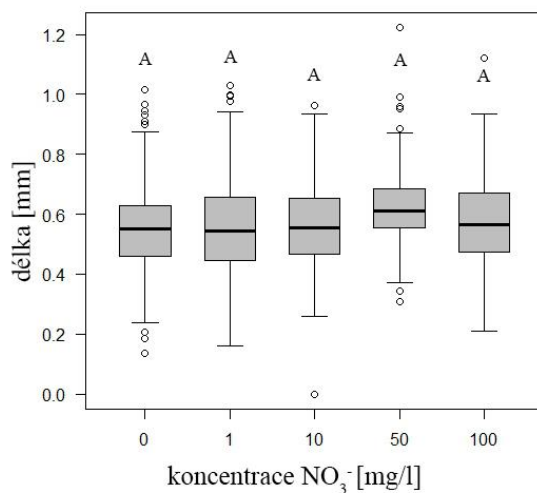
Tento pokus měl $n = 3-5$ opakování na variantu, a celkově 21 misek. Z napočítaných 11804 objektů v celém pokusu byly relativně vysoké klíčivosti ve všech variantách. Průměrně na jednu misku bylo $142,3 \pm 389$ objektů. Inhibiční efekt NO_3^- na klíčivost by potvrzen i u tohoto druhů ($\chi^2_{(4)} = 20,835$, $p = 0,0003415$; obr. 20a). Mortalita všech objektů se na různých variantách dusičnanové řady signifikantně lišila ($F_{[4,75]}=3,805$, $\alpha=0,00717$, obr. 20b) a nejnižší mortalita byla na variantě bez přidaných dusičnanů. Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami nelišila ($F_{[4,75]}=1,243$, $\alpha=0,3$; atan transformace).



Obrázek 20: Vliv NO_3^- na a. klíčivost, b. mortalitu všech objektů *H. robertianum*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti (mortalit), odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test a Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

3.1.5.2 Růst protokormů

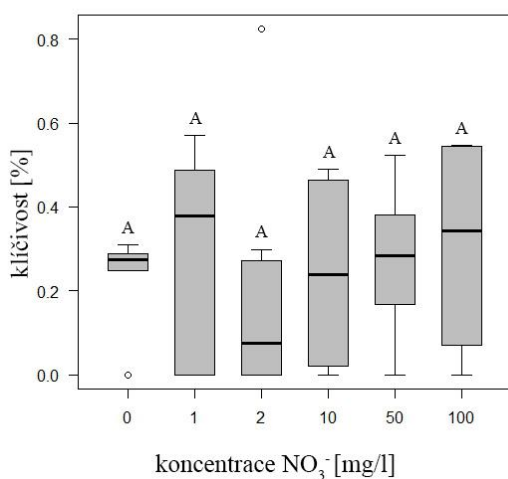
Velikost protokormů nebyla signifikantně rozdílná v rámci variant s různou koncentrací NO_3^- /l v médiu ($F_{[4,15]}=2,441$, $\alpha=0,0921$; cos transformace; obr. 21). Největší prorokorm byl nalezen na N50 (1,22 mm), průměrná délka protokormu byla 0,563 mm.



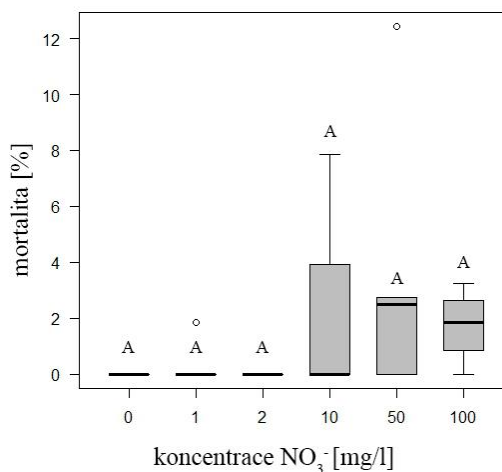
Obrázek 21: Vliv NO_3^- na velikost protokormů u *H. robertianum*. Boxploty znázorňují mediány hodnot délek, stejná písmena značí statisticky stejné varianty hierarchická ANOVA ($\alpha = 0,05$; TukeyC test)

3.1.6 *Nigritella rhelicanii*

V celém pokusu bylo napočítáno 39813 objektů, s průměrem na misku činícím 895 ± 1660 objektů na misku. Na 31 miskách bylo $n = 4-7$ misek na variantu. Semena *Nigritella rhelicanii* dosahovala velmi nízkých klíčivostí na všech variantách dusičnanové řady. Klíčivost nitráty nebyla ovlivněna ($F_{[1,29]}=0,295$ $\alpha=0,591$; obr. 22), ale mortalita „dp“ a „db“ byla pozorována až na vyšších koncentracích NO_3^- v médiu (N10, N50 a N100; $\chi^2_{(5)} = 11,759$, $p = 0,03824$; Obr. 23).



Obrázek 22: Vliv NO_3^- na klíčivost *N. rhelicanii*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

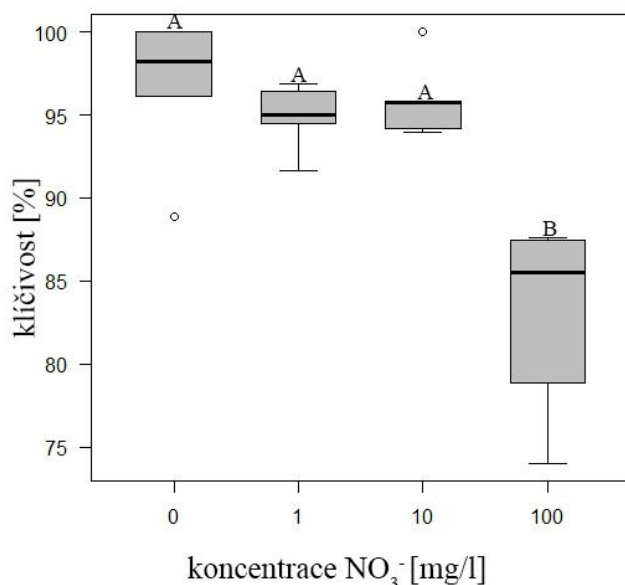


Obrázek 23: Vliv NO_3^- na klíčivost *N. rhelicanii*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.1.7 *Ophrys neglecta*

3.1.7.1 klíčivost semen

V celém experimentu bylo napočítáno 3538 objektů s $n = 4-6$ misek na variantu s průměrem 168 ± 141 objektů na misku. Varianta s nejvyšší koncentrací NO_3^- v médiu měla s vysokou

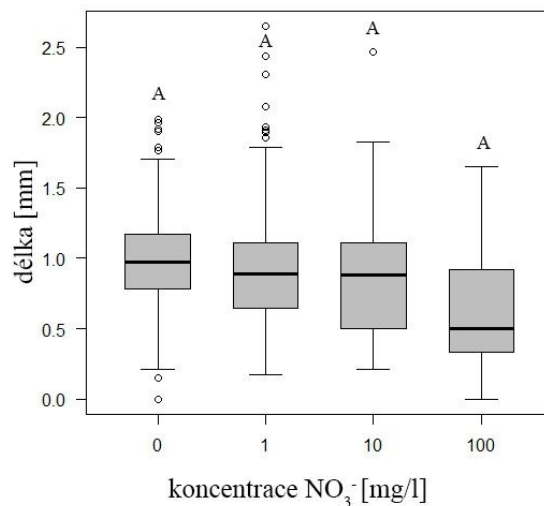


Obrázek 24: Vliv NO_3^- na klíčivost *O. neglecta* po 49 dnech od výsevu. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

mírou signifikance nižší klíčivost ($F_{[3,17]}=12,26$ $\alpha=0,000163$). Klíčivosti na nižších koncentracích NO_3^- (N,N1 a N10) se mezi sebou statisticky nelišily, ale i zde došlo k mírnému snížení klíčivosti (obr.24). Mortalita „dp“ a db ($\chi^2_{(3)} = 4.2192$, $p = 0.2388$) se mezi variantami dusičnanové řady nelišila. Mortalita všech objektů vykazovala viditelný mírný nárůst se zvyšující se koncentrací NO_3^- , nebyla ale průkazná ($F_{[3,17]}=0,875$, $\alpha=0,473$). U tohoto druhu výrazně převažovaly útvary „b“ nad „p“ bez ohledu na variantu.

3.1.7.2 Růst protokormů

Rozdíly velikosti protokormů *Ophrys neglecta* byly mezi variantami dusičnanové řady téměř signifikantní ($F_{[3,15]}=3.22$, $\alpha=0.0529$) se stejným trendem jako klíčivost tohoto druhu (obr. 25). Největší protokorm měl průměr 2,64 mm a průměrně protokormy dosahovaly průměru 0,87mm.

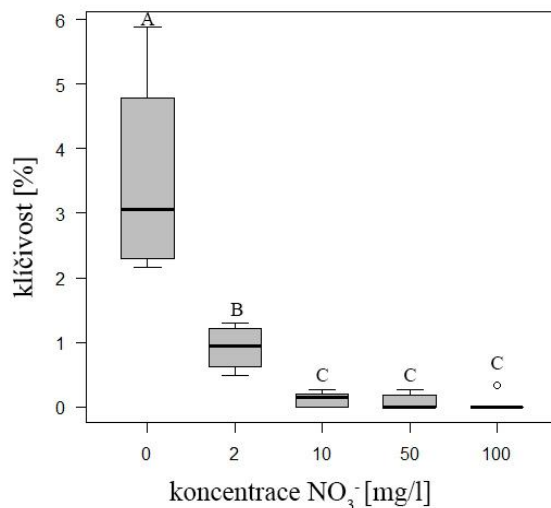


Obrázek 25: Vliv NO₃⁻ na velikost protokormů u *O. neglecta*. Boxploty znázorňují mediány hodnot délek, stejná písmena značí statisticky stejné varianty, hierarchická ANOVA $\alpha = 0,05$; TukeyC test).

3.1.8 *Pseudorchis albida*

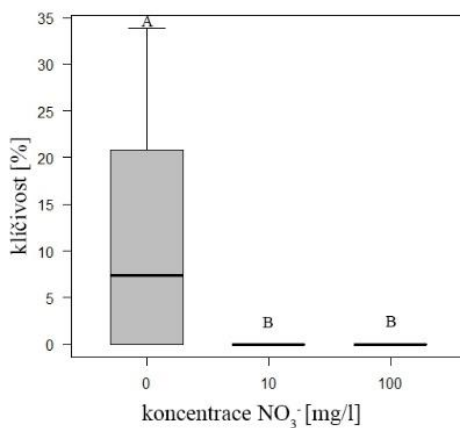
3.1.8.1 Klíčivost semen

V tomto pokusu bylo napočítáno 20392 objektů na 36 miskách, $n=4-12$ s průměrem 566 ± 405 objektů na misku. Inhibiční efekt NO₃⁻ byl u tohoto druhu nejsilnější, ze všech testovaných druhů, s vzrůstající koncentrací NO₃⁻ v médiu klíčivost prudce klesala ($F_{[4,31]}=44,51$ $\alpha=2,02 \times 10^{-12}$, sqrt transformace; obr. 26).



Obrázek 26: Klíčivost *P.albida* na dusičnanové řadě. Boxploty znázorňují mediány klíčivostí, statisticky odlišné varianty jsou označeny odlišným písmenem ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

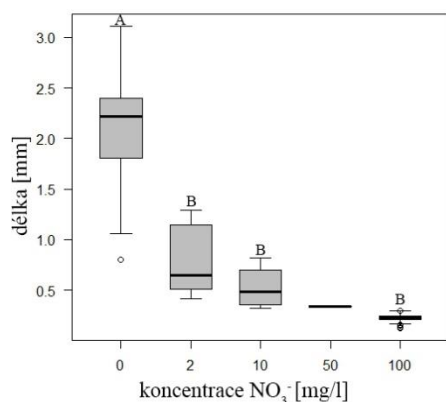
Pokus byl celý opakován, v tomto případě bylo napočítáno 2143 objektů na 24 miskách a n=4-12 opakováními na variantu s průměrem 89±85 objektů na misku. Mezi variantami dusičnanové řady byly rozdíly signifikantní ($\chi^2 (2) = 9.1052$, $p = 0.010$; obr.27) a na jiné variantě jako N0 v tomto případě nebyla klíčivost zaznamenána.



Obrázek 27: Klíčivost *P.albida* na dusičnanové řadě. Boxploty znázorňují mediány klíčivostí, statisticky odlišné varianty jsou označeny odlišným písmenem ($\alpha = 0,05$; Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

3.1.8.2 Růst protokormů

Velikost protokormů byla signifikantně ovlivněna NO_3^- ($F_{[3,2]}=46.31$, $\alpha=0.0212$)
Největší protokormy byly nalezeny na médiu bez NO_3^- (3.10 mm; obr. 28). Se zvyšující se koncentrací NO_3^- v médiu se zmenšovala i velikost a početnost protokormů kde při 50mg NO_3^-/l byl zaznamenán jediný malý protokorm a při 100 mg NO_3^-/l nebyl zaznamenán ani jeden.



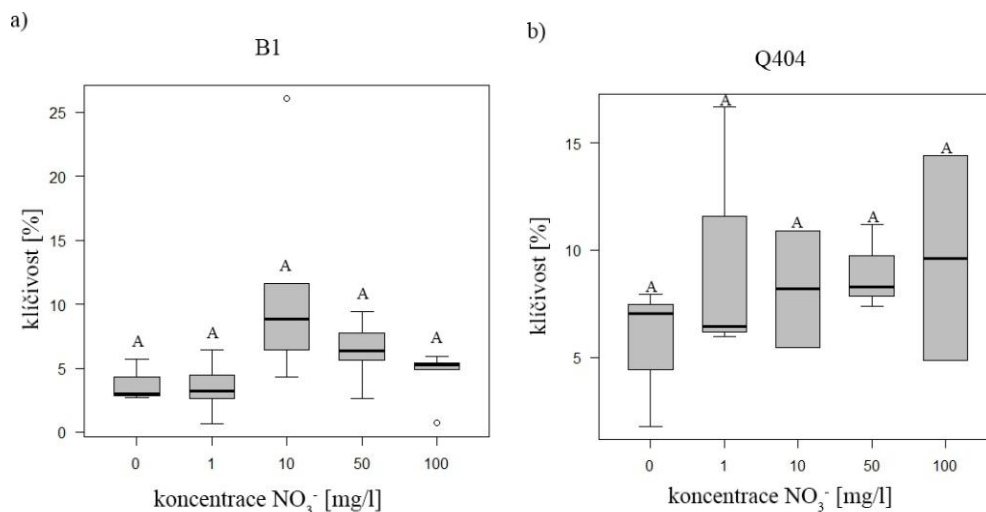
Obrázek 28: Délky protokormů *P.albida* v závislosti na zvyšujícím se obsahu NO_3^- v médiu. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty, varianta N50 se statisticky nehodnotila, obsahovala totiž jenom jediný protokorm ($\alpha = 0,05$; hierarchická ANOVA, TukeyC test).

3.2. Symbiotické výsevy

V pokusu s houbou B1 bylo napočítáno 9636 objektů s průměrem 385.44±537 objektů na misku a n=4-5 misek na variantu (24 celkem). Inhibiční efekt nitrátů na klíčení semen s houbou B1 zde pozorován nebyl, ale rozdíly mezi variantami byly průkazné ($F_{[4,20]}=3,001$ $\alpha=0,0432$, obr. 29a) s nejvyšší klíčivostí na variantě s 10 mg NO_3^-/l média (obr. 29a). Mortalita „p“ a „b“ ($F_{[4,20]}=1,053$, $\alpha=0.405$, data transformována funkcí sqrt), ani všech objektů ($F_{[4,20]}=0,579$, $\alpha=0,681$, data transformována funkcí sqrt) se nelišila se zvyšující koncentrací NO_3^- v médiu a ani nevykazovala žádný trend.

V pokusu s houbou Q404 bylo napočítáno 6485 objektů s průměrem na misku 463,2143±701 objektů a n= 2-5 misek na variantu (14 misek celkem). Semena klíčila na všech variantách média s nitráty se zajímavým trendem mírně stoupající klíčivosti se stoupající

koncentrací NO_3^- v médiu (obr. 29b), který ale nevyšel statisticky průkazně ($F_{[4,9]}=0,368$ $\alpha=0,826$). Mortalita „dp“ a „db“ ($F_{[4,9]}=1,881$, $\alpha=0,198$), ani všech mrtvých objektů se nelišila v rámci variant dusičnanové řady ($\chi^2_{(4)} = 5,4231$, $p = 0,2466$), ani nevykazovala žádný trend.



Obrázek 29: Vliv dusičnanů na klíčivost symbiotického výsevu *G. conopsea* po 3 měsících a. houba B1, „b“. houba Q404. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivostí, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

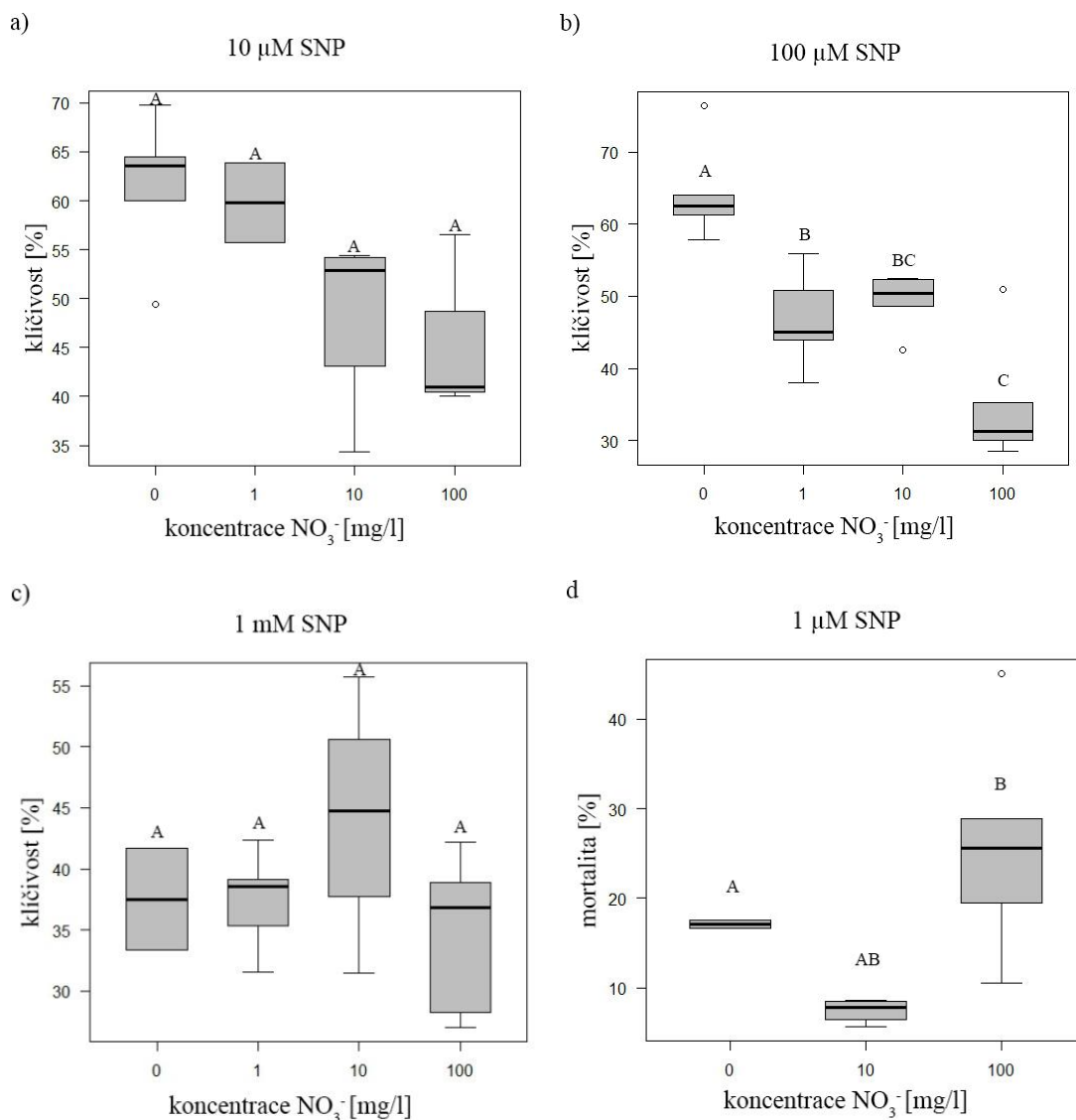
3.3 Vliv donorů a zhášečů NO na klíčivost vybraných druhů orchidejí

3.3.1 SNP

3.3.1.1 *Dactylorhiza majalis*

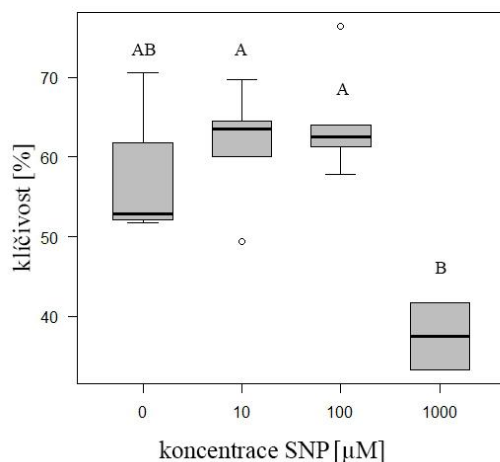
V tomto experimentu bylo napočítáno 4280 objektů na $n=2-5$ miskách na variantu a průměrným počtem 83 ± 68 objektů na misku. Kontrola k tomuto experimentu je uvedena v [kapitole 3.1.3](#) vlivu NO_3^- na klíčivost jako 2. opakování. Klíčivost vykazovala na variantách s různou koncentrací NO_3^- v médiu a zároveň přidáním 10 μM SNP podobný trend jako u kontroly bez SNP, ale statisticky se již nelišila ($F_{[3,10]} = 3,101$, $\alpha=0,076$) (obr. 30a). Mrtvé „dp“ a „db“ byly v rámci variant rozloženy náhodně ($\chi^2_{(3)} = 2,8017$, $p = 0,4232$), stejně tak jako všechny mrtvé objekty ($F_{[3,10]} = 1,039$, $\alpha=0,417$). Na variantách s různými koncentracemi NO_3^- a zároveň 100 μM SNP se klíčivost snížila oproti předchozí variantě s vysoce signifikantními rozdíly mezi variantami ($F_{[3,17]} = 15,52$, $\alpha=4,05e-05$, Obr 30b). Mortalita „dp“ a „db“ se v rámci variant nelišila ($\chi^2_{(3)} =$

7.4791, $p = 0.0581$) s výskytem „dp“ a „db“ jen ve dvou nejsilnějších koncentracích NO_3^- . Mortalita všech objektů se v rámci variant nelišila ($F_{[3,17]} = 1,524$, $\alpha = 0.244$) bez výrazného trendu. Klíčivosti na variantách s různou koncentrací NO_3^- a zároveň s přidáním $1 \mu\text{M}$ SNP se statisticky nelišily ($F_{[3,12]} = 1,451$, $\alpha = 0.277$; obr 30c), klíčivosti v této variantě byly nejnižší v tomto experimentu až na médium N100 kde se klíčivost jen nepatrně zvýšila (obr. 30c). Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami s různými koncentracemi NO_3^- nelišila ($F_{[2,8]} = 0,756$, $\alpha = 0.5$) ale všechny mrtvé objekty nebyly v rámci variant rozděleny náhodně ($F_{[2,8]} = 13.96$, $\alpha = 0.00246$, data transformována funkcí obrácená hodnota; obr. 30d).



Obrázek 30: Vliv NO_3^- na klíčivost *D. majalis* za současného přidání a. $10 \mu\text{M}$, b. $100 \mu\text{M}$, c. $1 \mu\text{M}$ SNP a d. mortalita všech objektů v závislosti na obsahu NO_3^- v médiu za současného přidání $1 \mu\text{M}$ SNP. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti (mortality), rozdílná písmena značí statisticky odlišné varianty (ANOVA, TukeyC, Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

Klíčivosti se na médiích bez přidaného NO_3^- významně lišily v závislosti na koncentraci SNP ($F_{[3,12]}=6.233$, $\alpha=0.00853$, Obr. 31). Zatímco dvě nižší koncentrace klíčivost významně neměnily, na nejvyšší koncentraci SNP 1mM došlo k výraznému poklesu klíčivosti (Obr. 31). Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($\chi^2_{(3)} = 3.4728$, $p = 0.3243$), stejně tak jako mortalita všech zhnědnutých objektů ($F_{[3,12]}=0.418$, $\alpha=0.743$), a obojí bez zřetelného trendu.



Obrázek 31: Vliv různých koncentrací SNP na klíčivost *D. majalis* bez přidání NO_3^- . Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, různé písmena značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.3.1.2 *Gymnadenia conopsea*

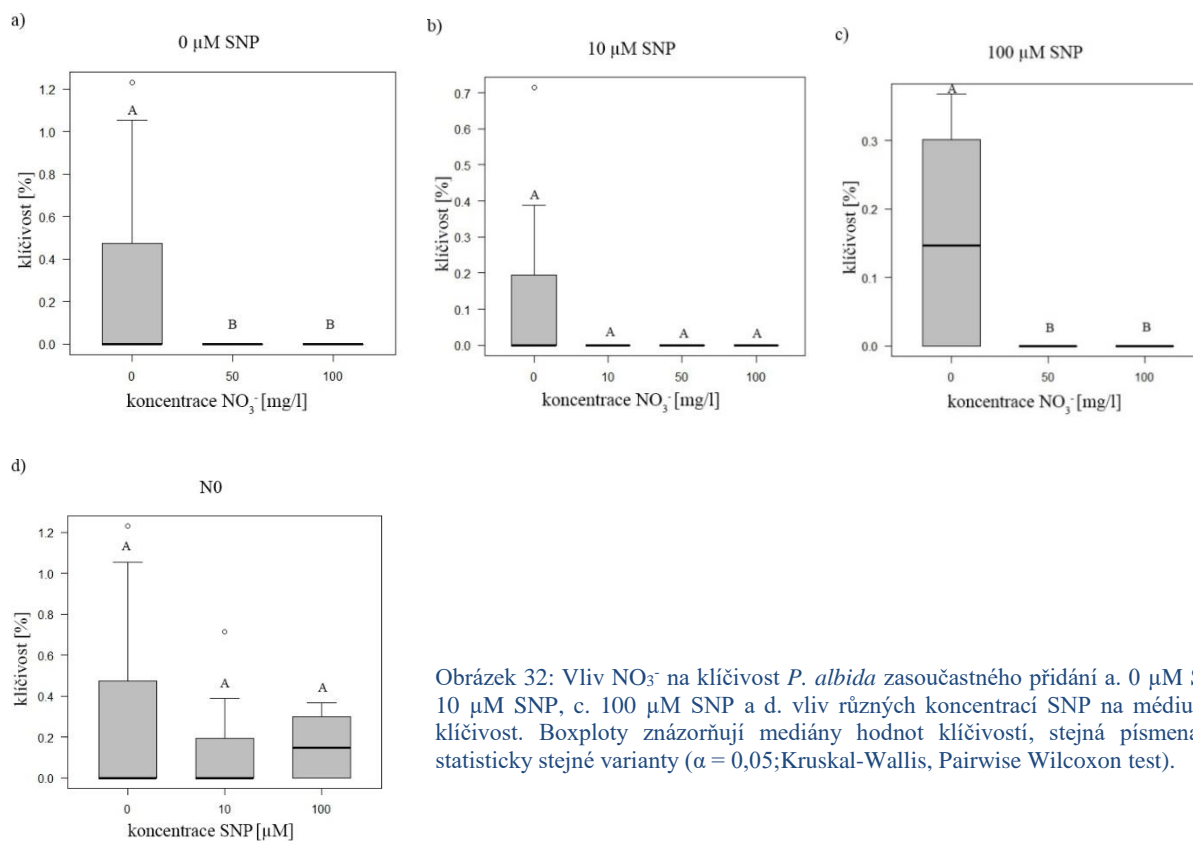
V tomto pokusu s *Gymnadenia conopsea* bylo napočítáno 3214 objektů na 53 miskách s počtem opakování $n=2-10$ misek na variantu a s průměrem 136 ± 316 objektů na misku. V celém experimentu se do stádia „b“ nebo „p“ dostaly pouze 4 objekty na 4 miskách a nelze proto vyvozovat žádné závěry. Mrtvé objekty se v tomto pokusu nevyskytovaly.

3.3.1.3 *Pseudorchis albida*

V tomto pokusu s *Pseudorchis albida* bylo napočítáno 15547 objektů na $n=6-11$ miskách na variantu a průměrným počtem 228 ± 361 objektů na misku. Klíčivosti v tomto pokusu byly velice nízké a semena klíčila jen na variantách bez přidaného NO_3^- (Obr. 32a,b,c a d). Na kontrolní variantě bez přidaného SNP byla klíčivost nejvyšší a klíčivosti se mezi variantami významně

lišily ($\chi^2_{(2)} = 7.5876$, $p = 0.02$; obr. 32a), rozdíly mezi variantami dusičnanové řady za současného přidání 10 μM SNP se nehodnotily, klíčivost zde byla zaznamenána jen na 2 miskách varianty N0 (obr. 32b). Klíčivosti zde ale byly nižší než na kontrolní variantě a na dusičnanové řadě za současného přidání 100 μM SNP byly klíčivosti nejnižší. Rozdíly mezi variantami dusičnanové řady za současného přidání 100 μM SNP byly průkazné ($\chi^2_{(2)} = 8.7861$, $p = 0.01$; obr.32c). Vzhledem k malému počtu jiných objektů než „s“ další hodnocení neprobíhalo.

Porovnávání médií N0 se všemi koncentracemi SNP nezjistilo signifikantní rozdíl ($F_{[2,19]}=0.73$ $\alpha=0.495$; Obr. 32d). Objekty „dp“ a „db“ se stejně tak jako všechny mrtvé objekty vyskytovaly pouze ojedinelé.



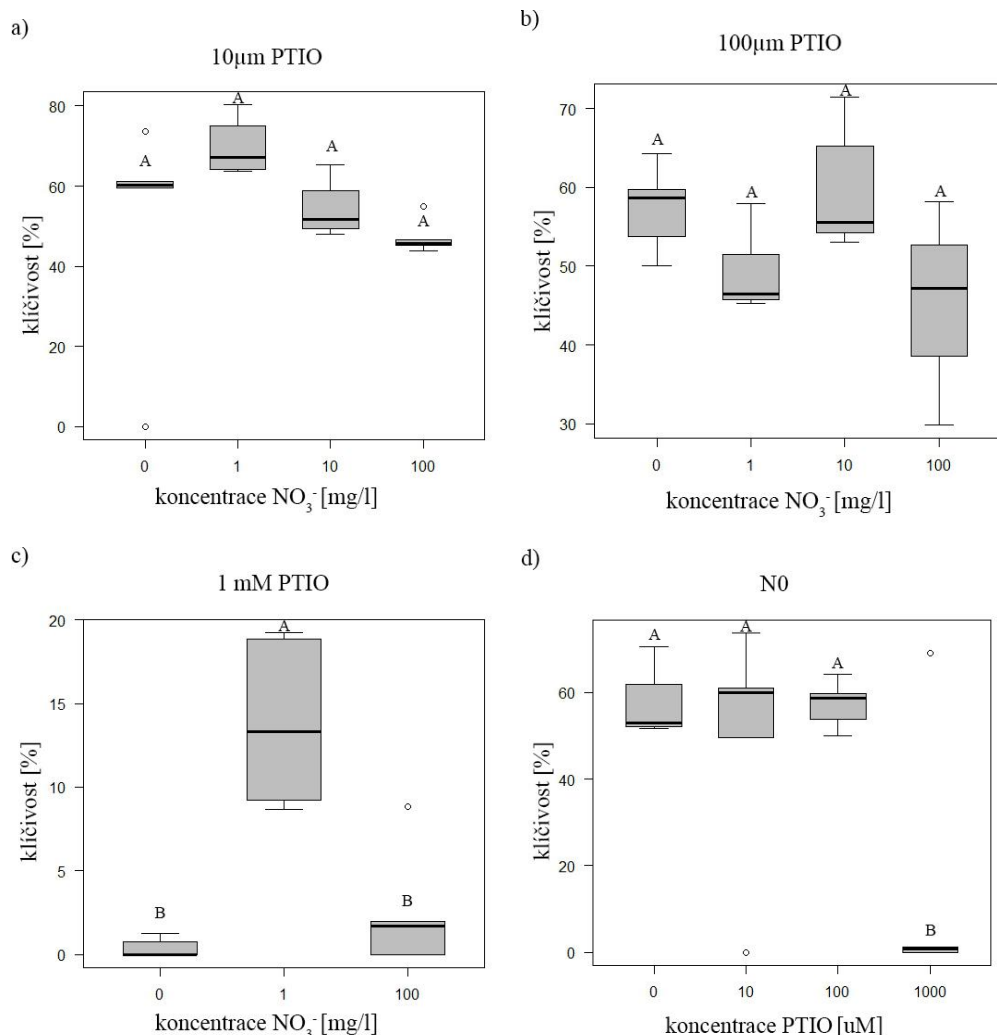
Obrázek 32: Vliv NO_3^- na klíčivost *P. albida* zasoučasného přidání a. 0 μM SNP, b. 10 μM SNP, c. 100 μM SNP a d. vliv různých koncentrací SNP na médiu N0 na klíčivost. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

3.3.2 PTIO

3.3.2.1 *Dactylorhiza majalis*

V tomto experimentu s *Dactylorhiza majalis* bylo napočítáno 5275 objektů na 56 miskách s průměrem 96 ± 161 objektů na misku. Kontrola k tomuto experimentu je uvedena v [kapitole 3.1.3](#) vlivu NO_3^- na klíčivost jako 2. opakování. Při koncentraci $10 \mu\text{m}$ PTIO se klíčivost vlivem NO_3^- snižovala, ale pouze mírně a na 5% hladině pravděpodobnosti nebyly rozdíly signifikantní ($F_{[3,14]} = 3,24$, $\alpha = 0.0544$; cos transformace; obr. 33a). Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($\chi^2_{(3)} = 4.528$, $p = 0.2098$) s výskytem jen na variantách N0 a N1. Mortalita všech objektů se mezi variantami dusičnanové řady také nelišila ($F_{[3,14]} = 0,492$, $\alpha = 0.693$), bez znatelného trendu. Klíčivost se signifikantně lišila mezi variantami dusičnanové řady za současného přidání $100 \mu\text{m}$ PTIO ($F_{[3,16]} = 3,344$, $\alpha = 0.0457$; obr. 33b) kde varianty dusičnanové řady N10 a N100 vykazovaly nárůst klíčivosti oproti předešlé variantě. Jen 1 db se vyskytoval na jediné misce N100 a všechny mrtvé objekty byly mezi variantami dusičnanové řady rozděleny náhodně ($F_{[3,16]} = 1.5$, $\alpha = 0.253$).

Výrazně nejnižší klíčivost byla pozorována na dusičnanové řadě za současného přidání 1mM PTIO. Klíčivost se zde signifikantně lišila mezi variantami ($F_{[2,14]} = 24,29$, $\alpha = 2.81 \times 10^{-5}$; sqrt transformace; obr.33c). Objekty „dp“ a „db“ se zde vyskytovaly jen na jediné misce N0 a všechny mrtvé objekty se vyskytovaly náhodně ($F_{[2,14]} = 0,855$, $\alpha = 0,446$) s mírným klesajícím trendem se stoupajícím obsahem NO_3^- v médiu.



Obrázek 33: Vliv NO_3^- na klíčivost *D. majalis* za současného přidání a. 10 μm PTIO, b. 100 μm PTIO, c. 1 mM PTIO a d. vliv přidání úžných koncentrací PTIO do média bez NO_3^- na klíčení *D. majalis*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, rozdílná písmena značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

Samotné přidání PTIO do média bez dusičnanů (N0) vedlo k výraznému poklesu klíčivosti na nejvyšší koncentraci (1 mM PTIO), ale rozdíl na 5% hladině pravděpodobnosti nevyšel průkazně ($F_{[3,17]} = 2,981$, $\alpha = 0,606$, Obr 33d). Objekty „dp“ a „db“ se vyskytovaly málo a náhodně ($\chi^2_{(3)} = 4.5932$, $p = 0.2041$) a všechny zhnědnuté objekty se také vyskytovaly mezi variantami s různou koncentrací PTIO náhodně ($F_{[3,17]} = 0,108$, $\alpha = 0,954$).

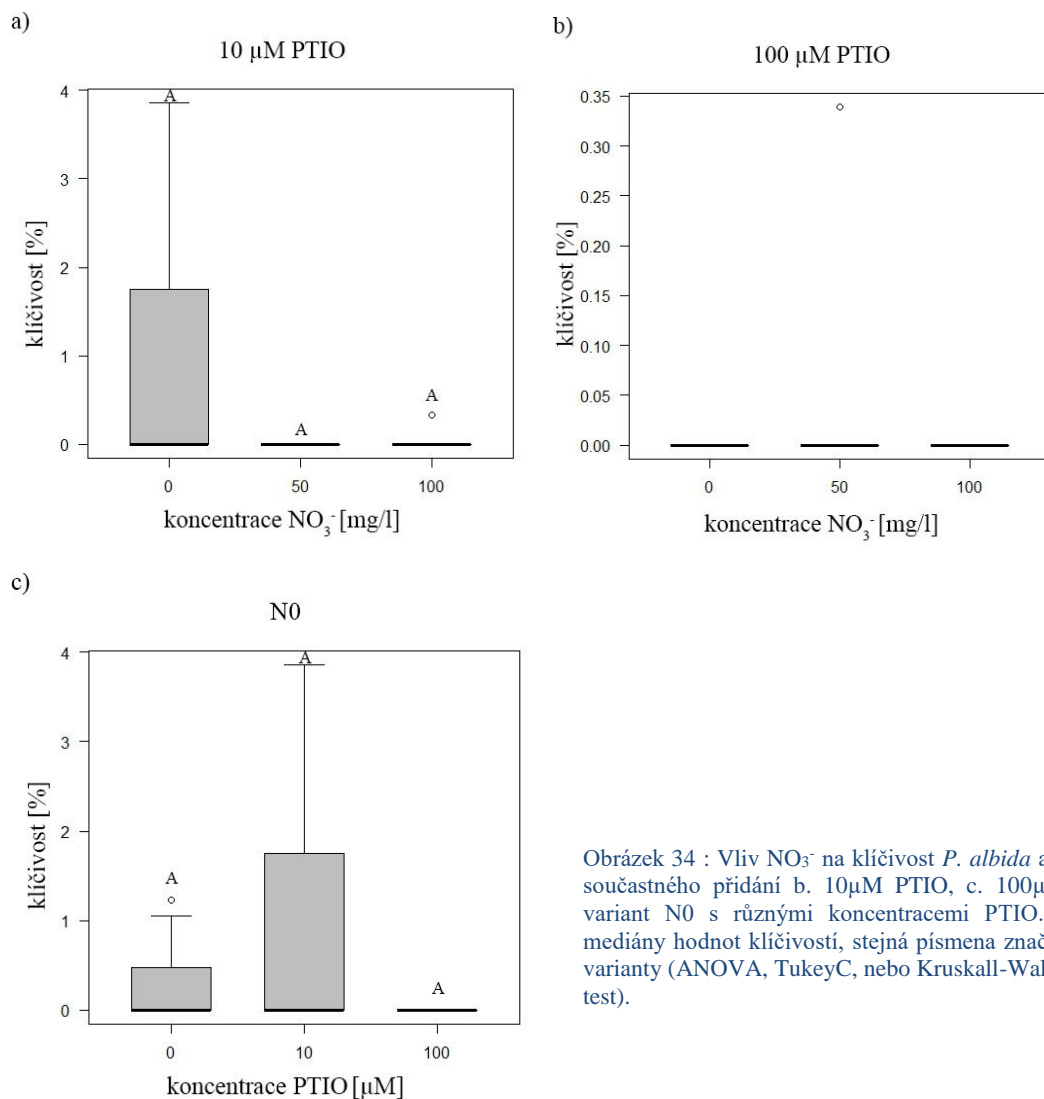
3.3.2.2 *Gymnadenia conopsea*

V tomto pokusu bylo napočítáno 8379 objektů na 41 miskách s počtem opakování $n = 3-8$ misek na variantu s průměrem 204 ± 605 objektů na misku. V celém experimentu se do stádia „b“,

„p“, „db“ nebo „dp“ dostaly 4 objekty na 4 miskách a nelze vyvozovat žádné závěry. „dp“ a „db“ se vyskytovaly v celém pokusu 4 a „ds“ 3.

3.3.2.3 *Pseudorchis albida*

V tomto pokusu s *Pseudorchis albida* bylo napočítáno 8369 objektů na n=5-9 miskách s průměrem 204±605 objektů na misku. Semena klíčila jen na variantách dusičnanové řady N0 (obr. 34a,b,c). Viditelné odlehlé hodnoty na médiu N100 u varianty s přidaným 10μM PTIO (obr. 34b) a N50 u varianty s 100 μM PTIO (obr.34c) způsobila přítomnost útvarů, které byly intermediární mezi kategoriemi „b“ a „s“ a byly hodnoceny v kategorií „b“. 10μM PTIO zvýšilo klíčivost oproti kontrole bez PTIO, zatímco na 100μM PTIO byla klíčivost nulová. Objekty „dp“ a „db“ se vyskytovaly v pouze jednotlivě, stejně tak jako všechny mrtvé objekty. Porovnání médií N0 s různými koncentracemi PTIO nebylo statisticky průkazné ($\chi^2_{(2)} = 4.2674$, p= 0.1184; obr. 34d) s výše popsaným trendem.



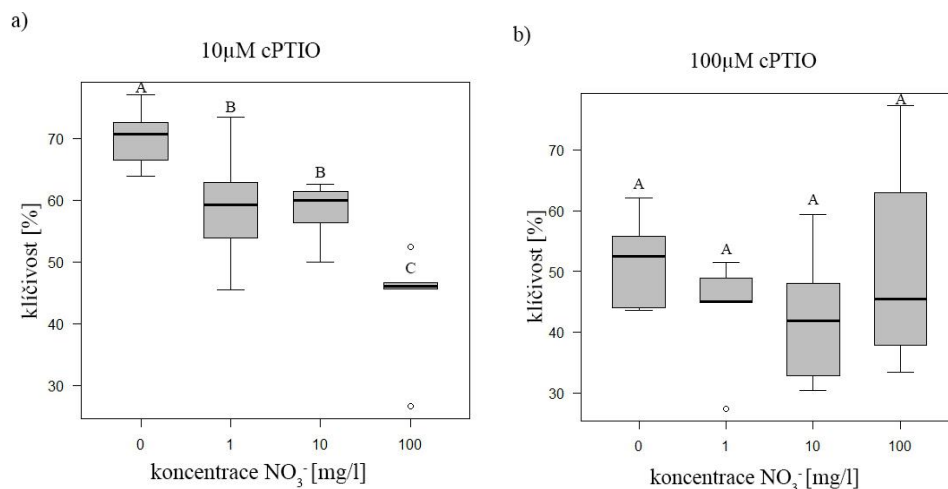
Obrázek 34 : Vliv NO₃⁻ na klíčivost *P. albida* a. bez přidání PTIO, za současného přidání b. 10μM PTIO, c. 100μM PTIO a porovnání variant N0 s různými koncentracemi PTIO. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky nelišící se varianty (ANOVA, TukeyC, nebo Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

3.3.3 cPTIO

3.3.3.1 *Dactylorhiza majalis*

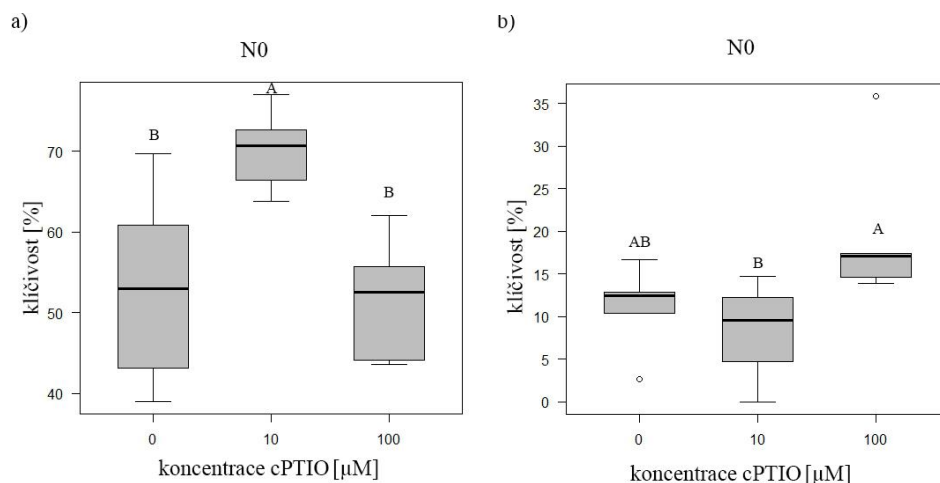
V tomto pokusu s *Dactylorhiza majalis* bylo napočítáno 5240 objektů na 20 miskách s počtem opakování n=(4-11) na misku a průměrem 108±436 objektů na misku. Klíčivosti na různých variantách dusičnanové řady se současným přidáním 10μM cPTIO klesaly s vysokou signifikancí ($F_{[3,23]}= 14,65$, $\alpha=1,51 \times 10^{-5}$, Obr 35a). Objekty „dp“ a „db“ se vyskytovaly jen na 2 miskách v celkovém počtu 3 a všechny mrtvé objekty se vyskytovaly náhodně v rámci variant ($F_{[3,23]}= 1,423$, $\alpha=0,262$). Klíčivosti se mezi různými variantami dusičnanové řady se současným

přidáním 100 μ M cPTIO nelišily ($F_{[3,21]} = 1,285$, $\alpha=0,306$; obr. 35b) s mírně klesajícím trendem. I tady se „dp“ a „db“ objevily jen na 2 miskách a mrtvé objekty se na různých variantách dusičnnové řady vysytovaly náhodně ($F_{[3,21]} = 0,407$, $\alpha=0,75$).



Obrázek 35: Vliv NO_3^- na klíčivost *D. majalis* za součastného přidání a. 10 μ M cPTIO, b. 100 μ M cPTIO. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena začí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

Klíčovosti na variantě N10 se od ostatních variant s přidáním cPTIO lišily průkazně ($F_{[2,15]} = 10,26$, $\alpha=0,00156$, Obr 36a). Průkazně, s nejvyšším výsktem na variantě N100 se lišil i výskyt všech mrtvých objektů mezi různými variantami cPTIO ($F_{[2,15]} = 4,932$, $\alpha=0,0226$, Obr. 36b), mrtvé „dp“ a „db“ se vyskytovaly velice ojediněle.

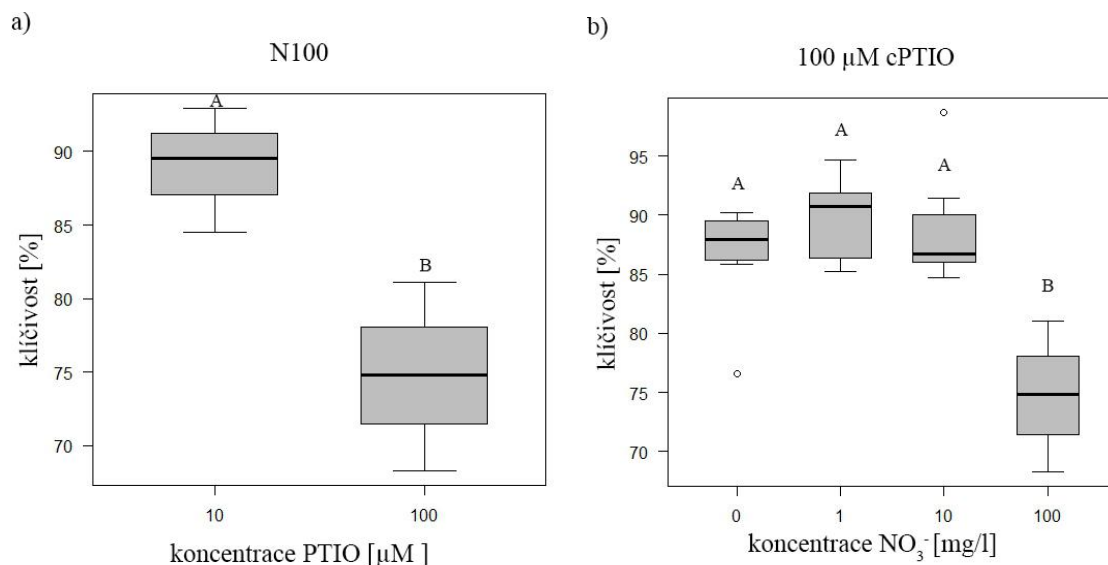


Obrázek 36: Vliv zvyšující se koncentrace cPTIO a. na klíčivost *D. majalis*, b. na mortalitu všech objektů. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti (mortalit), odlišná písmena značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.3.3.2 *Ophrys neglecta*

3.3.3.2.1 Klíčivost semen

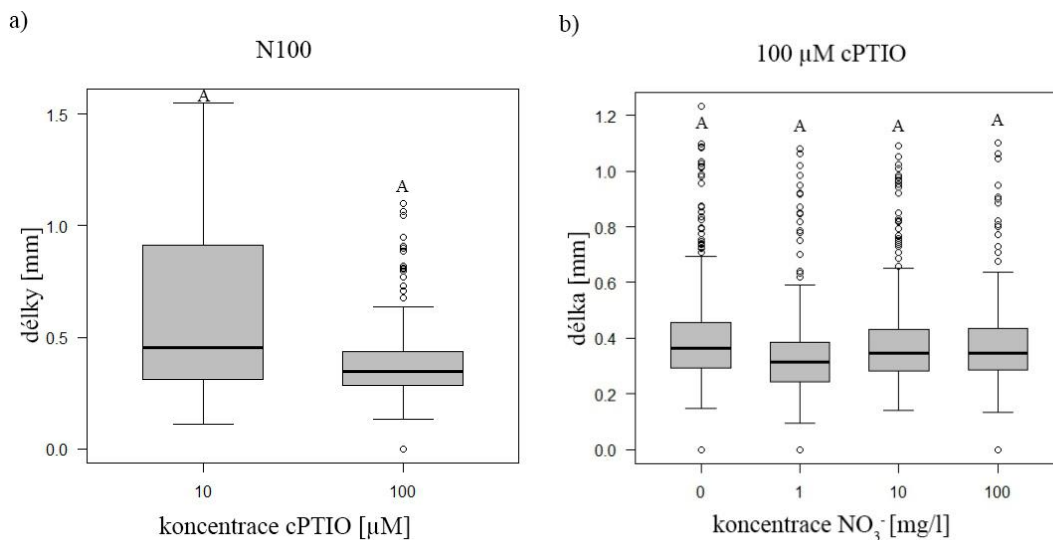
V tomto pokusu bylo napočítáno 4886 objektů na 51 miskách s počtem opakování $n=3-8$ misek na variantu a průměrným počtem 174 ± 299 objektů na misku. Z variant s koncentrací cPTIO 10 μM zůstaly bez kontaminací jen misky s médiem N100 (Obr. 37). Mrtvé „p“ a b se zde nevyskytovaly a průměrně zde bylo 2.95 % všech mrtvých objektů na misku, proto se mortality nehodnotily. Rozdíly mezi jedinou variantou která na koncentraci cPTIO 10 μM zůstala tedy N100 a varianty N100 s přidáním 100 μM cPTIO byly průkazné ($F_{[1,5]}= 14.85$, $\alpha= 0,012$; obr. 37a) přičemž na variantě s 100 μM cPTIO byly klíčivosti nižší. Na koncentraci cPTIO 100 μM se klíčivost na jednotlivých variantách s přidáním NO_3^- lišila signifikantně ($F_{[3,23]}= 11.25$, $\alpha= 8.25\times 10^{-5}$, obr. 37b) s podobným průběhem jako u klíčivosti na kontrole, ale s nižší klíčivostí. Mortalita všech objektů se v rámci variant s různou koncentrací nitrátů signifikantně nelišila ($F_{[3,23]}= 0.579$, $\alpha= 0,635$), ale nejvyšších hodnot dosahovala na variantě N100. Mortalita „dp“ a „db“ nebyla hodnocena, protože tyto mrtvé objekty se objevily jen na jediné misce N10.



Obrázek 37: Vliv a. PTIO na klíčivost *O. neglecta* na variantě dusičnanové řady N100 b. klíčivost semen *O. neglecta* za současného působení 100 μM cPTIO. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.3.3.2 Růst protokormů

Velikost protokormů po přidání 100 μM cPTIO byla nižší (maximální průměr 1.232 mm, průměrný 0,383 mm), oproti kontrole, avšak mezi variantami nebyly rozdíly ($F_{[3,19]}=2.741$, $\alpha=0.0718$; obr 38b), ani znatelný trend. Po přidání 10 μM cPTIO byla velikost protokormů na N100 mírně vyšší (největší protokorm měl průměr 1,55 mm a průměrný 0,606 mm), statistické hodnocení nebylo možné provést, protože zbyla pouze varianta s N100, ostatní varianty zkontaminovali. Porovnání variant N100 s přidáním 10 a 100 μM cPTIO nenalezlo rozdíl ($F_{[1,6]}=5.05$, $\alpha=0.0657$; obr. 38a), avšak byl zde znatelný mírný pokles velikosti protokormů na vyšší koncentraci NO_3^- .



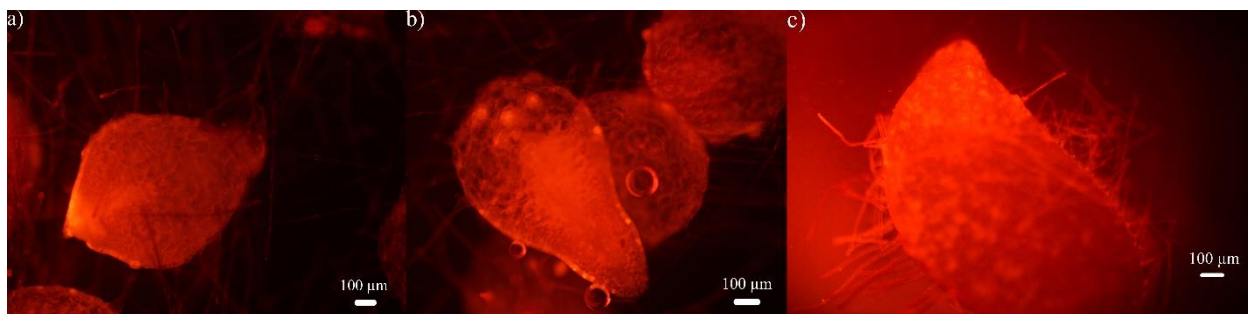
Obrázek 38: Vliv cPTIO na velikost protokormů u *O. neglecta* a. délky protokormů na variantě N100 po přidání 10 a 100 μM cPTIO a b. délky protokormů na různých variantách dusičnanové řady za přidání 100 μM cPTIO. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; hierarchická ANOVA, TukeyC test).

3.4 Analýzy obsahu NO v protokormech

3.4.1 Lokalizace NO

Jako první se obarvovaly vlásky protokormů (po cca 30 min) a následně (45 min v roztoku DAR-4M AM) se obarvovaly řezy protokormy. Barvení protokormů delší dobu (13 hodin) již dále nevykazovalo lepší výsledky. Varianty N0 a N100 se nelišily. U obou bylo pozorováno maximum koncentrace NO v apikální části protokormů okolo formujícího se meristému (obrázek 39a,b).

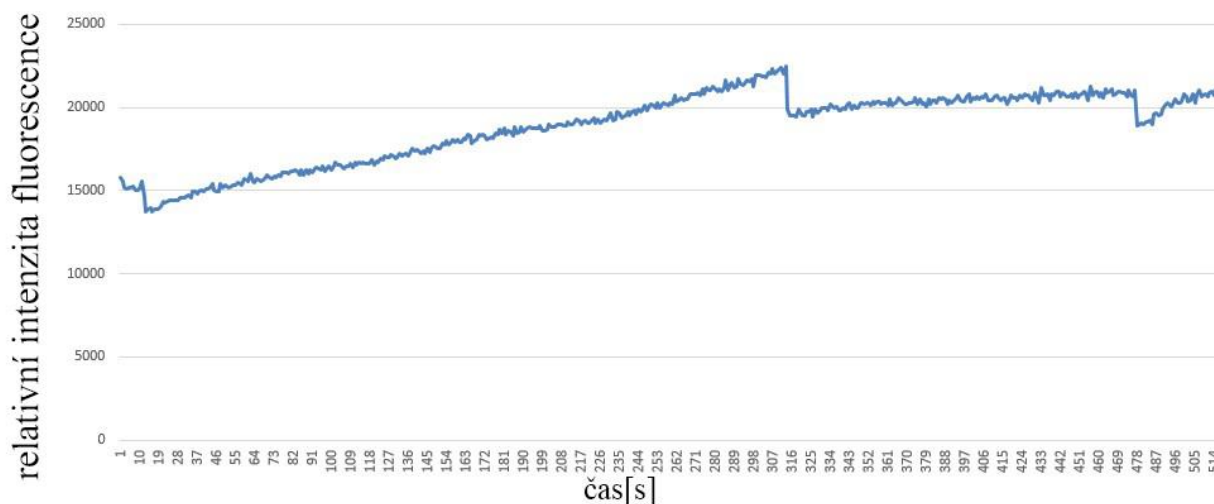
Orientačně byla pozorována také *G. conopsea* (2 poloviny protokormů varianty N0). Byla zde viditelná podobná lokalizace fluorescence jako u *H. robertianum* (Obr. 39c).



Obrázek 39: Fluorescence řezů protokormů po 45 minutách barvení barvivem 10 μ M DAR-4M AM. a. *H. robertianum* které bylo pěstováno N0, zvětšení 4x b. *H. robertianum* pěstováno na médiu s N100 a při zvětšení 4x c. *G. conopsea* která byla kultivována na médiu N0, při zvětšení 10x. Všechny obrázky byly foceny za stejného expozičního času 2 s, a citlivosti na světlo ISO 100.

Orientačně byla pozorována také *G. conopsea* (2 poloviny protokormů varianty N0). Byla zde viditelná podobná lokalizace fluorescence jako u *H. robertianum* (Obr. 39c).

3.4.2 Měření koncentrace NO v protokormech

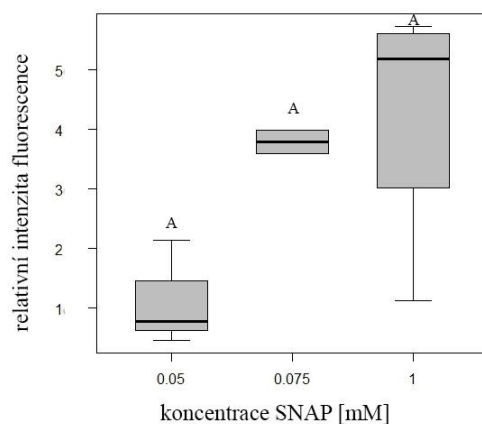


Obrázek 40: Relativní intenzita fluorescence extraktu z *H. robertianum* (N0). V čase $t=12$ byla k extraktu (10mg protokormů/ ml fosfátového pufru) přidána 10 μ M barva DAR-4M-AM pro finální koncentraci 1 μ M. V čase $t=316$ byl přidán zhášec PTIO pro finální koncentraci 1 μ M a v čase $t=478$ donor SNAP [1 μ M].

Fluorescenční odezva barvy DAR-4M-AM reagovala na obsah NO (obr. 40). Hodnota fluorescence samotného extraktu *H. robertianum* se nezvyšovala. Přidání barvy DAR 4M-AM k extraktu způsobilo průběžné zvyšování intenzity fluorescence, které zřejmě odráželo produkci NO rostlinným extraktem. Po přidání zhášec PTIO se nárůst fluorescence takřka zastavil a po přidání

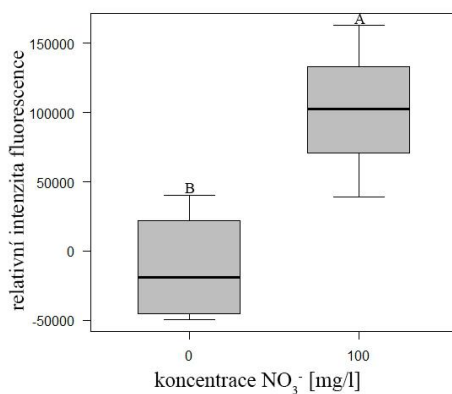
donoru NO SNAP se nárůst urychlil (obr. 40).

Dalším zjištěním bylo že intenzita fluorescence barvy DAR 4M-AM reagovala neprůkazně ($F_{[2,6]}=3.565$, $\alpha=0.0954$; obr. 41), ale s výrazným trendem na koncentraci SNAP. Výsledek byl ale vzhledem k velké variabilitě neprůkazný. Při vysokých koncentracích SNAP (10x vyšší koncentrace) nereagovala což mohlo být způsobeno samozhášením barvy za vysokých koncentrací NO produkovaných SNAP (Obr. 41). Při 10x vyšší koncentraci barvy odezva také neodpovídala koncentraci SNAP.

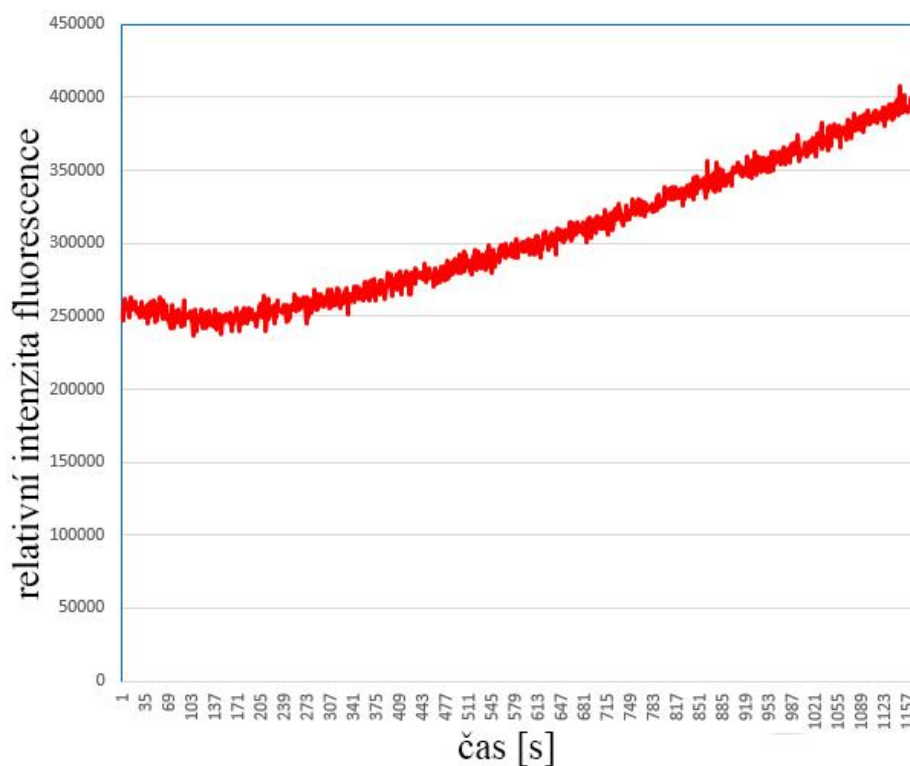


Obrázek 41: Fluorescence barvy DAR 4M-AM v závislosti na koncentraci SNAP. Boxploty znázorňují mediány fluorescence barvy, stejná písmena statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

Posledním zjištěním bylo že extrakt z protokormů *D. majalis* pěstovaných na médiu N100 měl signifikantně vyšší fluorescenci ($F_{[1,5]}=8.492$, $\alpha=0.0332$) než ten z protokormů pěstovaných na médiu N0 (Obr. 42). Intenzita fluorescence extraktů z varianty N0 nerostla, a docházelo dokonce k jejímu mírnému poklesu, což mohlo být způsobeno samozhášením barvy (Obr. 42). Ukázková křivka fluorescence varianty N100 je na obr. 43.



Obrázek 42: Fluorescence extraktu z protokormů *D.majalis* pěstovaných na médiích s různými koncentracemi NO₃⁻ s barvivem DAR 4M-AM detekujícím NO. Boxploty znázorňují mediány fluorescence barvy, rozdílná písmena statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

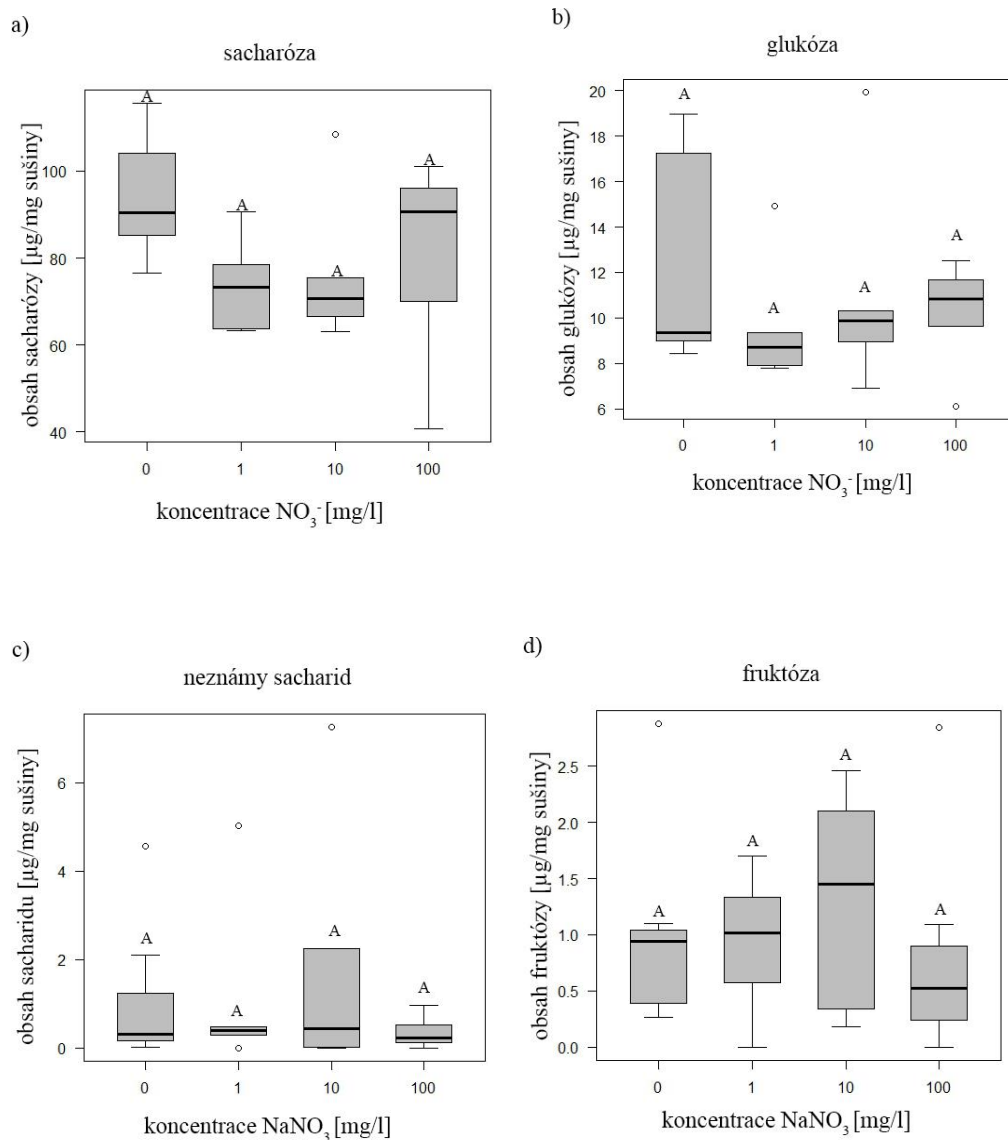


Obrázek 43: Průběh křivky intenzity fluorescence extraktu z *D. majalis* obarveného DAR 4M-AM v čase (s). Protokormy byly kultivovány na variantě N100.

3.5 Obsah endogenních sacharidů v protokormech

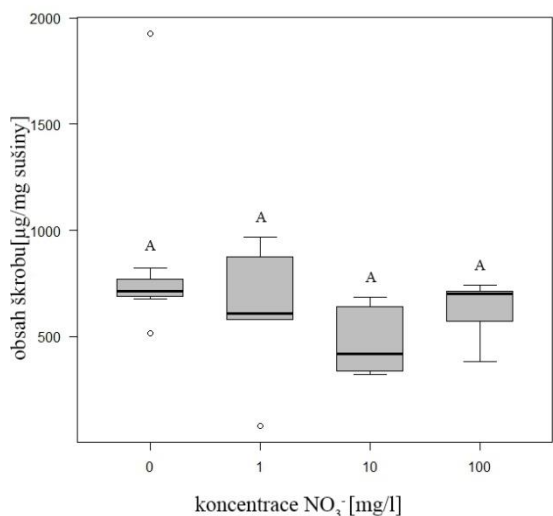
Experiment byl proveden jen s druhem *Dactylorhiza majalis*. U změřených 26 vzorků (N0-7; N1-6; N10-6 a N100-7 vzorků) se obsah sacharózy $F_{[3,22]}=2,013$, $\alpha=0.142$, glukózy $F_{[3,22]}=0,884$,

$\alpha=0.465$, neznámého sacharidu $F_{[3,22]}=0,595$, $\alpha=0.625$, fruktózy $F_{[3,22]}=0,409$, $\alpha=0.748$ a ani celkový obsah rozpustných sacharidů $F_{[3,22]}=1,917$, $\alpha=0.156$ neliší na různých koncentracích NO_3^- v médiu (obr.44a,b,c,d).



Obrázek 44: Vliv NO_3^- na obsah rozpustných sacharidů v protokormech *D. majalis*. Zleva nahoře a. sacharóza, b. glukóza, c. neznámý sacharid a d. fruktóza. Boxploty znázorňují mediány hodnot obsahu rozpustných sacharidů, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

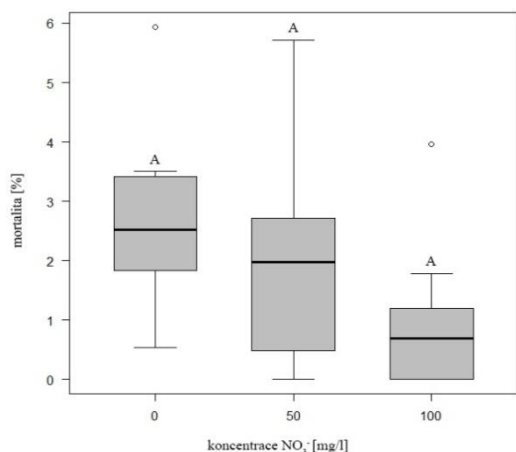
Při zjišťování obsahu škrobu bylo změřeno 26 vzorků (N0-7; N1-6; N10-6 a N100-7 vzorků). Rozdíly v obsahu škrobu na různých koncentracích NO_3^- v médiu nebyly průkazné ($F_{[1,24]}=0,167$, $\alpha=0,889$; sqrt transformace, obr.45).



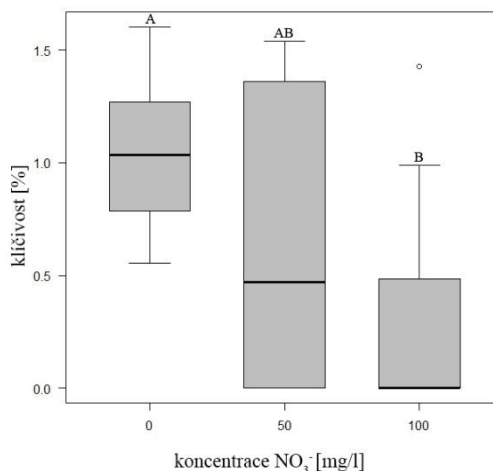
Obrázek 45: Vliv dusičnanů na obsah škrobu v protokormech *D. majalis*. Boxploty znázorňují mediány hodnot obsahu škrobu, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.6 Vliv wolframanu na klíčení semen

Pokus s wolframem byl proveden jen s druhem *Gymnadenia conopsea*. Celkem bylo napočítáno 19218 objektů, na 71 petriho miskách s průměrným počtem 407 ± 382 objektů na misku.

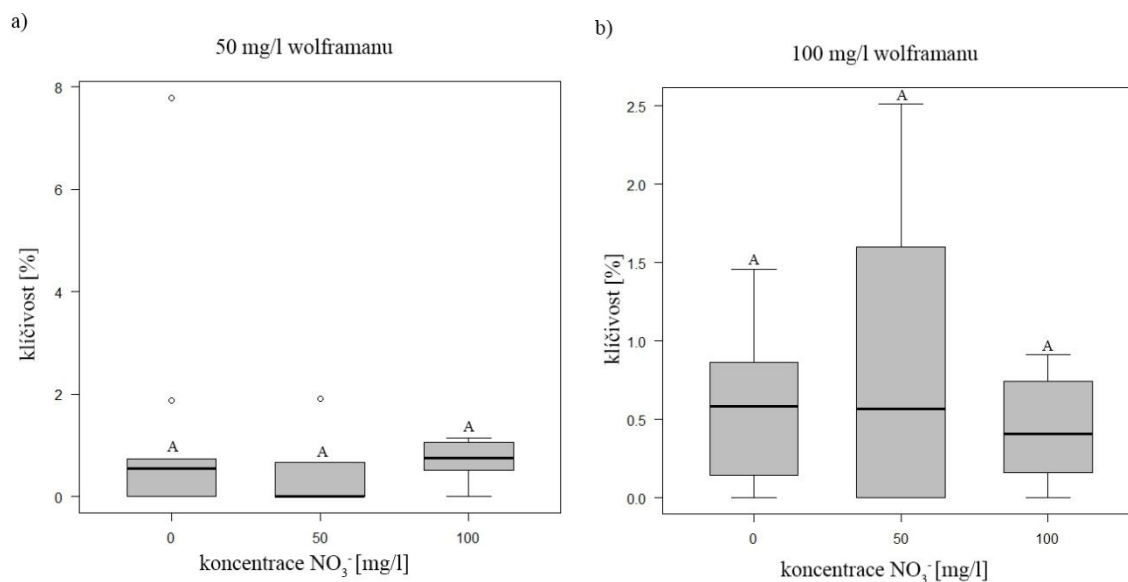


Obrázek 47: Vliv dusičnanů na mortalitu protokormů *G. conopsea* na médiu bez přídání wolframanu. Boxploty znázorňují mediány mortalit, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).



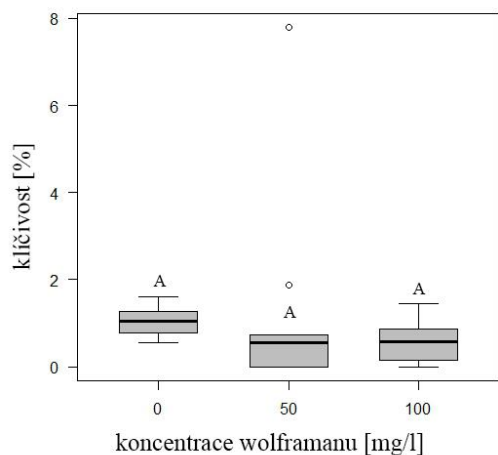
Obrázek 46: Vliv dusičnanů na klíčivost semen *Gymnadenia conopsea* bez přídání wolframanu. Boxploty znázorňují mediány klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

Klíčivosti v tomto experimentu byly jedny z nejnižších vůbec u *G.conopsea*. Klíčivosti v kontrolních variantách bez přidaného wolframanu (3 varianty média s koncentracemi NO₃⁻ 0, 50 a 100 mg/l) potvrdily inhibiční efekt nitrátu na klíčení semen *Gymnadenia conopsea* (ANOVA, $F_{[1,27]}=9,472$, $\alpha=0.00474$; Obr. 47). Mortalita všech objektů (kategorie db,dp a ds) v závislosti na obsahu NO₃⁻ v médiu také klesala ($F_{[1,27]}=6,75$, $\alpha=0.015$; obr 46). Mortalita protokormů a nabobtnaných embryí (kategorie „p“ a „b“) se nelišila mezi variantami dusičnanové řady ($F_{[1,27]}=3,793$, $\alpha=0.0619$), ale vykazovala stejný trend jako mortalita všech objektů.



Obrázek 48: Vliv NO₃⁻ na klíčivost *G. conopsea* při současném přidání a. 50 mg/l, b. 100 mg/l wolframanu. Boxploty znázorňují mediány klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky odlišné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

I když klíčivosti byly nízké, je zde patrné že po aplikaci wolframanu rostliny na testovaných variantách média s NO₃⁻ nereagovaly stejně jako při kontrole, klíčivost se nesnižovala s koncentrací NO₃⁻ v médiu při 50mg ($F_{[1,18]}=0,019$, $\alpha=0.892$, sqrt transformace; obr. 48a) ani při 100 mg wolframanu přidaného do média ($F_{[1,20]}=0,062$, $\alpha=0.806$, sqrt transformace; obr. 48b). Samotný přídavek wolframanu do média bez NO₃⁻ snížil klíčivost na variantách s 50 mg/l a 100 mg/l jen minimálně ($F_{[2,20]}=0,371$, $\alpha=0.695$; obr. 49). Závislost všech mrtvých



Obrázek 49: Vliv wolframanu na klíčivost semen *G. conopsea* bez přítomnosti NO_3^- (N0). Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejné písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

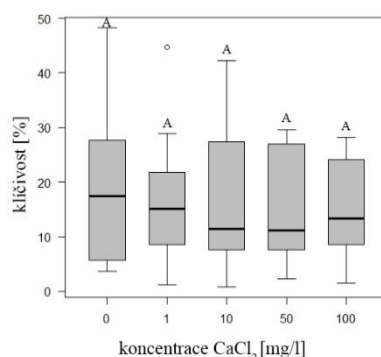
objektů v obou variantách na obahu NO_3^- v médiu (50 wolframanu mg/l: $F_{[1,18]}=2,048$, $\alpha=0.17$, 100 mg/l wolframanu: $F_{[1,20]}=0,872$, $\alpha=0.362$) ani závislost mrtvých protokormů („dp“) a bezvláskatých protokormů („db“) na obsahu NO_3^- v médiu (50 mg wolframanu/l: $F_{[1,18]}=1,121$, $\alpha=0.286$, 100mg wolframanu /l: $F_{[1,20]}=0,025$, $\alpha=0.875$) nevykazovaly žádný znatelný trend.

3.7 Vliv kontrolních látek na klíčení některých druhů orchidejí

3.7.1. CaCl_2

3.7.1.1 *Gymnadenia conopsea*

V tomto pokusu bylo napočítáno 17855 objektů na $n=15-18$ miskách s průměrem 275 ± 669 objektů na misku. Klíčivosti se mezi variantami s různou koncentrací CaCl_2 nelišily ($F_{[4,72]}=0,292$, $\alpha=0.882$) stejně tak jako výskyt mrtvých „dp“ a „db“ ($F_{[4,72]}=0,701$, $\alpha=0.594$) a mortalita všech objektů ($F_{[4,72]}=0,755$, $\alpha=0.558$; obr. 54) mezi variantami dusičnanové řady. Kromně mírného klesajícího trendu mortality „dp“ a „db“ se zvyšujícím se obsahem NO_3^- v médiu nebyl znatelný žádný znatelný trend u klíčivosti nebo mortality všech objektů. Kontrola k tomuto pokusu je uvedena v kapitole o vlivu klíčivosti semen *G. conopsea* na různé koncentrace NO_3^- jako čtvrté opakování (viz kapitola 3.1.4.1 [Gymnadenia conopsea agg.](#)), a je zde zobrazena její N0 varianta.

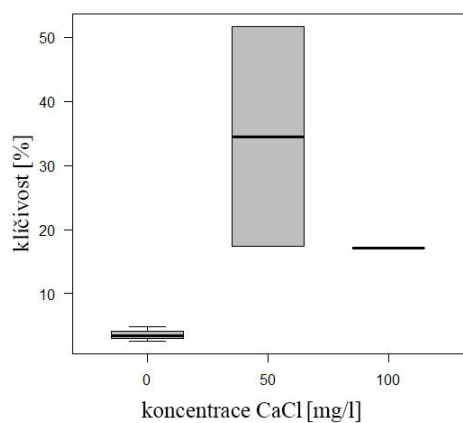


Obrázek 50: Klíčivost *G. conopsea* na médiích s různou koncentrací CaCl_2 . Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

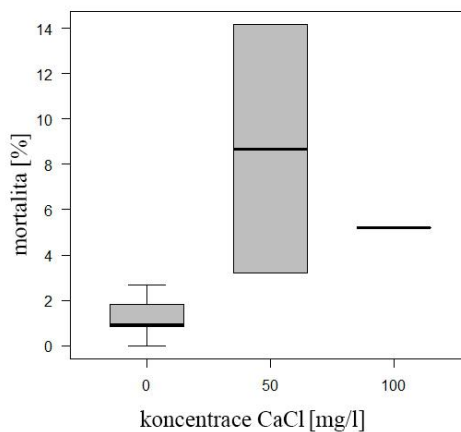
3.7.1.2 *Pseudorchis albida*

V tomto pokusu bylo napočítáno kvůli vysoké množství kontaminací jen 696 objektů na $n=1-7$ miskách (N0:7, N50:2, N100:1) s průměrem na misku 313 ± 162 objektu. Statistické hodnocení kvůli nedostatku opakování nebylo možné provést, lze ale vidět spíše možné zvyšování klíčivosti a také mortality („dp“ a „db“) se zvyšováním obsahu CaCl_2 (Obr. 55).

a)



b)



Obrázek 51: Vliv CaCl_2 na a. klíčivost a b. mortalitu „p“ a „b“ *P. albida*. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti (mortalit; $\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

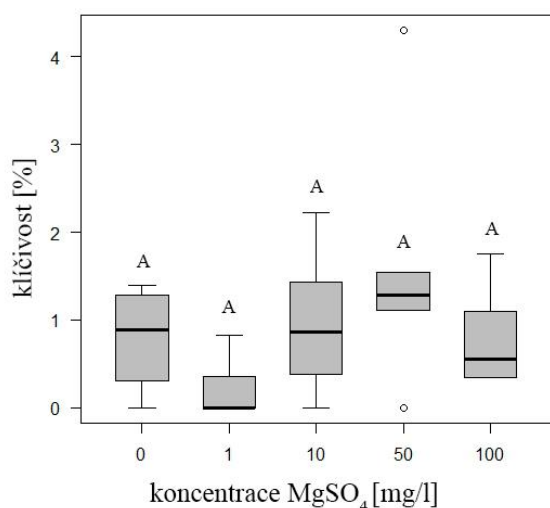
3.7.2 MgSO₄

3.7.2.1 *Gymnadenia conopsea*

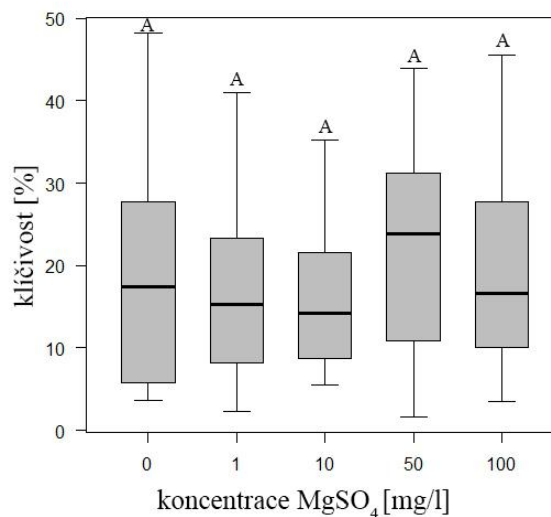
V tomto pokusu bylo napočítáno 5366 objektů na 27 miskách n=4-6 (N0:4; N1: 7;N10: 6; N50:5; N100:5) s průměrem 198,7407±150 objektů na misku. Klíčivost na různých variantách s přidaným MgSO₄ se statisticky nelišila ($F_{[4,22]}=2,306$, $\alpha=0.0903$, sqrt transformace; obr. 56a), stejně tak jako mortalita ($\chi^2_{(4)} = 9.4169$, $p= 0.05148$).

Pokus byl zopakován. Zde bylo napočítáno 17812 objektů na n=16-21 misek s průměrem na misku 247±285 objektů. Klíčivosti se mezi variantami s různou koncentrací MgSO₄ nelišily ($F_{[4,79]}=0,662$, $\alpha=0.62$, Obr. 56b). Mrtvé „p“ a „b“ se mezi variantami dusičnanové řady vyskytovala náhodně ($F_{[4,79]}=0,714$, $\alpha=0.585$) stejně tak jako všechny mrtvé objekty ($F_{[4,79]}=0,815$, $\alpha=0.52$), obojí bez jakéhokoli trendu. Kontrola k tomuto pokusu je čtvrté opakování pokusu s klíčivostí *G. conopsea* na různých koncentracích NO₃⁻ (viz kapitola [3.1.4.1 Gymnadenia conopsea agg.](#)) a je zde zobrazena její N0 varianta.

a)



b)



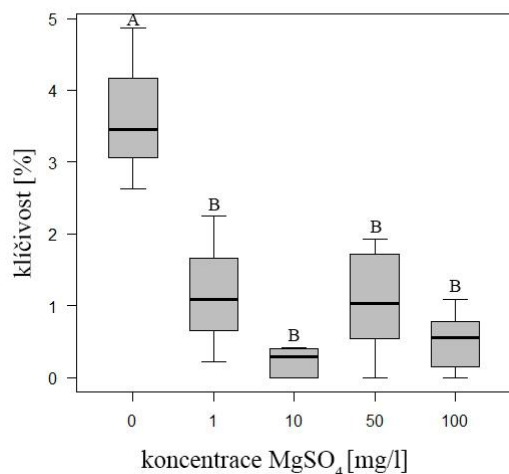
Obrázek 52: Klíčivost *G. conopsea* na médiích s různou koncentrací MgSO₄, a. starší pokus a b. novější pokus. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.7.2.2 *Pseudorchis albida*

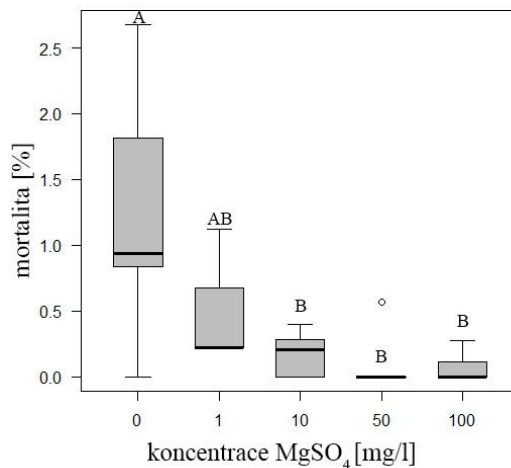
V tomto pokusu bylo napočteno 10752 objektů na n= 3-7 (N0:7; N1:3; N10:7; N50: 5; N100:6) misek na variantu a s průměrem 358 ±441 objektů na misku. Klíčivosti na variantě bez

přidaného MgSO_4 se lišily signifikantně od ostatních variant s přidaným MgSO_4 ($F_{[4,25]}=15,5$, $\alpha=1.68 \times 10^{-6}$, sqrt transformace; obr. 53a) a také mortalita „p“ a „b“ klesala signifikantně se stoupající koncentrací NO_3^- ($F_{[4,25]}=7,315$, $\alpha=0.000481$, sqrt transformace; obr. 53b).

a)



b)

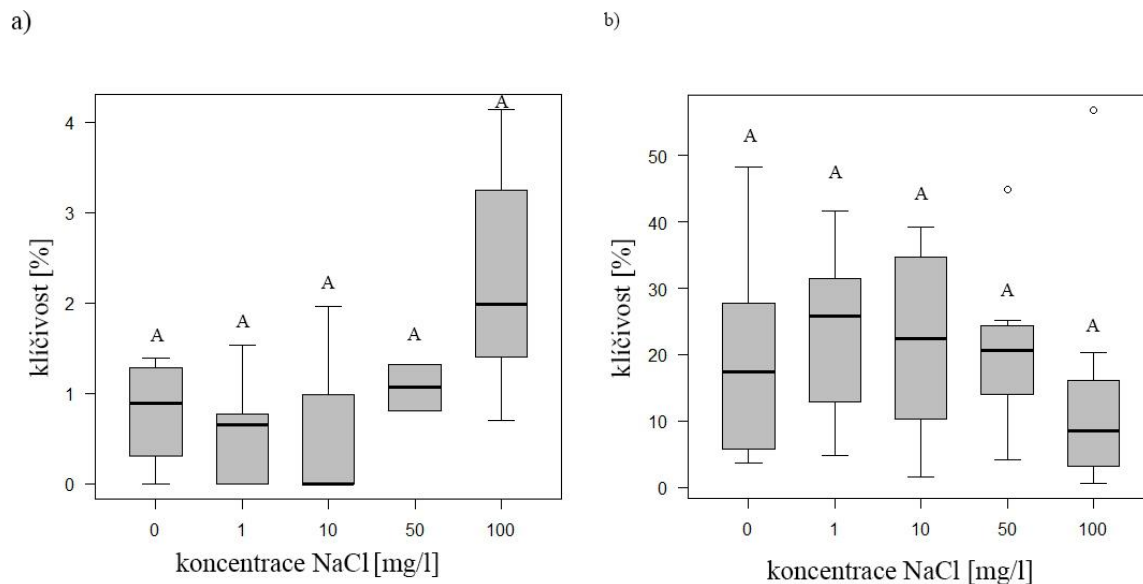


Obrázek 53: a. Klíčivost a b. mortalita *P. albida* v závislosti na koncentraci MgSO_4 v médiu. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti (mortalit), odlišná písmenna značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.7.3 NaCl

3.7.3.1 *Gymnadenia conopsea*

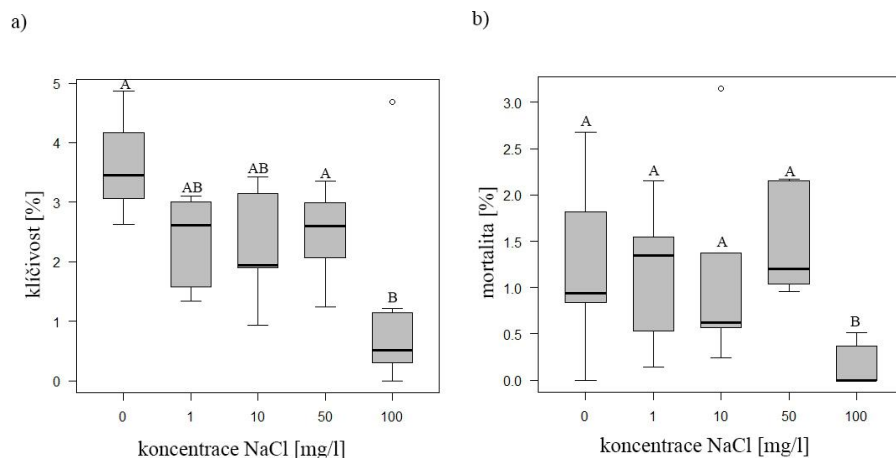
V tomto pokusu bylo napočítáno 2650 objektů na 18 miskách $n=2-5$ s průměrem $176,6 \pm 154$ objektů na misku. Klíčivost ($F_{[4,14]}=2,474$, $\alpha=0.0924$, obr. 54a) ani výskyt „dp“ a „db“ ($\chi^2(4) = 4.3262$, $p=0.3637$) se mezi variantami s různou koncentrací NaCl_2 nelišily. Tento pokus byl silně kontaminován. Kvůli kontaminacím byl pokus byl opakován. Ve druhém opakování bylo napočítáno 12106 objektů na $n=8-16$ misek na variantu s průměrem 252 ± 281 objektů na misku. Klíčivost zde nebyla ovlivněna přidáním NaCl_2 ($F_{[4,55]}=0.642$, $\alpha=0.635$, Obr. 54b) a stejně tak se náhodně vyskytovaly mrtvé „dp“ a „b“ ($F_{[4,55]}=1,902$, $\alpha=0.123$, sqrt transformace) a všechny mrtvé objekty ($F_{[4,55]}=2,042$, $\alpha=0.101$). U obou byl mírný trend poklesu se stoupající koncentrací NaCl . Kontrola k tomto pokusu je uvedena v kapitole o klíčení *G. conopsea* v závislosti na koncentraci NO_3^- jako čtvrté opakování (viz kapitola [3.1.4.1 *Gymnadenia conopsea* agg.](#)) a je zde zobrazena její N0 varianta.



Obrázek 54: Klíčivost *G. conopsea* na médiích s různou koncentrací NaCl, a. starší pokus, b. novější pokus. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.7.3.2 *Pseudorchis albida*

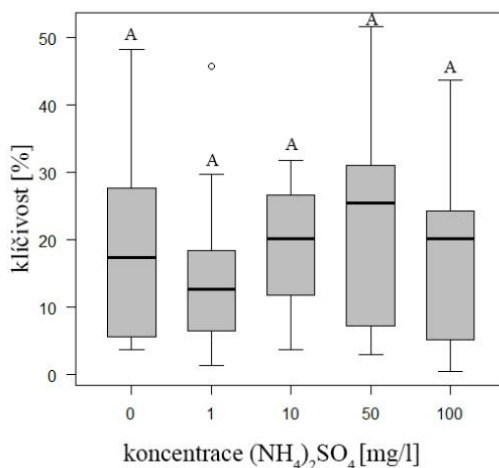
V tomto pokusu bylo napočítáno 13834 objektů na $n = 5-7$ (N0:7; N1:6; N10:5; N50:6; N100:7) misek na variantu a průměrem 446 ± 344 objektů na misku. Se zvyšující koncentrací NaCl v médiu se klíčivost spíše snižovali, ale pouze při koncentraci NaCl 100 mg/l byla klíčivost významně snížena oproti kontrole bez NaCl. ($F_{[4,26]} = 4,764$ $\alpha = 0,00511$, sqrt transformace, obr. 55a). Varianta s nejvyšší koncentrací NaCl měla také významně nejvyšší mortalitu „dp“ a „db“ ($F_{[4,26]} = 5,905$ $\alpha = 0,00161$, sqrt transformace, obr. 55b).



Obrázek 55: a. Klíčivost a b. mortalita *P. albida* v závislosti na koncentraci NaCl v médiu. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti (mortalit), odlišná písmena značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.8 Vliv NH_4^+ na klíčení a růst protokormů *Gymnadenia conopsea*

V tomto pokusu bylo napočítáno 17288 objektů na $n=13-18$ misek na variantu s průměrem 283 ± 421 objektů na misku. Klíčivosti se mezi variantami s různou koncentrací $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nelišily ($F_{[4,68]}=0,772$ $\alpha=0.547$). Mortalita „dp“ a „db“ se vyskytovaly mezi variantami dusičnanové řady náhodně ($F_{[4,68]}=1,204$ $\alpha=0.317$) stejně tak jako mortalita všech objektů ($F_{[4,68]}=0,562$ $\alpha=0.691$), vše bez zjevného trendu. Kontrola k tomuto pokusu je uvedena v kapitole o vlivu klíčivosti semen *G. conopsea* na různé koncentrace NO_3^- jako čtvrté opakování (viz kapitola [3.1.4.1 *Gymnadenia conopsea* agg.](#)), a je zde zobrazena její N0 varianta (Obr. 56)..



Obrázek 56: Klíčivost *G.conopsea* v závislosti na koncentraci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v médiu. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

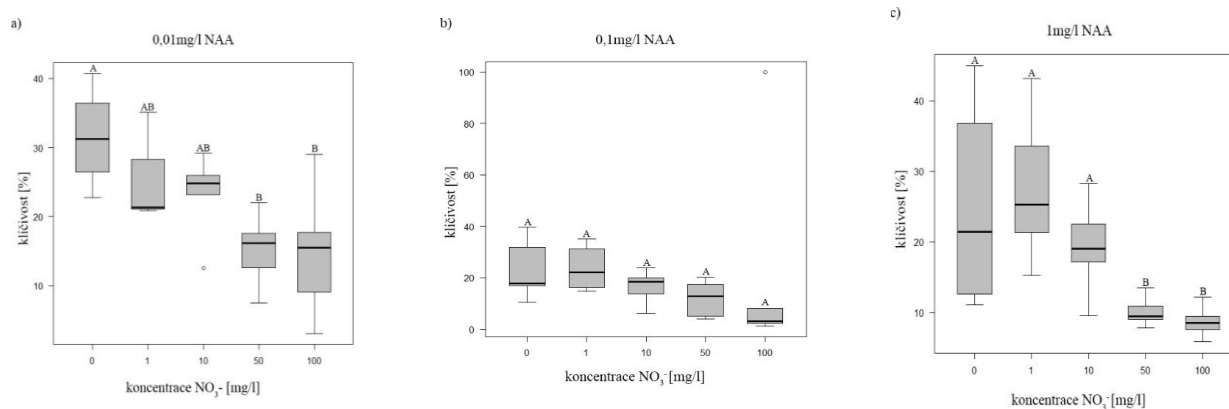
3.9 Vliv fytohormonů na inhibiční efekt NO_3^-

3.9.1 Vliv auxinů na inhibiční efekt NO_3^-

3.9.1.1 Vliv NAA na *Gymnadenia conopsea*

V tomto pokusu bylo napočítáno 15861 objektů na $n=3-9$ s průměrem na misku 180 ± 256 objektů. V pokusu byly použity tři různé koncentrace NAA přidané do média. Rozdíly mezi variantami u

nejnižší koncentrace NAA byly průkazné ($F_{[4,21]}=5,874$, $\alpha=0,00247$; obr. 57a), s trendem podobným jako u inhibičního efektu NO_3^- . Se zvyšující se koncentrací NAA docházelo k oslabení inhibičního efektu NO_3^- a snižování rozdílů mezi variantami s různou koncentrací NO_3^- na střední koncentraci NAA (0,1mg/l) tyto rozdíly byly signifikantní ($F_{[5,27]}=6,517$, $\alpha=0,000429$; obr. 57b), ale na nejvyšší koncentraci NAA (1mg/ml) již tyto rozdíly nebyly průkazné ($\chi^2_{(4)} = 7.6299$, $p = 0.1061$; obr. 57c).



Obrázek 57: Vliv NO_3^- na klíčení *G. conopsea* po přidání a. 0,01mg/l, b. 0,1 mg/l a c. 1mg/l NAA do média. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

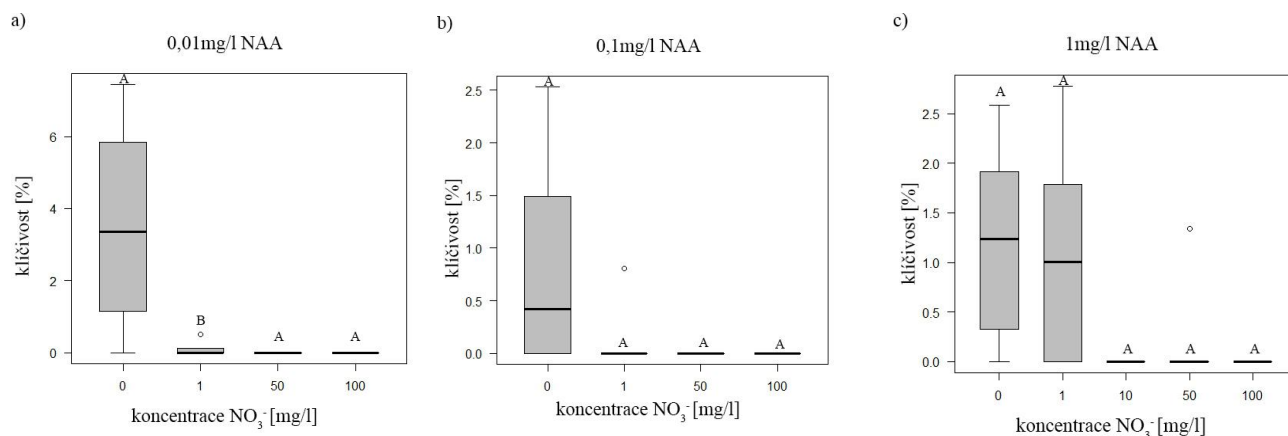
NAA indukovala klíčení na variantách na kterých bez ní tento druh již neklíčí, jako optimální koncentrace se zdá 0,01mg/l.

Ve variantě s nejnižší koncentrací NAA (0,01mg/l) se mezi variantami dusičnanové řady mortalita „dp“ a „db“ nelišila ($F_{[4,21]} = 1.096$, $\alpha=0.384$), ani nevykazovala žádný trend. Varianta s 0,1 $\mu\text{g/l}$ NAA měla mortalitu „dp“ a „db“ největší na variantách dusičnanové řady s nejnižší koncentrací NO_3^- ($F_{[4,24]}=4.31$, $\alpha=0.00908$). Ve variantě s 1 $\mu\text{g/l}$ NAA se výskyt „dp“ a „db“ mezi variantami dusičnanové řady signifikantně lišil ($F_{[4,27]} = 19.35$, $\alpha=1.3 \times 10^{-7}$).

3.9.1.2 Vliv NAA na *Pseudorchis albida*

V tomto pokusu bylo napočítáno 21103 objektů na $n = 3-9$ miskách na variantu s průměrem 257.3 ± 686.6 objektů na misku. Kontrola k tomuto pokusu je v kapitole o vlivu NO_3^- na klíčivost *P. albida* (viz [3.3.5 Pseudorchis albida](#)). Nejvyšší klíčivosti byly na variantě N0 za současného

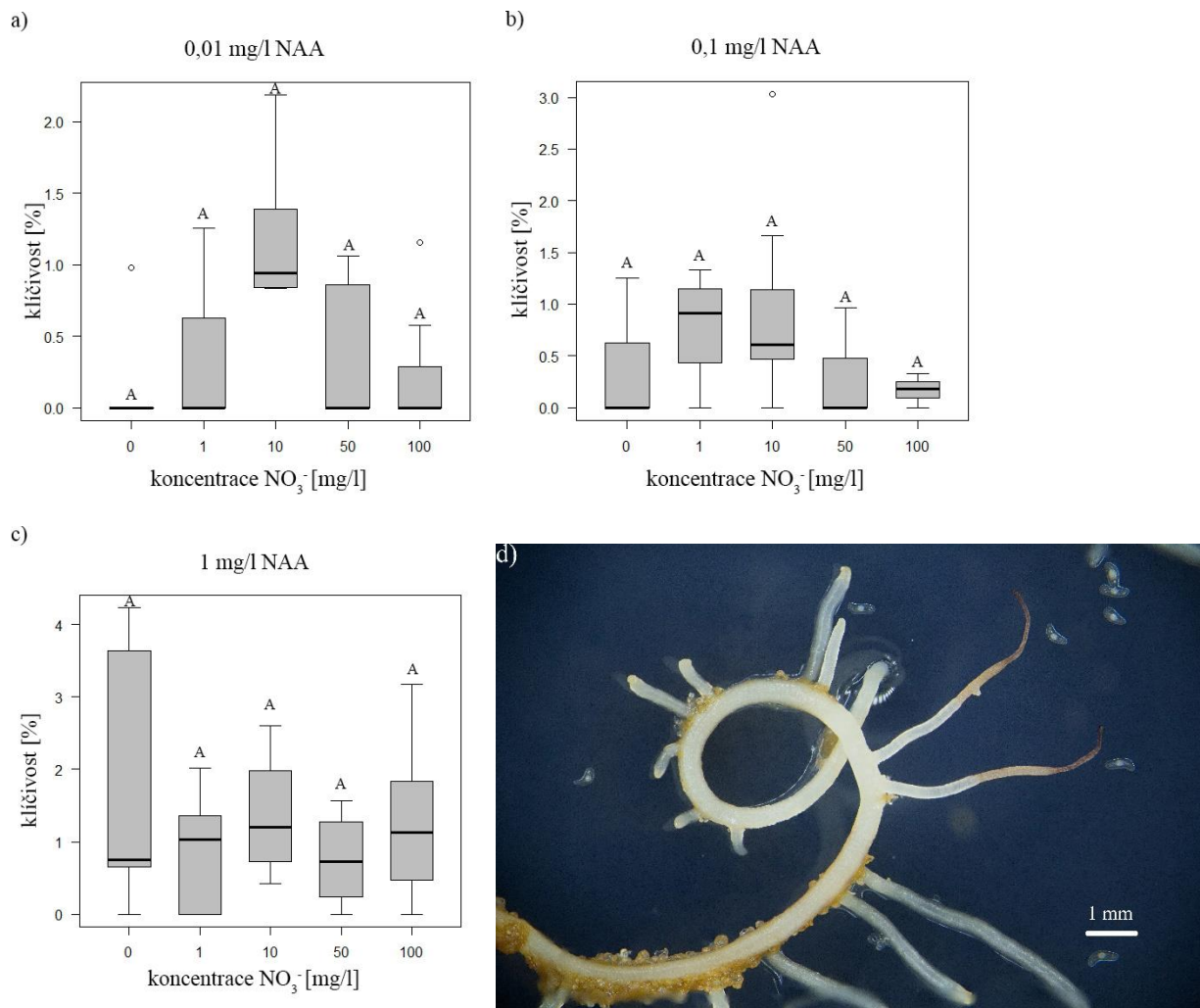
přidání 0,01mg/l NAA. Zde byla klíčivost nejvyšší a rozdíly mezi variantami byly průkazné ($\chi^2_{(3)} = 18.506$, $p = 0.0003458$; obr. 58a). U varianty N0 za současného přidání 0,1 mg/l NAA byla klíčivost nižší ($\chi^2_{(3)} = 7.9706$, $p = 0.04662$; obr. 58b) ale po přidání 1mg/l NAA se zase zvýšila a byla zde pozorována klíčivost i na variantě N1 ($\chi^2_{(4)} = 17.35$, $p = 0.001653$; obr. 58c). Objekty „dp“ a „db“ se vyskytovaly jen na variantách N0 za současného přidání 0,01mg/l NAA a na variantách N0 a N1 za současného přidání 1mg/l NAA.



Obrázek 58: Vliv NO₃⁻ na klíčivost *P.albidus* za současného přidání a. 0,01mg NAA/l, b. 0,1 mg NAA/l, c. 1mg NAA/l. Boxploty znázorňují mediány klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty. ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test nebo Kruskal-Wallis test).

3.9.1.3 Vliv NAA na *Orthilia secunda*

Jediná testovná rostlina z čeledi Ericaceae, byla testována bez existující kontroly. V tomto pokusu bylo napočteno 12621 objektů na n=2-13 misek na variantu a průměrem 160±498 objektů na misku. Vliv přidání 0,01mg/l NAA mezi variantantami dusičnanové řady nebyl průkazný ($F_{[4,24]} = 0.628$, $\alpha = 0.647$; obr. 59a.), stejně tak jako po přidání 0,1mg/l NAA ($F_{[4,21]} = 1.39$, $\alpha = 0.271$; obr 9b.) a 1mg/l NAA ($F_{[4,21]} = 1.027$, $\alpha = 0.417$; obr 9c). Vzhledem k tomu že tato rostlina netvoří protokormy ale jiné mykoheterotrofní útvary (obr 59d) nebyly hodnoceny kategorie „p“, „b“, „dp“ ani „db“ ale pouze semena, vyklíčené objekty a zhnědlé vyklíčené objekty. Mrtvý vyklíčený objekt byl pozorován jenom jeden.



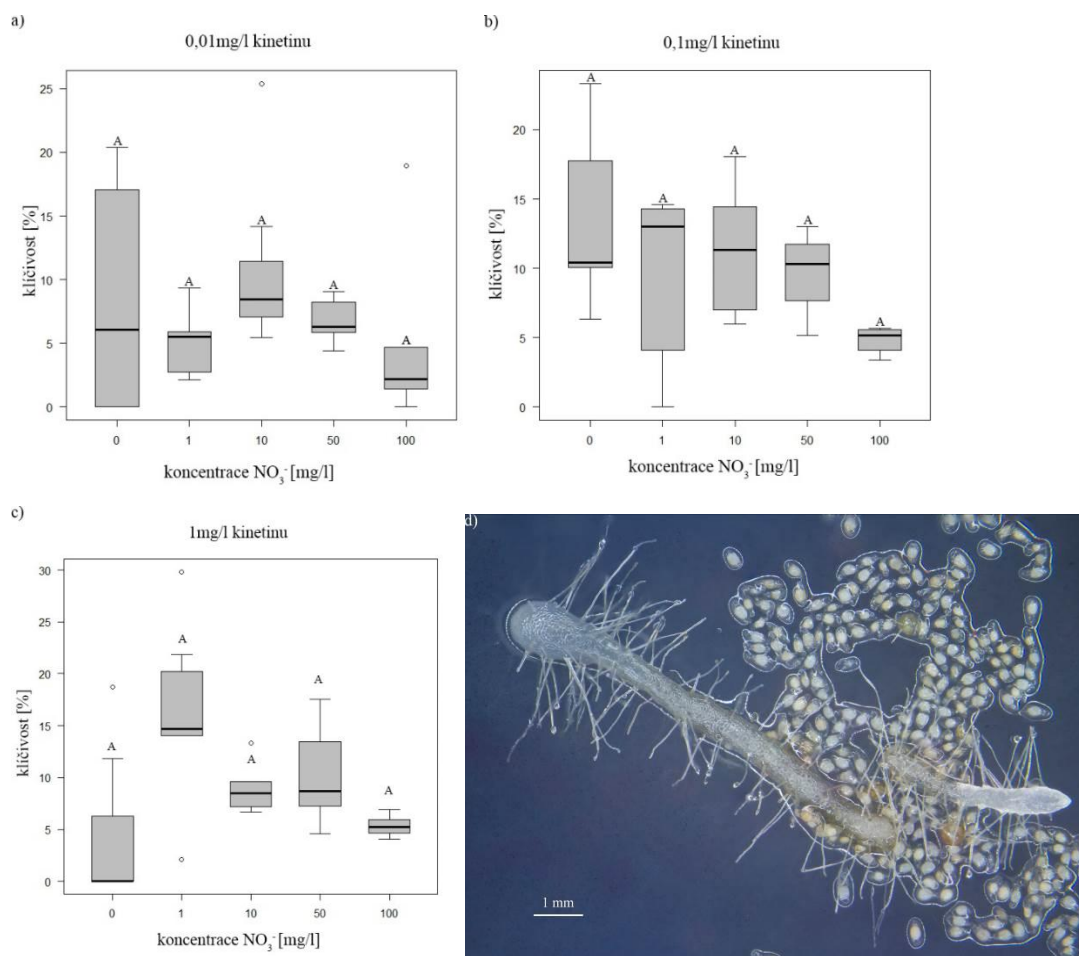
Obrázek 59: Vliv NO_3^- na klíčivost *O. secunda* za současného přidání . 0.01mg/l NAA, b. 0,1 mg/l NAA a c. 1mg/l NAA d. vyklíčená *O. secunda*. Boxploty znázorňují mediány klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.9.2 Vliv cytokininů na inhibiční efekt NO_3^-

3.9.2.1 Vliv kinetinu na *Gymnadenia conopsea*

V tomto pokusu bylo napočítáno 20574 objektů na $n=3-5$ miek na variantu s průměrem 411 ± 903 objektů na misku. Vliv přidání 0,01 mg/l ($\chi^2_{(4)} = 5.0629$, $p = 0.2809$; obr. 60a) a 0,1 mg/l ($F_{[4,23]} = 1.978$, $\alpha=0.132$; obr 60b.) kinetinu na inhibiční efekt NO_3^- na klíčivost *Gymnadenia conopsea* nebyl průkazný. Přidání 1mg/l kinetinu způsobilo sice průkazný rozdíl ($\chi^2_{(4)} = 13.802$, $p = 0.007956$), ale párový test mezi variantami rozdíl nenašel (obr. 60c). Byl zde ale patrný trend indukce klíčivosti kinetinem na inhibičních koncentracích NO_3^- , přičemž jako optimální se jeví

koncentrace 0,1mg/l kinetinu v médiu. Na variantě s 1mg/l kinetinu byly protokormů nápadně protažené (obr. 60d). Na všech 3 variantách s přidáním kinetinu byly mrtvé protokormy a bezvláskaté protokormy (0,01mg/l: $\chi^2_{(4)} = 6.945$, $p = 0.01388$; 0,1mg/l: $F_{[4,27]} = 2.337$, $\alpha=0.0808$; 1mg/l: $F_{[4,29]} = 2.143$, $\alpha=0.101$) stejně jako špatné semena (0,01mg/l: $F_{[4,23]} = 1.466$, $\alpha=0.245$; 0,1mg/l: $F_{[4,27]} = 1.872$, $\alpha=0.144$; 1mg/l: $F_{[4,29]} = 2.154$, $\alpha=0.0994$) rozloženy v rámci variant náhodně. Kontrola viz [kapitola 3.1.4.](#)

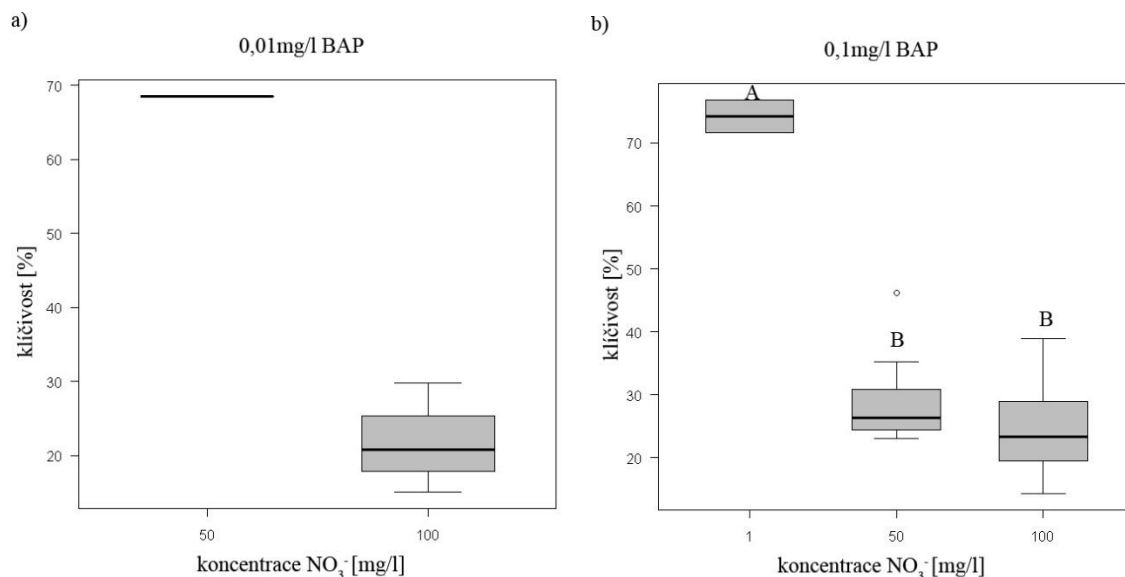


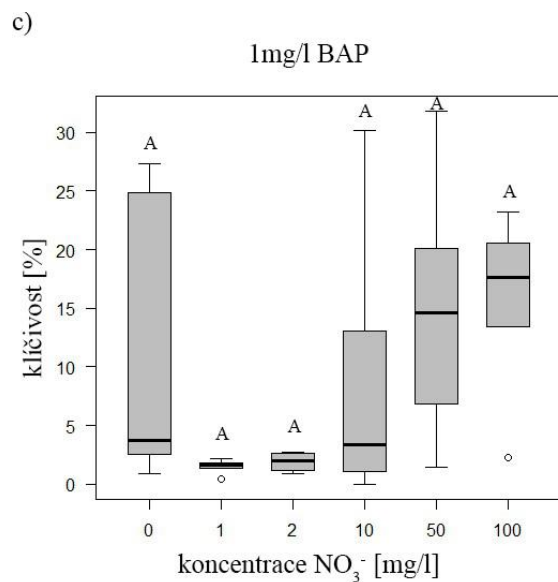
Obrázek 60: Vliv NO_3^- na klíčivost *G. conopsea* za současného přidání a. 0,01mg/l, „b“.0,1mg/l, c. 1mg/l kinetinu d. fotografie prodlouženého protokormu na variantě s 1mg/l kinetinu. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivostí, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.9.2.2 Vliv BAP na *Gymnadenia conopsea*

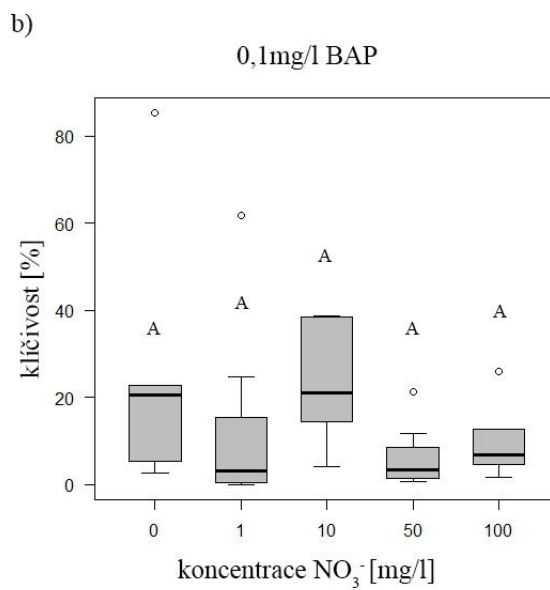
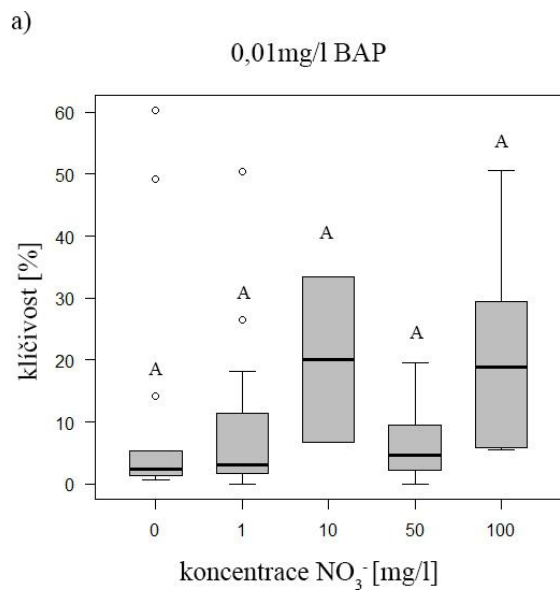
V tomto experimentu bylo napočítáno 23427 objektů na $n=5-13$ miskách na variantu s průměrem 215 ± 593 objektů na misku. Vliv NO_3^- za současného přidání 0,01 mg/l BAP v tomto experimentu nešlo statisticky vyhodnotit, protože zde nebyl dostatek opakování, je zde jen vidět klesající trend klíčivosti (obr. 61a). Vliv NO_3^- za současného přidání 0,1 mg/l BAP byl vysoce signifikantní ($F_{[2,17]} = 38.02$, $\alpha = 5,31 \times 10^{-7}$; obr. 61b) s výrazně nižší klíčivostí na variantách s 50 a 100 mg/l NO_3^- jak na 1 mg/l NO_3^- . Klíčivosti na variantách s různou koncentrací NO_3^- za současného přidání 1 mg/l BAP byly rozmístněny náhodně ($F_{[5,28]} = 0,27$ $\alpha = 0.926$; obr. 61c). Mortalita všech mrtvých objektů se na variantách s 0,01 mg/l BAP se kvůli malému počtu opakování nedalo statisticky vyhodnotit, na variantách s BAP 0,1 mg/l ($F_{[2,17]} = 0,589$ $\alpha = 0.566$) a s BAP 1 mg/l ($\chi^2_{(5)} = 3.6794$, $p = 0.5964$) byly mrtvé objekty rozmístněny náhodně.

Stejný pokus byl kvůli početným kontaminacím opakován ještě jednou. Napočítáno zde bylo 29065 objektů na $n=2-13$ miskách na variantu s průměrem 218 ± 589 objektů na misku. Zde nebyla závislost klíčivosti na přidaném NO_3^- za současného přidání 0,01 mg/l BAP ($F_{[4,35]} = 0,898$ $\alpha = 0.475$; obr. 62a), 0,1 mg/l BAP ($F_{[4,27]} = 1,865$ $\alpha = 0.146$; obr. 62b), ani 1 mg/l BAP ($\chi^2_{(4)} = 0.47162$, $p = 0.9762$; obr. 62c) průkazná. Mortalita „dp“ a „db“ se v rámci variant dusičnanové řady na koncentracích BAP 0,01 mg/l ($F_{[4,35]} = 0,306$ $\alpha = 0.872$), a BAP 1 mg/l ($F_{[4,30]} = 0,479$ $\alpha = 0.751$) nelišila ani nevklazovali žádný trend, ale průkazně se lišila u variant s BAP 0,1 mg/l ($F_{[4,27]} = 3,36$ $\alpha = 0.0235$; data transformována funkcí sqrt; obr. 62d). Kontrola k tomuto pokusu je v kapitole 3.1.4.1 jako druhé opakování.

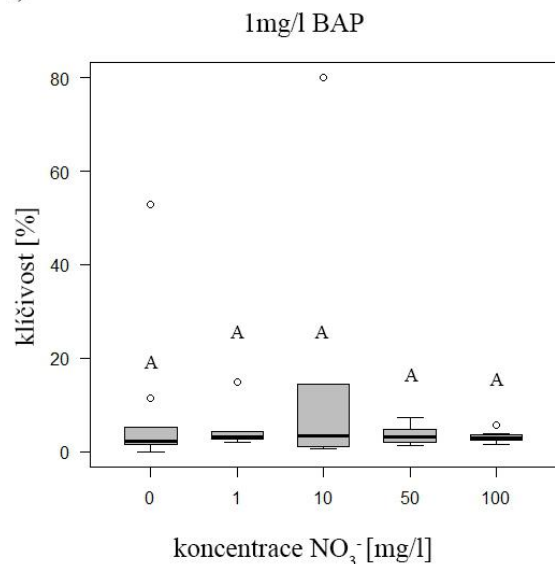




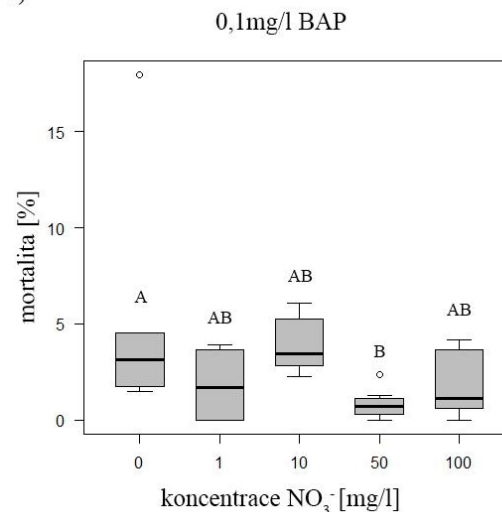
Obrázek 61: Vliv NO₃⁻ na klíčivost *G. conopsea* za současného přidání a. 0,01mg/l, b.0,1mg/l, c. 1mg/l BAP, starší experiment. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, stejná písmena značí statisticky stejné varanty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).



c)



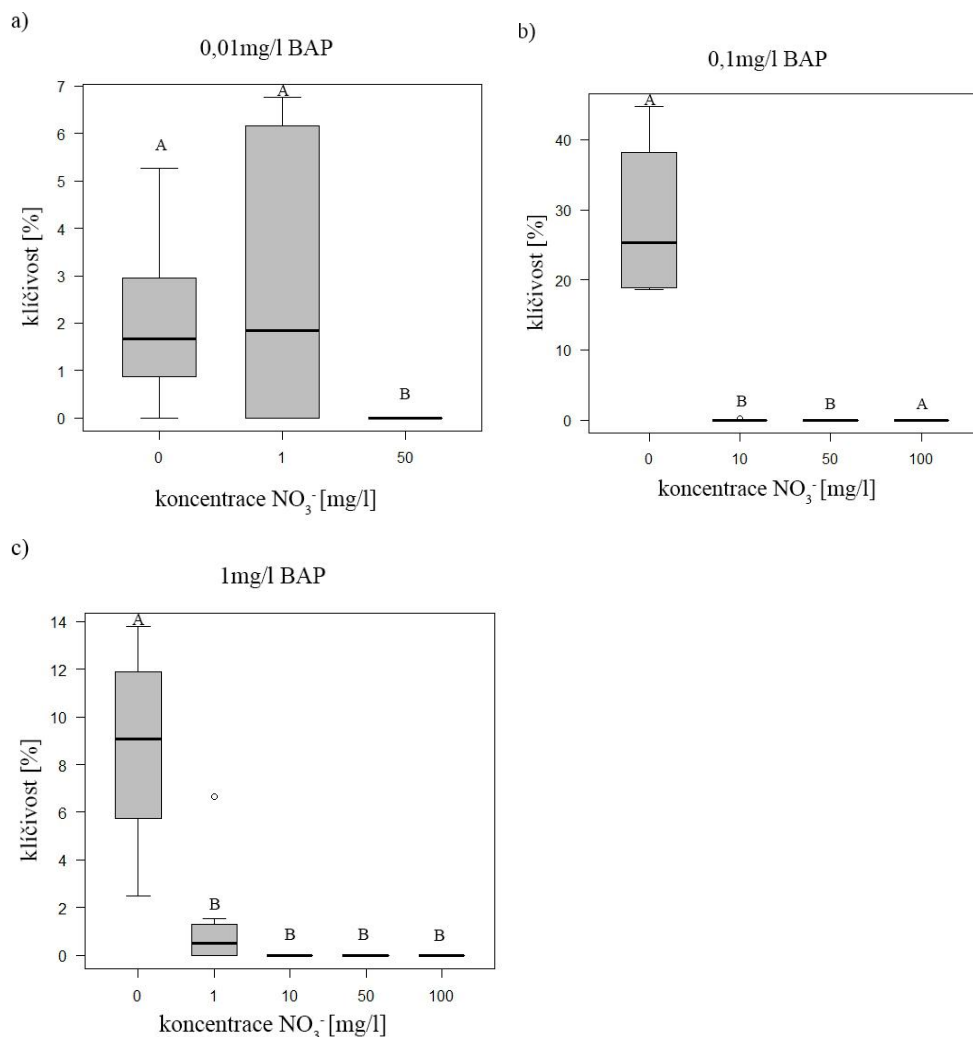
d)



Obrázek 62: Vliv NO₃⁻ na klíčivost *G. conopsea* za součastného působení a. 0,01 mg/l BAP, b. 0,1mg/l BAP, c. 1mg/l BAP, d. mortalita „p“ a „b“ na variantě s 0,1mg/l BAP. Novější experiment. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivostí, stejná písmena značí statisticky stejné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test).

3.9.2.2 Vliv BAP na *Pseudorchis albida*

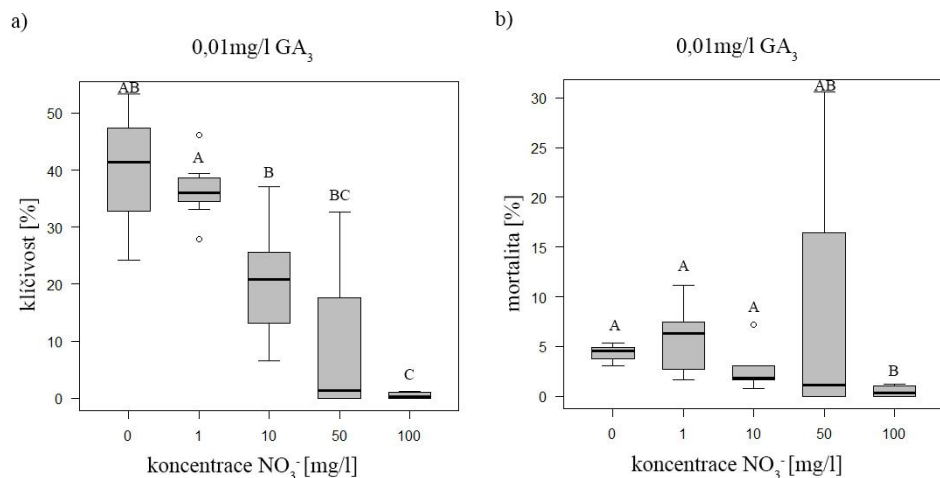
V tomto pokusu bylo napočítáno 12547 objektů na n=2-16 misek na variantu s průměrem 95±344 objektů na misku. Kontrola k tomuto pokusu je druhé opakování pokusu s *P.albida* na dusičnanové řadě (viz [3.1.8 Pseudorchis albida](#)). Mezi variantami dusičnanové řady a s přidáním 0,01 mg BAP/ l byly rozdíly také signifikantní ($\chi^2_{(2)} = 16.903$, $p = 0.0002136$; obr. 63a), stejně jako po přidání 0,1 mg BAP/l ($\chi^2_{(3)} = 24.105$, $p = 2,375 \times 10^{-5}$; obr. 63b) a po přidání 1mg BAP/l ($\chi^2_{(4)} = 30.549$, $p = 3.784 \times 10^{-6}$; obr. 63c). Nejvyšší klíčivosti byly na dusičnanové řadě za součastného přidání 0,1 mg BAP. Vyšší klíčivosti než na kontrolní variantě byly i na dusičnanové řadě za součastného přidání 1 mg BAP, a naopak nižší byly jen na dusičnanové řadě za součastného přidání 0,01 mg BAP. Zaznamenány byly jen 2 „dp“ na variantě N0 s přidáním 1mg/l BAP.



Obrázek 63: Vliv NO₃⁻ na klíčivost *P. albida* za součastného působení a. 0,01 mg/l BAP, b. 0,1mg/l BAP, c. 1mg/l BA. Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky rozdílné varianty. ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test nebo Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

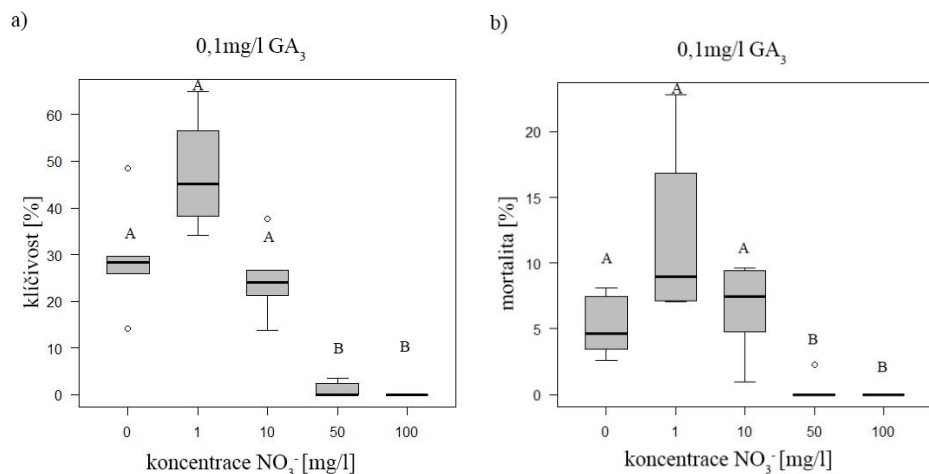
3.9.3 Vliv GA₃ na *Gymnadenia conopsea*

V tomto pokusu bylo napočítáno 17692 objektů na $n=3-12$ s průměrem $146,214 \pm 553,287$ objektů na misku. Kontrola pro tento pokus viz [kapitola 3.1.4.1](#). Klíčivosti se mezi variantami dusičnanové řady za součastného přidání 0.01 GA₃ průkazně snižovali se zvyšující se koncentrací NO₃⁻ ($\chi^2_{(4)} = 18.499$, $p = 0.0009856$, obr. 64a) a průkazný rozdíl byl i ve výskytu „dp“ a „db“ mezi variantami dusičnanové řady ($\chi^2_{(4)} = 12.612$, $p = 0.01334$; obr. 64b).



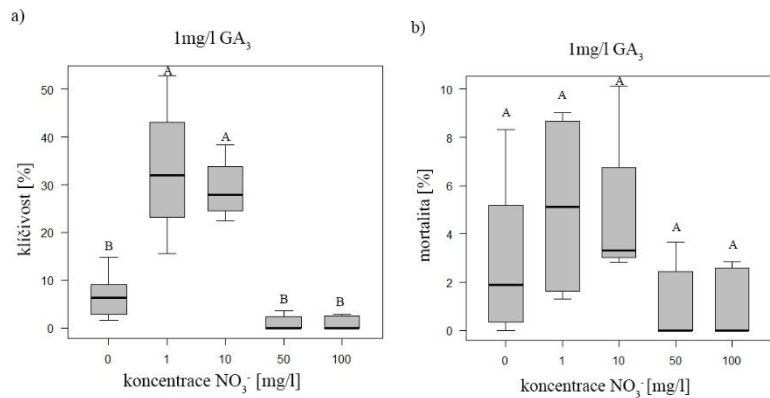
Obrázek 64: Vliv NO_3^- na a. klíčivost a b. mortalitu „p“ a „b“ *G. conopsea* za současněho přidání 0,01 mg/l GA_3 . Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test nebo Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

Klíčivosti mezi variantami dusičnanové řady za současněho přidání 0,1 GA_3 klesaly signifikantně, s optimem na koncentraci N1 ($\chi^2_{(4)} = 19.756$, $p = 0.0005581$, obr. 65a). Podobné snižování bylo zlatelné i u mortality „dp“ a „db“ ($\chi^2_{(4)} = 18.214$, $p = 0.001121$, obr. 65b).



Obrázek 65: Vliv NO_3^- na a. klíčivost a b. mortalitu „p“ a „b“ *G. conopsea* za současněho přidání 0,1 mg/l GA_3 . Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky rozdílné varianty ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test nebo Kruskal-Wallis, Pairwise Wilcoxon test).

Klíčivosti se mezi variantami dusičnanové řady snižovali signifikantně i po přidání 1mg/l GA_3 do duskové řady ($F_{[4,27]}=36.56$, $\alpha=1.55 \times 10^{-5}$, sqrt transformace, Obr. 66a), zde byla klíčivost na variantě N0 srovnatelná s N50 a N100. Mortalita „dp“ a „db“ se mezi variantami dusičnanové řady nelišila ($F_{[4,27]}=2.629$, $\alpha=0.0564$, Obr. 66b).



Obrázek 66: Vliv NO_3^- na a. klíčivost a b. mortalitu „p“ a „b“ *G. conopsea* za současného přidání 1 mg/l GA_3 . Boxploty znázorňují mediány hodnot klíčivosti, odlišná písmena značí statisticky rozdílné varianty. ($\alpha = 0,05$; ANOVA, TukeyC test nebo Pairwise Wilcoxon test).

4. Diskuse

4.1. Efekt NO_3^- na klíčivost vybraných druhů

Klíčivost 8 z 10 testovaných druhů se signifikantně snižovala se zvyšující se koncentrací NO_3^- v médiu a to i v případě že byl pokus zopakován s jinou várkou sbíranou v jiném roce. Mnohé práce naznačují že NO_3^- je pro klíčení zejména temperátních orchidejí inhibiční. Třeba Eidberg (1970) pozoroval ze stoupající koncentrací NH_4NO_3 klesání klíčivosti *Orchis sancta* a podobný pokles pozorovala Rassmussen (1995) při symbiotickém výsevu *D.majalis* kde používala koncentrace 0-5 mM NO_3^- . Na druhou stranu se i temperátní druhy orchidejí pěstují na médích s NO_3^- (např. Ponert et al. 2011, Michl 1988) a pozorován byl, sice jen velice zřídka, také stimulační efekt NO_3^- . Přidání 826 mg $\text{Ca}(\text{NO}_3^-)_2$ do litru média (tj. 292,01 mg NO_3^-) doporučují Ichihashi et Yamashita (1977) pro pěstování *Bletilla striata* a Dijk et Eck (1995) pozorovali na protokormech kultivovaných *in vitro* na 0-12mM NH_4NO_3 , negativní efekt anorganického N na *D.majalis*, *D.incarnata* a *D.maculata* ale nerozlišují konkrétní formu N která byla za pozorovaný efekt odpovědná. Média používaná v této práci měla koncentrace NO_3^- v rozpětí 16,129 μM (1mg) – 1,6129mM (100mg), což jsou výrazně nižší koncentrace než ve všech ostatních pracích zkoumající efekt NO_3^- . I na takto nízké koncentrace rostliny v této práci reagovaly i vysoce průkaznými rozdíly. Zde použité koncentrace NO_3^- odpovídají koncentracím, které se vyskytují v přírodě v půdním roztoku. Na rozdíl od ostatních prací, které se zabývají vlivem koncentrací NO_3^- , které se přirozeně nevyskytují, tak naše výsledky umožňují spekulovat o možném vlivu NO_3^- na orchideje v přirozeném prostředí. Jednotlivé testované druhy však reagovali různě silnou inhibicí. Tyto rozdíly by se daly vysvětlit rozdílnými habitaty které jednotlivé druhy osídlují. Protože však přesné údaje o koncentracích NO_3^- na lokalitách testovaných orchidejí prakticky chybí, využijeme k prohnání Ellenbergovy indikační hodnoty (EIH), které jsou na ordinační škále od 1 do 9 a představují hodnoty teoretického ekologického optima zjištěného z terénní zkušenosti (Zelený 2012). Existují různé klasifikace EIH pro různé části Evropy. Kromě základních německých EIH (Ellenberg et al. 1991) existují také EIH upravené pro Velkou Británii (Hill et al. 1999) a Itálii (Pignatti 2005; tab. 10). Semena *A.laxiflora* použitá v této práci pocházejí z Itálie (Kampánie, Cilento, Stio), a proto se podržíme hodnoty EIH pro Itálii. Rozdílné hodnoty pro *P. albida* mohou být způsobeny tím, že v Itálii se vyskytuje *P. albida subsp. tricupsis* (Jersáková et

al. 2011), zatímco v Německu a Velké Británii roste *P. albida subsp. albida*. V této práci byla použita *subsp. albida*, a proto budu dále používat hodnoty pro Německo a Velkou Británii. Do skupiny *Ophrys tenthredinifera sensu lato*, patří i v této práci testovaný druh *O. neglecta* pro který samotný nejsou uvedeny EIH. Použity jsou proto hodnoty pro celou skupinu.

Tab. 10 Různé EIH pro jednotlivé testované druhy

druh	EIH pro Německo (Ellenberg et al. 1991)	EIH pro Velkou Británii (Hill et al. 1999)	EIH pro Itálií (Pignatti 2005)
<i>A. laxiflora</i>	2	2	5
<i>A. morio</i>	3	3	3
<i>D. majalis</i>	3	3	-
<i>G. conopsea</i>	3	3	3
<i>H. robertianum</i>	-	-	2
<i>N. rhelicanii</i>	2	-	2
<i>O. neglecta</i>	-	-	3
<i>P. albida</i>	2	2	4

Zdá se že naše zjištění s EIH korelují. Nejsilnější inhibiční efekt byl pozorován u *Pseudorchis albida*, který roste na oligotrofních až mezotrofních horských stanovištích ([Jersáková et al. 2011](#)) dusíkem chudých s obsahem celkového N v půdě v rozmezí 0,44-1,06 % (České lokality, C/N analýza; [Jeřábková 2006](#)). Druhý nejsilnější inhibiční efekt byl pozorován u *Gymnadenia conopsea* což je druh mezofilních luk ([Delforge 2006](#)). Další druhy osídlující převážně mezofilní louky jako *Anacamptis morio* a *Dactylorhiza majalis* byly také dosti intenzivně inhibovány NO_3^- . Nejslabší i když stále znatelná inhibice byla pozorována u *Himantoglossum robertianum*, *Ophrys neglecta* a *Anacamptis laxiflora*. První dva druhy se vyskytují i na úživnějších suchých habitatech a poslední zmiňovaný můžeme najít i na úživnějších mokřadech ([Delforge 2006](#), [Trainito 2016](#)).

Tato zjištění vedou k závěru že pozorovaná inhibice klíčení semen NO_3^- není ojedinělá, ale vyskytuje se u mnoha druhů a její síla pozitivně koreluje s klesající úživností stanoviště. *Pseudorchis albida*, který byl NO_3^- inhibován nejsilněji v poslední době ubývá bez zjevných příčin

a je hodnocen v mnoha oblastech Evropy jako silně ustupující nebo silně až kriticky ohrožený ([Tsiftis et Antonopoulos 2011](#), [Jersáková et al. 2011](#)). Pokud by k inhibici klíčení semen NO_3^- docházelo i v přirozených podmínkách, mohl by být jedním z faktorů způsobujících ústup *P. albida* nárůst obsahu N v prostředí. Vlivem hnojení a zemědělských ploch se množství dostupného N v prostředí výrazně zvyšuje a stoupá koncentrace NO_3^- (např. [Ju et al. 2006](#), [Ledox et al. 2007](#)). Také úbytek jedinců *D. majalis* na louce po hnojení, který Dijik et Olf (1994) vysvětlovali vytlačáním *D. majalis* konkurenčně silnějšími druhy by mohl být způsoben nárůstem koncentrace NO_3^- v půdě.

U druhů *Nigritella rhelicani*, *Gymnadenia conopsea* a *G. densiflora* nebyl inhibiční efekt pozorován. U *N. rhelicani* byla klíčivost velice nízká v celém pokusu (setiny procent) a „p“ na nejvyšších koncentracích NO_3^- v médiu byla nápadně menší než na médiu bez NO_3^- , ale nebylo. V případě *G. conopsea* a *G. densiflora* došlo u části pokusného materiálu během jeho kultivace ve tmě k jeho vyndání ven na světlo neopatrným kolegou a při následné kultivaci v místnosti s 20°C teplota kolísala a pohybovala se dlouhodobě kolem 27°C. Všechny materiál který vykazoval odlišný efekt v závislosti na NO_3^- v médiu byl vystaven těmto změněným teplotním podmínkám. Experimenty které vykazovaly odlišnosti byly také ukládány nově do plastových krabic které nahradily předtím používané papírové. Papírové krabice sice pravděpodobně umožňovali lepší cirkulaci plynů a nebyly utěsněny, nabízejí ale prostor pro šíření roztočů (např. rod *Tyrophagus*, kterému jsme čelili) či můžou fungovat jako substrát pro houby. Semena byla v těchto experimentech použita odděleně z různých stanovišť a bylo použito různých variant média, zde je chyba vysoce nepravděpodobná. Bez dalších experimentů je ale možné jen hádat, co zapříčinilo takto odlišnou odpověď.

Celkově ale výsevové experimenty ukazují že NO_3^- v médiu inhibuje klíčení semen širokého spektra evropských orchidejí a že tato pozorovaná inhibice koreluje s úživností jejich přirozeného stanoviště.

4.2 Efekt fytohormonů na inhibici klíčení semen orchidejí způsobenou NO_3^-

Výsledky této práce ukazují, že inhibiční efekt NO_3^- na klíčení lze oslabit aplikací auxinů, cytokininů i giberelinů. Obecně se při *in vitro* kultivaci orchidejí používají nejvíce cytokininy,

především kinetin ([Ponert et al. 2013](#)). Jeho pozitivní efekt na klíčení semen popisuje řada prací, např. ([Steele 1996](#); [Ponert 2009](#); [Miyoshi et Mii 1998](#), [Harvais 1982](#)). Podobný efekt byl pozorován i u benzyladeninu (BA; [Van Waes et Debergh 1986](#)). Cytokininy však mohou také inhibovat klíčení nebo nemusí mít na klíčivost žádný efekt ([Wilkinson et al. 1994](#), [Borris et Voight 1986](#)), což může naznačovat, že efekt cytokininů je druhově specifický, nebo závislý na koncentraci. Používané koncentrace se pohybují kolem 0,5- 5 mg/l (např. [Van Waes et Debergh 1986](#), [Steele 1996](#)).

V této práci indukovaly kinetin i BAP klíčení *G. conopsea* také na inhibičních koncentracích NO_3^- , na kterých bez těchto fytohormonů neklíčila. BAP kromě toho zvyšoval klíčivost *P. albida*, ale pouze na variantě N0. Na inhibičních koncentracích NO_3^- klíčení tohoto druhu neindukoval. Je proto možné, že v jiných pracích pozorované rozdílné účinky cytokininů na klíčení semen orchidejí by mohly být způsobeny nejen odlišnou reakcí různých druhů, ale také odlišnými experimentálními podmínkami, kdy jednotlivé práce používají odlišná média a různými obsahy NO_3^- . V tomto kontextu je zajímavé, že klíčivost *G. conopsea* se v této práci vlivem cytokininů nezvyšovala při všech koncentracích NO_3^- stejnou měrou (obr. 60). Zdá se tedy, že konkrétní účinek cytokininů opravdu závisí na koncentraci NO_3^- a že signály NO_3^- a cytokininů se navzájem ovlivňují.

Efekt auxinů na klíčení semen orchidejí se zdá být častěji inhibiční ([van Waes 1984](#), [Hadley et Harvais 1968](#), [Eiberg 1970](#)) než stimulační ([Wilkinson et al. 1994](#)), i když pozorovány byly oba.

V této práci NAA stimulovala klíčení *G. conopsea* také na inhibičních koncentracích NO_3^- , na kterých jinak *G. conopsea* neklíčila. Při všech testovaných koncentracích NAA byl ale stále patrný inhibiční efekt NO_3^- na klíčení a NAA jej patrně pouze oslabovala. Opět lze tedy spekulovat, že rozdílné reakce orchidejí na auxiny pozorované v literatuře by mohly mít souvislost s obsahem NO_3^- v kultivačním médiu. Optimální koncentrace NAA byla v této práci 0,01 mg/l a při jejích vyšších koncentracích již docházelo k relativnímu poklesu klíčivosti. Je tedy také možné, že při použití jiných koncentrací NAA by autoři výše citovaných prací dospěli k odlišným závěrům.

V případě giberelinů se na základě dostupných literárních údajů zdá, že na klíčení orchidejí nemají žádný efekt (např. [Borris et Voigt 1986](#), [Rasmussen 1995](#) a reference uvnitř) nebo klíčení dokonce inhibují ([Wilkinson et al. 1994](#)). V této práci GA_3 nezvyšovala klíčivost na nejvyšší inhibiční koncentraci NO_3^- N100, nicméně na nižších koncentracích NO_3^- ke zvýšení klíčivosti docházelo. Média pro in vitro kultivaci orchidejí obvykle obsahují vyšší koncentrace NO_3^- , než 100 mg/l ([Ponert et al. 2013](#) a citace uvnitř). Zdá se tedy možné, že výše citované práce nepozorovaly

žádný efekt giberelinů právě z důvodu přítomnosti vysokých koncentrací NO_3^- . Efekt GA_3 byl v této práci nelineárně závislý na koncentraci NO_3^- . Při koncentraci N0 byla optimální koncentrace GA_3 0,01 mg/l. Při koncentraci N1 už však byla optimální koncentrace GA_3 0,1 mg/l (obr. 65a). Toto zajímavé chování nelze na základě současných znalostí vysvětlit, nicméně poukazuje na to, že účinky NO_3^- a giberelinů se navzájem ovlivňují.

4.3. Vliv mykorhizních hub na inhibici klíčení semen orchidejí způsobenou NO_3^-

Klíčivosti byly v symbiotických výsevech *G.conopsea* celkově nižší než u asymbiotických výsevů, ale nesnižovaly se spolu s vzrůstající koncentrací NO_3^- . V případě izolátu B1 byla nejvyšší klíčivost na koncentraci N10, v případě izolátu Q414 dokonce na koncentraci N100. Tyto výsledky lze vysvětlit jen ztěží. Houby přijímají i NO_3^- ([Hawkins et al. 2000](#), [Johansen et al. 1993](#)) a v případě *Calluna vulgaris* bylo zjištěno že i když je médium zásobováno výhradně anorganickými formami N huba transportuje AMK do rostliny ([Sokolovski et al. 2002](#)). Bylo by tedy možné, že houby orchidejí odnímají NO_3^- a zásobují je aminokyselinami. Další možné vysvětlení by bylo skrze produkci fytohormonů mykorhizními houbami. Houby jsou schopné produkce cytokininů, auxinů i giberelinů ([Barker et Tagu 2000](#), [Tsavkelova et al. 2006](#)) a změny v obsahu fytohormonů byly opakovaně pozorovány v souvislosti s formováním jiných typů mykorhiz (shrnuto v [Ponert 2009](#)). Bylo by tedy možné také to, že mykorhizní houby indukovaly klíčení orchidejí dodáním fytohormonů. V tomto kontextu je zajímavé, že rozdíly mezi klíčivostmi *G. conopsea* v přítomnosti houby B1 silně připomínaly rozdíly v asymbiotických kulturách při koncentraci kinetinu 1 mg/l. Bez dalších experimentů ale nelze pozorované chování jednoznačně vysvětlit.

4.4 Vliv NO na klíčení semen orchidejí

Je možné, že inhibiční efekt NO_3^- na klíčení semen orchidejí by mohl být zprostředkován jinou formou N, která z NO_3^- vzniká v pletivech orchidejí. Prvním experimentem provedeným v této práci, který ukazuje na takovou možnost, je aplikace wolframanu, inhibitoru nitrátreduktázy ([Xiong 2012](#)). Přidání wolframanu do média způsobilo potlačení inhibičního efektu NO_3^- na klíčení semen *G. conopsea*. Z těchto výsledků lze usoudit, že pro inhibiční efekt NO_3^- je nutná akce nitrátreduktázy (NR) a za tento efekt budou pravděpodobně odpovědné jiné formy N vzniklé

metabolismem NO_3^- . Nutno však poznamenat, že wolframian není zcela specifickým inhibítozem NR, i když neexistuje lepší alternativa ([Xiong et al 2011](#)). Pokud ale wolframian způsobil v mých experimentech inhibici také dalších enzymů, lze tím jen těžko vysvětlit pozorovanou stimulaci klíčení.

Na základě dostupných údajů lze předpokládat, že nejlepším kandidátem, který by mohl být za sledovanou inhibici odpovědný, je NO. Tento plyn v rostlinách ovlivňuje množství procesů, což je důvod jeho intenzivního studia v recentní době (kap. [1.2.5.3 Signalisace NO](#), např. [Yamasaki et al. 2016](#) a citace uvnitř). Jeho úloha v signalizaci vyvolané přítomností NO_3^- je předpokládána (Andrews 2013) a byla pozorována při klíčení semen *Paulownia* ([Giba et al. 1998](#)). Tento předpoklad podporují dosud spíše předběžné výsledky z kvantifikace NO v protokormech. Protokormy *D. majalis* kultivované na médiu s vysokou koncentrací NO_3^- (N100) obsahovaly více NO, než protokormy kultivované na médiu bez NO_3^- (N0) (obrázek 42). V distribuci NO v protokormech však nebyl pozorován rozdíl (kapitola [3.5.1](#)) a NO byl přítomný vždy nejvíce v apikální oblasti protokormu. Může to být způsobeno tím, že se dosud jedná o předběžné výsledky získané na jiném druhu *H. robertianum*, který byl k NO_3^- citlivý pouze velice slabě. Je ale také možné, že pozorované maximum NO v apikální části je přítomné vždy a pod vlivem NO_3^- dochází pouze ke změnám celkového obsahu NO. Provedení těchto měření na větším množství materiálu snad celou situaci objasní.

Další výsledky, které naznačují na možnou úlohu NO v pozorované inhibici klíčení, se týkají aplikace donoru NO a zhášečů NO. Při stoupající koncentraci donoru NO SNP se snižovala klíčivost semen *D. majalis* na všech variantách. Naproti tomu přidání zhášečů NO PTIO nebo cPTIO v koncentraci 10 μM zvýšilo klíčivost *D. majalis* oproti kontrole bez zhášečů. Přidání těchto zhášečů v koncentraci 100 μM však mírně snížilo klíčivosti a přidání 1 μM zhášečů klíčivosti snížilo výrazně na všech variantách dusíkové řady. Zdá se tedy, že tyto vyšší koncentrace již byly supraoptimální. Pagnussat et al. ([2002](#)) používali koncentrace až 200 μM cPTIO na kořenech kukuřice (*Zea mays*) a Tun et al. ([2006](#)) na semenáčích *A. thaliana* používali s úspěchem koncentrace 0,1-1mM PTIO. Optimální koncentrace PTIO a cPTIO je tedy zřejmě závislá na použitém rostlinném materiálu. U jiného druhu testovaného v této práci, *Ophrys neglecta*, byl sledován pouze efekt cPTIO který byl podobný výsledkům získaným s *D. majalis*. Po přidání 10 μM zhášeče se klíčivosti zvýšily a po přidání 100 μM se zase oproti kontrole snížily. Pokus se třetím druhem, *P. albida*, a SNP dosahoval velice nízkých klíčivostí a semena klíčila pouze na

variantě NO. V tomto případě po přidání vyšší koncentrace SNP byly klíčivosti mírně vyšší. Je však nutno si uvědomit, že pozorované klíčivosti zde dosahovaly desetin procenta na jen malém množství misek, z čeho jen těžce lze usuzovat nějaké závěry. Experimenty s *P. albida* proto budou muset být zopakovány. Celkově lze tyto výsledky shrnout, že donor NO snižoval klíčivosti a naopak zhášeče NO klíčivost zvyšovaly alespoň při aplikaci nízkých koncentrací. Zdá se tedy, že NO by mohl být odpovědný za pozorovaný inhibiční efekt NO_3^- na klíčivost semen u orchidejí. Je ale nutné výše popsané experimenty zopakovat s jemnější škálou koncentrace zhášeče na nižších koncentracích. Pokud by za pozorovanou inhibici klíčení byl opravdu zodpovědný NO, mohlo by to také vysvětlit výrazně odlišné výsledky získané z posledních experimentů (kap. 3.1.4, kap. 3.3). Narozdíl od všech předchozích opakování byly v těchto experimentech klíčivosti na všech variantách velice nízké a prakticky nezávislé na koncentraci NO_3^- . Oproti předchozím experimentům došlo ke změně několika parametrů: zvýšení kultivační teploty, náhodné ozáření misek po výsevu lampičkou a náhrada papírových krabic za plastové. Plastová krabice je prakticky neprostupná pro plyny a pokud kultury na inhibičních koncentracích NO_3^- produkovaly NO, mohly jím inhibovat také ostatní misky ve stejné krabici. V papírových krabicích by ale NO unikal pryč a k inhibici ostatních variant by nedocházelo.

4.5 Efekt NO_3^- na růst protokormů orchidejí

Výsledky z *P. albida* ukazují, že NO_3^- neinhibují pouze samotné klíčení, ale také následující růst mladých protokormů. Inhibice růstu protokormů orchidejí vlivem NO_3^- byla pozorována u *Dactylorhiza incarnata* (Dijk et Eck 1995) a hybridní *Cattleya* (Raghavan et Torrey 1964). Podobně, jako v případě vlivu NO_3^- na klíčení, se i v těchto experimentech jednalo o výrazně vyšší koncentrace NO_3^- , než v našich experimentech. V případě dalších dvou druhů, u kterých byla v této práci sledována velikost protokormů, však nebylo snížení velikosti protokormů výrazné. *O. neglecta* vykazoval pouze statisticky neprůkazný trend snižování velikosti se vzrůstající koncentrací NO_3^- . *H. robertianum* již nevykazoval ani znatelný trend. Tyto dva druhy však byly také poměrně málo citlivé i v procesu klíčení (*H. robertianum* reagovalo zcela nejméně ze všech testovaných druhů) a tak je možné, že u nich k inhibici růstu mladých protokormů nedochází. V této práci pozorovaná inhibice růstu protokormů nejspíše nebude způsobena změnami v energetickém metabolismu, protože protokormy *D. majalis* rostoucí na médiích s různou koncentrací NO_3^- se

nelišily v obsazích jednotlivých rozpustných sacharidů ani v obsahu škrobu.

5. Závěry

- Nitráty mohou inhibovat klíčení různých druhů orchidejí i v koncentracích, které se vyskytují v přírodních podmínkách.
- K nitrátům jsou citlivé oligotrofní, mezotrofní a dokonce i mírně eutrofní druhy orchidejí. Citlivost testovaných druhů koreluje s úživností jejich stanoviště.
- Nitráty mohou inhibovat kromě klíčení semen také následný růst protokormů. Citlivost protokormů testovaných druhů orchidejí k nitrátům koreluje s citlivostí semen. .
- Auxiny, cytokininy i gibereliny mohou modulovat inhibiční efekt nitrátů na klíčení semen testovaných druhů orchidejí.
- Nitráty mohou modulovat účinek auxinů, cytokininů i giberelinů na klíčení semen testovaných druhů orchidejí.
- Mykorrhizní houby mohou modulovat až úplně zrušit inhibiční efekt dusičnanů na klíčení semen *Dactylorhiza majalis*.
- Pro inhibiční efekt dusičnanů na klíčení semen testovaných druhů orchidejí je nutná aktivita nitrátoreduktázy.
- Inhibiční efekt nitrátů na klíčení semen testovaných druhů orchidejí patrně úsobí prostřednictvím nárůstu endogenní koncentrace NO.
- NO inhibuje klíčení testovaných druhů orchidejí.
- NO vytváří v protokormech *Himantoglossum robertianum* koncentrační maximum v apikální části.
- Zralá semena *Himantoglossum robertianum* dosahují vysokých klíčivostí i po 6 letech skladování při laboratorní teplotě.

6. Literatura

- Aiton, W. T. (1813). Hortus Kewensis; Or, a Catalogue of the Plants Cultivated in the Royal Botanic Garden at Kew. Enlarged (Vol. 5). Longman, 191.
- Akaike, T., Yoshida, M., Miyamoto, Y., Sato, K., Kohno, M., Sasamoto, K., ... & Maeda, H. (1993). Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/. bul. NO (nitric oxide) through a radical reaction. *Biochemistry*, 32(3), 827-832.
- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M. T., Bedu, M., Meyer, C., & Truong, H. N. (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, 28(4), 500-512.
- Amarasinghe, B. R., Guy, L., Braddon, M., Onyeocha, I., Forde, B. G., & Udvardi, M. K. (1998). Regulation of GmNRT2 expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta*, 206(1), 44-52.
- Andrews, M. (1986). The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell & Environment*, 9(7), 511-519.
- Anderson, L. S., & Mansfield, T. A. (1979). The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution* 20(2), 113-121.
- *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, TheNorth American Native Terrestrial Orchid Conference, pp 73–77.
- Andrews, M., Raven, J. A., & Lea, P. J. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of applied biology*, 163(2), 174-199.
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., & Marion-Poll, A. (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science*, 4, 63.
- Arditti J., Ghani A.K.A. (2000): Tansley Rewiew 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
- Asai S, Ohta K, Yoshioka H (2008): MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPHoxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*20(5):1390–1406.6.

- Aslam, M., Travis, R. L., & Huffaker, R. C. (1992). Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology*, 99(3), 1124-1133.
- Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J. M., Gambale, F., Thomine, S., & Wege, S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual review of plant biology*, 62, 25-51.
- Barker S.J., Tagu D. (2000): The Roles of Auxins and Cytokinins in mycorrhizal Symbioses – *Journal of Plant Growth Regulation* 19 (2): 144 154.
- Baláz, M (2001). Comparison of orchid mycorrhiza with other mycorrhizal types with respect to nutrient transfers. *Interorchid*, 37-42.
- Bates, J. N., Baker, M. T., Guerra, R., & Harrison, D. G. (1991). Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue: evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochemical pharmacology*, 42, S157-S165.
- Becker, D., Stanke, R., Fendrik, I., Frommer, W. B., Vanderleyden, J., Kaiser, W. M., & Hedrich, R. (2002). Expression of the NH₄[±]transporter gene *LeAMT1; 2* is induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria. *Planta*, 215(3), 424-429.
- Beer, J. G. (1863). *Beiträge zur morphologie und biologie der familie der orchideen*. Gerold.
- Beligni, M. V., & Lamattina, L. (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210(2), 215-221.
- Beyrle, H., Penningsfeld, F., & Hockf, B. (1991). The role of nitrogen concentration in determining the outcome of the interaction between *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó and *Rhizoctonia* sp. *New phytologist*, 117(4), 665-672.
- Bethke, P. C., Badger, M. R., & Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, 16(2), 332-341.
- Bethke, P. C., Gubler, F., Jacobsen, J. V., & Jones, R. L. (2004). Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, 219(5), 847-855.
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 59:21–39.4.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G., & Jones, R. L. (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 57(3), 517-526.

- Bethke, P. C., Gubler, F., Jacobsen, J. V., & Jones, R. L. (2004). Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, 219(5), 847-855.
- *Borris, H. (1969). Samenvermehrung und anzucht Europäischer erdorchideen. In Proceedings of the 2nd European Orchid Congress (pp. 74-78).: In :Rasmussen 1995
- Brigham, R. O. (1917). Assimilation of organic nitrogen by *Zea mays* and the influence of *Bacillus subtilis* on such assimilation. *Soil Science*, 3(2), 155.
- Bright, J., Hiscock, S. J., James, P. E., & Hancock, J. T. (2009). Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 49-55.
- Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New phytologist*, 154(2), 275-304.
- Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., & Warner, R. L. (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology*, 99(4), 1294-1301.
- Boursiac, Y., Léran, S., Corratgé-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G., & Lacombe, B. (2013). ABA transport and transporters. *Trends in plant science*, 18(6), 325-333.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S., & Neill, S. J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 45(1), 113-122.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., & Chua, N. H. (1994). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, 77(1), 73-81.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S., & Neill, S. J. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 45(1), 113-122.
- Brouwer, R. (1962). Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant (No. 205). [sn].
- Bush, D. R. (1999). Amino acid transport. *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*, 305-318.
- Callesen, I., Raulund-Rasmussen, K., Gundersen, P., Stryhn, H.: Nitrate concentrations in soil solutions below Danish forests. – *For. Ecol. Manage.* 114: 71-72, 1999.

- Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, D., Meilhoc, E., & Bruand, C. (2012). Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytologist*, 196(2), 548-560.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W. M., ... & Baudouin, E. (2011). Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 189(2), 415-427.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., & Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1119-1129.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R. D., Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal*, 24(5), 667-677.
- Cohn, M. A., Butera, D. L., & Hughes, J. A. (1983). Seed dormancy in red rice III. Response to nitrite, nitrate, and ammonium ions. *Plant Physiology*, 73(2), 381-384.
- Colmer, T. D., & Bloom, A. J. (1998). A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net fluxes along roots of rice and maize. *Plant, Cell & Environment*, 21(2), 240-246.
- Commission of the European Communities (2007): Commission staff working document: Accompanying document to the Report to the Commission to the Council and the European Parliament on implementation of Council Directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources for the period 2000-2003 COM (2007) 120 final
- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J., & Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives*, 102(5), 460.
- Corpas, F. J., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M., & Barroso, J. B. (2009). Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 151(4), 2083-2094.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., & Lamattina, L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218(6), 900-905.
- Crawford, N. M. (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The plant cell*, 7(7), 859.

- Crawford, N. M., & Glass, A. D. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in plant science*, 3(10), 389-395.
- Crawford, N. M., & Forde, B. G. (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The arabidopsis book*.
- Crawford, N. M. (2006). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 471-478.
- Cren, M., & Hirel, B. (1999). Glutamine synthetase in higher plants regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant and Cell Physiology*, 40(12), 1187-1193.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S., & Golvano, M. P. (1996). Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS letters*, 398(2-3), 159-164.
- Dean, J. V., & Harper, J. E. (1988). The conversion of nitrite to nitrogen oxide (s) by the constitutive NAD (P) H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiology*, 88(2), 389-395.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomine, S., Gambale, F., & Barbier-Brygoo, H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 442(7105), 939-942.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394(6693), 585-588.
- Delledonne, M., et al. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394(6693), 585-588.
- Delforge, P. (1999). Nomenclatural and taxonomical contribution to the genus *Himantoglossum* (Orchidaceae). *Naturalistes Belges (Belgium)*.
- Derkx, M. P. M., & Karssen, C. M. (1993). Variability in light-, gibberellin- and nitrate requirement of *Arabidopsis thaliana* seeds due to harvest time and conditions of dry storage. *Journal of plant physiology*, 141(5), 574-582.
- Desikan, R., Cheung, M. K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of experimental botany*, 55(395), 205-212.
- Díaz-Álvarez, E. A., Lindig-Cisneros, R., & de la Barrera, E. (2015). Responses to simulated nitrogen deposition by the neotropical epiphytic orchid *Laelia speciosa*. *PeerJ*, 3, e1021.

- Dietrich, A. G., (1839) In: Allg. Gartenzeitung 7: 170
- Dijk, E., & Olf, H. (1994). Effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on field performance of *Dactylorhiza majalis*. Acta Botanica Neerlandica, 43(4), 383-392.
- Dijk, E., & Eck, N. (1995). Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. New Phytologist, 131(3), 361-367.
- Durner, J., Wendehenne, D., & Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(17), 10328-10333.
- Durner, Jörg, David Wendehenne, and Daniel F. Klessig. "Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose." Proceedings of the National Academy of Sciences 95.17 (1998): 10328-10333.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature protocols, 2(9), 2233-2244.
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C., & Feijo, J. A. (2015). Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. Molecular plant, 8(4), 506-520.
- *Eiberg H (1970). Asymbiotisk frøspiring og kulturforsøg hos nogle europæiske jordorkideer. Thesis, University of Copenhagen: Plant Physiological Laboratory. In: Rasmussen (1995).
- Ellenberg, H., Weber, H. E., Dull, R., Wirth, V., Werner, W., & Paulissen, D. (1991). Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. Scripta Geobotanica, 18, 1–248.
- Hill, MO, Preston, CD and Roy, DB (2004). Plantatt. Attributes of British and Irish Plants: Status, Size, Life History, Geography and Habitats. Centre for Ecology and Hydrology, Monks Wood, Cambridgeshire.
- Ercole, E., Rodda, M., & Girlanda, M. Establishment of a Symbiotic in vitro System between a Green Meadow Orchid and a Rhizoctonia-like Fungus.
- Eriksson, O., & Kainulainen, K. (2011). The evolutionary ecology of dust seeds. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 13(2), 73-87.
- Engels, C., & Marschner, H. (1995). Plant uptake and utilization of nitrogen. Nitrogen fertilization in the environment, 41-81.

- Falkengren-Grerup, U., Månsson, K. F., & Olsson, M. O. (2000). Uptake capacity of amino acids by ten grasses and forbs in relation to soil acidity and nitrogen availability. *Environmental and Experimental Botany*, 44(3), 207-219.
- Falkengren-Grerup, U. (1995). Interspecies differences in the preference of ammonium and nitrate in vascular plants. *Oecologia*, 102(3), 305-311.
- Falkengren-Grerup, U., & Lakkenborg-Kristensen, H. (1994). Importance of ammonium and nitrate to the performance of herb-layer species from deciduous forests in southern Sweden. *Environmental and Experimental Botany*, 34(1), 31-38.
- Fan, S. C., Lin, C. S., Hsu, P. K., Lin, S. H., & Tsay, Y. F. (2009). The Arabidopsis nitrate transporter NRT1. 7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *The Plant Cell*, 21(9), 2750-2761.
- Fast, G. (1982). European terrestrial orchids (symbiotic and asymbiotic methods)[Seed germination and culture, methods]. *Orchid biology: Reviews and perspectives*.
- Fernandez, E., & Galvan, A. (2007). Inorganic nitrogen assimilation in *Chlamydomonas*. *Journal of experimental botany*, 58(9), 2279-2287. ISO 690
- Fernandes, M. S., & Rossiello, R. O. P. (1995). Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2), 111-148.
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K., & Lorenzo, O. (2011). Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18506-18511.
- Fetter, J.C., Brown, R.N., Görres, J.H., Lee, Ch., Amador, J.A.: Nitrate and Phosphate Leaching under Turfgrass Fertilized with a Squid-based Organic Fertilizer. - *Water Air Soil Pollut.* 223: 1531–1541, 2012.
- Figura, T. 2013c Mechanizmy dormancie semen mykoheterotrofních rostlin
- Finzi, A. C., & Berthrong, S. T. (2005). The uptake of amino acids by microbes and trees in three cold-temperate forests. *Ecology*, 86(12), 3345-3353.
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523.
- Fitter, A. H., & Hay, R. K. (2012). *Environmental physiology of plants*. Academic press.

- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M., & Ciszewski, A. (2006). Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants?. *Planta*, 224(6), 1363-1372.
- Forde, B. G. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 219-235.
- Forde, B. G., & Clarkson, D. T. (1999). Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in botanical research*, 30, 1-90.
- Gao, S., Pan, W. L., & Koenig, R. T. (1998). Integrated root system age in relation to plant nutrient uptake activity. *Agronomy Journal*, 90(4), 505-510.
- García-Mata, C., & Lamattina, L. (2002). Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant physiology*, 128(3), 790-792.
- García-Mata, C., & Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126(3), 1196-1204.
- Gaudry JF, ed. *Plant nitrogen*. Berlin: Springer-Verlag; 2001. p. 101-146.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W. B., & von Wirén, N. (1999). Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. *The Plant Cell*, 11(5), 937-947.
- George, E., Marschner, H., & Jakobsen, I. (1995). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15(3-4), 257-270.
- Ghosh, B. P., & Burris, R. H. (1950). Utilization of nitrogenous compounds by plants. *Soil Science*, 70(3), 187-204.
- Giba, Z., Grubišić, D., & Konjević, R. (1994). The effect of electron acceptors on the phytochrome-controlled germination of Paulownia tomentosa seeds. *Physiologia Plantarum*, 91(2), 290-294.
- Giba, Z., Grubišić, D., & Konjević, R. (2006). Seeking the role of NO in breaking seed dormancy. In *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology* (pp. 91-111). Springer Berlin Heidelberg.
- Giba, Z., Grubisic, D., & Konjevic, R. (1992). Sodium nitroprusside-stimulated germination of common chick weed (*Stellaria media* L.) seeds. *Arhiv biologskih nauka (Yugoslavia)*.
- Glass, A. D., Shaff, J. E., & Kochian, L. V. (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley IV. Electrophysiology. *Plant Physiology*, 99(2), 456-463.

- Glass, A. D., Shaff, J. E., & Kochian, L. V. (1992). Studies of the uptake of nitrate in barley IV. Electrophysiology. *Plant Physiology*, 99(2), 456-463.
- Gniazdowska, A., Dobrzyńska, U., Bubańczyk, T., & Bogatek, R. (2007). Breaking the apple embryo dormancy by nitric oxide involves the stimulation of ethylene production. *Planta*, 225(4), 1051-1057.
- Gordon, A. J., Lea, P. J., Rosenberg, C., & Trinchant, J. C. (2001). Nodule formation and function. In *Plant Nitrogen* (pp. 101-146). Springer Berlin Heidelberg.
- *Gordon T, Lea PJ, Rosenberg C, Trinchnat JC. Nodule formation and function. In: Lea P, Morot-Godber, B. L., Doel, J. J., Sapkota, G. P., Blake, D. R., Stevens, C. R., Eisenthal, R., & Harrison, R. (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7757-7763.
- Gouvea, C. M. C. P., Souza, J. F., Magalhaes, A. C. N., & Martins, I. S. (1997). NO[•]-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21(3), 183-187.
- Grime, J. P., Campbell, B. D., Mackey, J. M. L., & Crick, J. C. (1991). Root plasticity, nitrogen capture and competitive ability.
- Graziano, M., Beligni, M. V., & Lamattina, L. (2002). Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiology*, 130(4), 1852-1859.
- Grubišić, D., & Konjević, R. (1990). Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tomentosa* seeds. *Planta*, 181(2), 239-243.
- Gryndler, M., Baláž, M., Hršelová, H., Jansa, J., & Vosátka, M. (2004). Mykorhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin. *Academia*.
- Guo, F. Q., Okamoto, M., & Crawford, N. M. (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302(5642), 100-103.
- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., & van Dongen, J. T. (2011). On the origins of nitric oxide. *Trends in plant science*, 16(3), 160-168.
- Gutiérrez, R. A. (2012). Systems biology for enhanced plant nitrogen nutrition. *Science*, 336(6089), 1673-1675.
- Harvais, G., & Hadley, G. (1967). The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 66(2), 205-215.

- Hajong, S., Kumaria, S., & Tandon, P. (2013). Comparative study of key phosphorus and nitrogen metabolizing enzymes in mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. *Acta physiologiae plantarum*, 35(7), 2311-2322.
- Harvais, G. (1982). An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Canadian Journal of Botany*, 60(12), 2547-2555.
- Harvais, G., & Raitsakas, A. (1975). On the physiology of a fungus symbiotic with orchids. *Canadian Journal of Botany*, 53(2), 144-155.
- Harvais, G., et; Hadley, G. (1967). The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist*, 217-230.
- Hawkins, H. J., Johansen, A., & George, E. (2000). Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 226(2), 275-285.
- Hawkins, H. J., Wolf, G., & Stock, W. D. (2005). Cluster roots of *Leucadendron laeolium* (Proteaceae) and *Lupinus albus* (Fabaceae) take up glycine intact: an adaptive strategy to low mineral nitrogen in soils?. *Annals of Botany*, 96(7), 1275-1282.
- He Y, et al. (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* 305(5692):1968–1971
- Heidari, B., Matre, P., Nemie-Feyissa, D., Meyer, C., Rogli, O. A., Møller, S. G., & Lillo, C. (2011). Protein phosphatase 2A B55 and A regulatory subunits interact with nitrate reductase and are essential for nitrate reductase activation. *Plant physiology*, 156(1), 165-172.
- Hendricks, S. B., & Taylorson, R. B. (1974). Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. *Plant Physiology*, 54(3), 304-309.
- Henry, H. A. L., & Jefferies, R. L. (2002). Free amino acid, ammonium and nitrate concentrations in soil solutions of a grazed coastal marsh in relation to plant growth. *Plant, Cell & Environment*, 25(5), 665-675.
- Hew, C. S., Lim, L. Y., & Low, C. M. (1993). Nitrogen uptake by tropical orchids. *Environmental and experimental botany*, 33(2), 273-281.
- Hilhorst, H. M. (1995). A critical update on seed dormancy I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 5, 61-61.
- Hill, M. O., Preston, C. D., & Roy, D. B. (2004). PLANTATT-attributes of British and Irish plants: status, size, life history, geography and habitats. Centre for Ecology & Hydrology.

- Hill, M. O., Mountford, J. O., Roy, D. B., & Bunce, R. G. H. (1999). Ellenberg's indicator values for British plants. ECOFACT Volume 2 Technical Annex (Vol. 2). Institute of Terrestrial Ecology.
- Horchani, F., Prévot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., ... & Brouquisse, R. (2011). Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology*, 155(2), 1023-1036.
- Hufton, C. A., Besford, R. T., & Wellburn, A. R. (1996). Effects of NO (+ NO₂) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter with CO₂ enrichment. *New Phytologist*, 133(3), 495-501.
- Hunt, P. F., & Summerhayes, V. S. (1965). *Dactylorhiza* Nevski, the correct generic name of the dactylorchids. *Watsonia*, 6(2), 128-133.
- Huang, J. S., & Knopp, J. A. (1998). Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum*-induced hypersensitive reaction in tobacco. In *Bacterial Wilt Disease* (pp. 218-224). Springer Berlin Heidelberg.
- Hsu, P. K., & Tsay, Y. F. (2013). Two phloem nitrate transporters, NRT1. 11 and NRT1. 12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth. *Plant Physiology*, 163(2), 844-856.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2), 151-174.
- Chumová, Z., Krejčíková, J., Mandáková, T., Suda, J., & Trávníček, P. (2015). Evolutionary and taxonomic implications of variation in nuclear genome size: lesson from the grass genus *Anthoxanthum* (Poaceae). *PLOS one*, 10(7), e0133748.
- Lesson from the Grass Genus *Anthoxanthum* (Poaceae)." *PloS one* 10.7 (2015): e0133748.Lesson from the Grass Genus *Anthoxanthum* (Poaceae)." *PloS one* 10.7 (2015): e0133748.
- Ichihashi, S., & Yamashita, M. (1977). Studies on the media for orchid seed germination, 1: The effects of balances inside each cation and anion group for the germination and seeding development of *Bletilla striata* seeds. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.

- Ichihashi, S. (1978). Studies on the media for orchid seed germination, 2: The effects of anionic and cationic combinations relevant to seeding populations and culture periods on the growth of *Bletilla striata* seedlings. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.
- Jeong, J., Suh, S., Guan, C., Tsay, Y. F., Moran, N., Oh, C. J., ... & Lee, Y. (2004). A nodule-specific dicarboxylate transporter from alder is a member of the peptide transporter family. *Plant Physiology*, 134(3), 969-978.
- Jeřábková, K. (2006) Výzkum ekologických nároků a optimálního managementu běloprstky bělavé (*Pseudorchis albida*). Diplomová práce, Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Jersáková, J., Malinová, T., Jeřábková, K., & Dötterl, S. (2011). Biological flora of the British Isles: *Pseudorchis albida* (L.) Á. & D. Löve. *Journal of ecology*, 99(5), 1282-1298.
- Jiang, Z., & Hull, R. J. (1999). Partitioning of nitrate assimilation between shoots and roots of Kentucky bluegrass. *Crop science*, 39(3), 746-754.
- Jiang, Z., & Hull, R. J. (1999). Partitioning of nitrate assimilation between shoots and roots of Kentucky bluegrass. *Crop science*, 39(3), 746-754.
- Johansen, D. A. (1950). Plant embryology. Embryogeny of the spermatophyta. *Plant embryology. Embryogeny of the spermatophyta*.
- Johansen, A., Jakobsen, I., & Jensen, E. S. (1993). Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biology and Fertility of Soils*, 16(1), 66-70.
- Johansson, V. A., & Eriksson, O. (2013). Recruitment limitation, germination of dust seeds, and early development of underground seedlings in six *Pyroleae* species. *Botany*, 91(1), 17-24.
- Jones, D. L., Healey, J. R., Willett, V. B., Farrar, J. F., & Hodge, A. (2005). Dissolved organic nitrogen uptake by plants—an important N uptake pathway?. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 413-423.
- Ju, X. T., Kou, C. L., Zhang, F. S., & Christie, P. (2006). Nitrogen balance and groundwater nitrate contamination: Comparison among three intensive cropping systems on the North China Plain. *Environmental Pollution*, 143(1), 117-125.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., ... & Seo, M. (2012). Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9653-

9658. Kielland, K. (1994). Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology*, 75(8), 2373-2383.
- Kauth, P. J., Vendrame, W. A., & Kane, M. E. (2006). In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(1), 91-102.
- Keeley, J. E., & Fotheringham, C. J. (1997). Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science*, 276(5316), 1248-1250.
- Kielland, K. (1997). Role of free amino acids in the nitrogen economy of arctic cryptogams. *Ecoscience*, 4(1), 75-79.
- Kikuchi, M., Shirasaki, H., & Himi, T. (2008). Platelet-activating factor (PAF) increases NO production in human endothelial cells—real-time monitoring by DAR-4M AM. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 78(4), 305-309.
- Kimmins, J. P. 1997. *Forest Ecology: A foundation for Sustainable Management*. 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ. IN: Strahm, B. D., & Harrison, R. B. (2006). Nitrate sorption in a variable-charge forest soil of the Pacific Northwest. *Soil Science*, 171(4), 313-321.
- Kmecová K., (2011) *Asymbiotický výsev terestrických orchidejí : vliv dezinfekce na klíčení semen Dactylorhiza majalis a Anacamptis morio*. Středoškolská odborná činnost
- Kobae, Y., Tamura, Y., Takai, S., Banba, M., & Hata, S. (2010). Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. *Plant and cell physiology*, 51(9), 1411-1415.
- Kojima, H., Hirotani, M., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Urano, Y., Higuchi, T., ... & Nagano, T. (2001). Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore. *Analytical chemistry*, 73(9), 1967-1973. Kojima, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Hirata, Y., & Nagano, T. (1999). Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(21), 3209-3212.
- Kojima, H., Hirotani, M., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., & Nagano, T. (2000). Fluorescent indicators for nitric oxide based on rhodamine chromophore. *Tetrahedron Letters*, 41(1), 69-72.
- Kohl, J. G., Woitke, P., Kühn, H., Dewender, M., & König, G. (1998). Seasonal changes in dissolved amino acids and sugars in basal culm internodes as physiological indicators of the C/N-balance of *Phragmites australis* at littoral sites of different trophic status. *Aquatic Botany*, 60(3), 221-240.

- Kopyra, M., & Gwóźdź, E. A. (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(11), 1011-1017.
- Kramer, C. Y. (1956). Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics*, 12(3), 307-310.
- Krapp, A., Fraiser, V., Scheible, W. R., Quesada, A., Gojon, A., Stitt, M., ... & Daniel-Vedele, F. (1998). Expression studies of Nrt2: 1Np, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *The Plant Journal*, 14(6), 723-731.
- Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A. S., ... & Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 65(3), 789-798.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., ... & Zazimalova, E. (2010). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1. 1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell*, 18(6), 927-937.
- Kwon, E., Feechan, A., Yun, B. W., Hwang, B. H., Pallas, J. A., Kang, J. G., & Loake, G. J. (2012). AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta*, 236(3), 887-900.
- Lambeck, I. C., Fischer-Schrader, K., Niks, D., Roeper, J., Chi, J. C., Hille, R., & Schwarz, G. (2012). Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4562-4571.
- Lamattina, L., Beligni, M. V., Garcia-Mata, C., & Laxalt, A. M. (2001). U.S. Patent No. 6,242,384. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 54:109–136.
- Lauter, F. R., Ninnemann, O., Bucher, M., Riesmeier, J. W., & Frommer, W. B. (1996). Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 8139-8144.
- Laxalt, A. M., Beligni, M. V., & Lamattina, L. (1997). Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, 103(7), 643-651.

- Lea, P. J., & Morot-Gaudry, J. F. (Eds.). (2001). Plant nitrogen. Springer Science & Business Media.
- Ledoux, E., Gomez, E., Monget, J. M., Viavattene, C., Viennot, P., Ducharne, A., ... & Mary, B. (2007). Agriculture and groundwater nitrate contamination in the Seine basin. The STICS–MODCOU modelling chain. *Science of the total environment*, 375(1), 33-47.
- 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.
- Lee, R. B., & Ratcliffe, R. G. (1991). Observations on the subcellular distribution of the ammonium ion in maize root tissue using in-vivo ¹⁴N-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta*, 183(3), 359-367.
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J. C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., ... & Gassmann, W. (2014). A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. *Trends in plant science*, 19(1), 5-9.
- Lea, P. J., & Ireland, R. J. (1999). Nitrogen metabolism in higher plants. *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology*, 1-47.
- Leake, J. R. (1994). The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, 127(2), 171-216.
- Leshem Y.Y., Y. L., & Haramaty, E. (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology*, 148(3), 258-263.
- Leshem, Y. Y., Haramaty, E., Iluz, D., Malik, Z., Sofer, Y., Roitman, L., & Leshem, Y. (1997). Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35(7), 573-579.
- Leshem, Y. Y., & Wills, R. B. H. (1998). Harnessing senescence delaying gases nitric oxide and nitrous oxide: a novel approach to postharvest control of fresh horticultural produce. *Biologia Plantarum*, 41(1), 1-10.
- Leubner-Metzger, G., Petruzzelli, L., Waldvogel, R., Vögeli-Lange, R., & Meins Jr, F. (1998). Ethylene-responsive element binding protein (EREBP) expression and the transcriptional

- regulation of class I β -1, 3-glucanase during tobacco seed germination. *Plant molecular biology*, 38(5), 785-795.
- Lin, S. H., Kuo, H. F., Canivenc, G., Lin, C. S., Lepetit, M., Hsu, P. K., ... & Gojon, A. (2008). Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell*, 20(9), 2514-2528.
- Loqué, D., Tillard, P., Gojon, A., & Lepetit, M. (2003). Gene expression of the NO₃-transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in Arabidopsis roots by NO₂-, the product of NO₃-reduction. *Plant physiology*, 132(2), 958-967.
- Lozano-Juste J, León J (2010) Enhanced abscisic acid-mediated responses in nia1-nia2noa1-2 triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 152(2):891-903.
- Majerowicz, N., Kerbauy, G. B., Nievola, C. C., & Suzuki, R. M. (2000). Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environmental and Experimental Botany*, 44(3), 195-206.
- Meyer, Christian, and Mark Stitt. "Nitrate reduction and signalling." *Plant Nitrogen*. Springer Berlin Heidelberg, 2001. 37-59. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell*, 20(9), 2514-2528. ISO 690
- *Lindén, B. (1980). Aseptic germination of seeds of northern terrestrial orchids. *Ann. Bot. Fennici*. 17: 174-182: In Steele (1996)
- Lipson, D. A., & Monson, R. K. (1998). Plant-microbe competition for soil amino acids in the alpine tundra: effects of freeze-thaw and dry-rewet events. *Oecologia*, 113(3), 406-414. ISO 690
- Liu, Q., Chen, X., Wu, K., & Fu, X. (2015). Nitrogen signaling and use efficiency in plants: what's new?. *Current opinion in plant biology*, 27, 192-198.
- Liu, W. Z., Kong, D. D., Gu, X. X., Gao, H. B., Wang, J. Z., Xia, M., ... & He, Y. K. (2013). Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), 1548-1553.
- Lillo, C. (2008). Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal*, 415(1), 11-19.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., & Durner, J. (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*, 137(3), 921-930.

- Little, D. Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A., & Malamy, J. E. (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2. 1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13693-13698.
- Liu LH, Ludewig U, Frommer WB, von Wirén N (2003): AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in Arabidopsis. *Plant Cell.*, 15: 790-800. 10.1105/tpc.007120.
- Lugo-Lugo, H. (1955). Effects of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia* seeds. *American Orchid Society Bulletin*, 24, 309-312.
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 250-258.
- Magalhaes, J. R., Monte, D. C., & Durzan, D. (2000). Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 6, 117-127.
- Machín, F., Medina, B., Navarro, F. J., Pérez, M. D., Veenhuis, M., Tejera, P., ... & Siverio, J. M. (2004). The role of Ynt1 in nitrate and nitrite transport in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 21(3), 265-276.
- Malmgren, S., Nyström, H.: *Orchid Propagation*. - <http://www.lidaforsgarden.com/Orchids/engelsk.htm>. Pristup 2.8.2016
- Malmgren S (1996) *Orchid propagation: Theory and Practice*. In: Allen C (ed) *North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production*, Native Terrestrial Orchid Conference, pp 11–26.
- Malmgren, S. (1993). Asymbiontisk fröförökning i stor skala av *Anacamptis*, *Ophrys*, *Orchis* och andra orkideer med runda rotknöler. *Sven Bot Tidskr*, 87, 221-234.
- Malmgren, S. (1989). Asymbiotisk förökning från frö av guckusko, flugblomster, brunkulla och några andra svenska orkidéarter. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 83(6), 347-354.
- Makino, A., & Osmond, B. (1991). Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology*, 96(2), 355-362.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd. Edn. Academic Pres.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., & Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany*

- Mathieu, C., Moreau, S., Frendo, P., Puppo, A., & Davies, M. J. (1998). Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(7), 1242-1249.
- Mead, J. W., & Bulard, C. (1975). Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*. *New Phytologist*, 74(1), 33-40.
- Mead, J. W., & Bulard, C. (1979). Vitamins and nitrogen requirements of *Orchis laxiflora* Lamk. *New phytologist*, 83(1), 129-136.
- Meilhoc, E., Blanquet, P., Cam, Y., & Bruand, C. (2013). Control of NO level in rhizobium-legume root nodules: Not only a plant globin story. *Plant signaling & behavior*, 8(10), e25923.
- Méndez-Bravo, A., Raya-González, J., Herrera-Estrella, L., & López-Bucio, J. (2010). Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*, 51(10), 1612-1626.
- Morère-Le Paven, M. C., Viau, L., Hamon, A., Vandecasteele, C., Pellizzaro, A., Bourdin, C., ... & Legros, C. (2011). Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of experimental botany*, 62(15), 5595-5605.
- Mohr, H., & Schopfer, P. (1978). *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*.
- Mur, L. A., Carver, T. L., & Prats, E. (2006). NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of experimental botany*, 57(3), 489-505.
- Mur, L. A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S. M., Moshkov, I. E., Novikova, G. V., ... & Gupta, K. J. (2013). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, 5, pls052.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Michl J (1988) Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny I. *Živa* 2: 52-53.
- Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of experimental Botany*, 58(9), 2297-2306.
- Miller, A. E., & Bowman, W. D. (2002). Variation in nitrogen-15 natural abundance and nitrogen uptake traits among co-occurring alpine species: do species partition by nitrogen form?. *Oecologia*, 130(4), 609-616.,

- 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.
- Nakamura, S. J., Uchida, T., & Hamada, M. (1975). Atmospheric condition controlling the seedgermination 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.
- Nakatsubo, N., Kojima, H., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Maeda, D., ... & Nagano, T. (1998). Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS letters*, 427(2), 263-266.
- 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*, 204-212.
- Nagata, N., Momose, K., & Ishida, Y. (1999). Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4, 5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *Journal of biochemistry*, 125(4), 658-661.
- Näsholm, T., Ekblad, A., Nordin, A., Giesler, R., Högberg, M., & Högberg, P. (1998). Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature*, 392(6679), 914-916.
- Näsholm, T., Huss-Danell, K., & Högberg, P. (2000). Uptake of organic nitrogen in the field by four agriculturally important plant species. *Ecology*, 81(4), 1155-1161.
- Näsholm, T., Huss-Danell, K., & Högberg, P. (2001). Uptake of glycine by field grown wheat. *New Phytologist*, 150(1), 59-63.
- Näsholm, T., Kielland, K., & Ganeteg, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*, 182(1), 31-48.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., ... & Iba, K. (2008). CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, 452(7186), 483-486.
- Neill, S. J., Desikan, R., & Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159(1), 11-35.

- Ninnemann, O., Jauniaux, J. C., & Frommer, W. B. (1994). Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *The EMBO journal*, 13(15), 3464.
- Ninnemann, H., & Maier, J. (1996). Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology*, 64(2), 393-398.
- Nordin, A., Schmidt, I. K., & Shaver, G. R. (2004). Nitrogen uptake by arctic soil microbes and plants in relation to soil nitrogen supply. *Ecology*, 85(4), 955-962.
- Nordin, A., Högberg, P., & Näsholm, T. (2001). Soil nitrogen form and plant nitrogen uptake along a boreal forest productivity gradient. *Oecologia*, 129(1), 125-132.
- Noritake, T., Kawakita, K., & Doke, N. (1996). Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*, 37(1), 113-116.
- Nour-Eldin, H. H., Andersen, T. G., Burow, M., Madsen, S. R., Jørgensen, M. E., Olsen, C. E., ... & Halkier, B. A. (2012). NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature*, 488(7412), 531-534.
- 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 No. 3*, pp. 161-172). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Okamoto, M., Okada, K., Watanabe, T., & Ae, N. (2003). Growth responses of cereal crops to organic nitrogen in the field. *Soil science and plant nutrition*, 49(3), 445-452.
- Otto, F. (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in cell biology*, 33, 105-110.
- Paul, M. J., & Stitt, M. (1993). Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant, Cell & Environment*, 16(9), 1047-1057. ISO 690
- Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., & Lamattina, L. (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*, 129(3), 954-956.
- Pearson, J. N., Finnemann, J., & Schjoerring, J. K. (2002). Regulation of the high-affinity ammonium transporter (BnAMT1; 2) in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status. *Plant molecular biology*, 49(5), 483-490.

- Perotto, S., Rodda, M., Benetti, A., Sillo, F., Ercole, E., Rodda, M., ... & Balestrini, R. (2014). Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant–fungus relationship. *Planta*, 239(6), 1337-1349.
- Pedersen, A., Petersen, B.M., Eriksen, J., Hansen, S., Jensen, L.S.: A model simulation analysis of soil nitrate concentrations—Does soil organic matter pool structure or catch crop growth parameters matter most? – *Ecol. Modelling* 205: 209-220, 2007.
- Pedroso, M. C., Magalhaes, J. R., & Durzan, D. (2000). A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany*, 51(347), 1027-1036.
- Peuke, A. D., Jeschke, W. D., Dietz, K. J., Schreiber, L., & Hartung, W. (1998). Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis* L. Carbon and nitrogen uptake and inflows. *New Phytologist*, 138(4), 675-687.
- 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.
- Pignatti, S. (2005). Valori di bioindicazione delle piante vascolari della flora d'Italia. *Dipt. di Botanica ed Ecologia dell'Università Camerino*.
- Pike, S., Gao, F., Kim, M. J., Kim, S. H., Schachtman, D. P., & Gassmann, W. (2013). Members of the NPF3 transporter subfamily encode pathogen-inducible nitrate/nitrite transporters in grapevine and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 54(1), 167.
- Ponert, J.: [Early Stages of Development of Terrestrial Orchids: the Effect of Saccharides and Phytohormones.] - Diploma thesis, Charles University Prague, 2009.
- Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K., Lipavská, H.: European orchid cultivation - from seed to mature plant. – *Eur. J. Environ. Sci.* 1: 95-107, 2011.
- Ponert, J., Figura, T., Vosolsobe, S., Lipavska, H., Vohnik, M., & Jersakova, J. (2013). Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany*.
- Prado, A. M., Porterfield, D. M., & Feijó, J. A. (2004). Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development*, 131(11), 2707-2714.
- Procházka F. (1980): *Naše orchideje*. - 296 p., Pardubice
- Procházka F. et Velíšek V. (1983): *Orchideje naší přírody*. - 284 p., Praha.

- Pridgeon, A. M., Bateman, R. M., Cox, A. V., Hapeman, J. R., & Chase, M. W. (1997). Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences: 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato. *Lindleyana*, 12(2), 89-109.
- Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., & Rasmussen, F. N. (1999). *Genera Orchidacearum: vol. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae* (Vol. 198505132). Oxford: Oxford University Press xiv, 197p.-illus., col. illus.. ISBN.
- Purves, S., Hadley, G.: The physiology of symbiosis in *Goodyera repens*. - *New Phytol.* 77: 689-696, 1976.
- PVK (2016a) Pražské vodovody a kanalizace, a.s. : Kvalita pitné vody v distribuční síti hl.m. Prahy v červenci 2016 - kohoutek u spotřebitele. Dostupné na <http://www.pvk.cz/res/archive/1475/149477.pdf?seek=1470656856> (Přístup 13.8.2016).
- PVK (2006) Jak se dostává pitná voda k vám domů? Voda pro Vás.1/2006:4. Dostupné na <http://www.pvk.cz/res/data/001/000205.pdf?seek=2>
- Quesada, A., Krapp, A., Trueman, L. J., Daniel-Vedele, F., Fernández, E., Forde, B. G., & Caboche, M. (1997). PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant molecular biology*, 34(2), 265-274.
- Rasmussen, H.N.: *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant.* - Cambridge University Press, Great Britain 1995.
- 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 *Dactyiorhiza majaiis* (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.
- Raab, T. K., Lipson, D. A., & Monson, R. K. (1996). Non-mycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle. *Oecologia*, 108(3), 488-494.

- Raab, T. K., Lipson, D. A., & Monson, R. K. (1999). Soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: plant and soil processes. *Ecology*, 80(7), 2408-2419.
- Raghavan, V., & Torrey, J. G. (1964). Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. *American Journal of Botany*, 264-274.
- Rains, K. C., & Bledsoe, C. S. (2007). Rapid uptake of ^{15}N -ammonium and glycine- ^{13}C , ^{15}N by arbuscular and ericoid mycorrhizal plants native to a Northern California coastal pygmy forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(5), 1078-1086.
- Reisenauer, H. M. (1966). Mineral nutrients in soil solution. *Environmental Biology*, 507-508.
- Read, D. J., Leake, J. R., & Langdale, A. R. (1989). The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. *Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi* (Boddy, L., Marchant, R. and Read, DJ, Eds.), 181-204.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., ... & Gojon, A. (2006). The Arabidopsis NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50), 19206-19211.
- Reisenauer, H. M. (1966). Mineral nutrients in soil solution. *Environmental Biology*, 507-508.
- Ribeiro, E. A., Cunha, F. Q., Tamashiro, W., & Martins, I. S. (1999). Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS letters*, 445(2-3), 283-286.
- Ruan, J., Zhang, J., Li, M., Zhu, Y., Sun, L., Jin, H., ... & Xu, M. Dependence of UV-B-induced camptothecin production on nitrate reductase-mediated nitric oxide signaling in *Camptotheca acuminata* suspension cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-10.
- Rydlo Jan (2008): *Epipactis helleborine* jako polni plevel. – *Muz. a Současnost, Roztoky, ser. natur.*, 23: 211–218.
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K. D., & Coruzzi, G. M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate–cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18524-18529.

- Salvemini, F., Marini, A. M., Riccio, A., Patriarca, E. J., & Chiurazzi, M. (2001). Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. *Gene*, 270(1), 237-243.
- 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
- Scheible W-R, Lauerer M, Schulze E-D, Caboche M, Stitt M: •• Accumulation of nitrate in the shoot acts as signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant J* 1997, 11:671-691. Tobacco mutants and transformants with decreased expression of NIA were grown at various nitrogen supplies, and the levels of nitrate, amino acids, protein, overall growth and shoot–root allocation investigated. Accumulation of nitrate in low-NIA genotypes inhibited root growth, resulting in a highe
- Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K. I., Kanamori, N., Nagata, M., Suzuki, A., ... & Uchiumi, T. (2009). Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 57(2), 254-263.
- Scherer, G. F., & Holk, A. (2000). NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaineaccumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regulation*, 32(2-3), 345-350.
- Sigma-Aldrich (2016) Sodium nitroprusside dihydrate. Product Code 22,871-0 Replacement for Product Number S 0501. Dostupné online zde: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/228710pis.pdf (Přistoupeno 14.8.2016)
- Simon-Rosin, U., Wood, C., & Udvardi, M. K. (2003). Molecular and cellular characterisation of LjAMT2; 1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. *Plant molecular biology*, 51(1), 99-108.
- Sokolovski, S. G., Meharg, A. A., & Maathuis, F. J. (2002). *Calluna vulgaris* root cells show increased capacity for amino acid uptake when colonized with the mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. *New Phytologist*, 155(3), 525-530.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., von Wirén, N., Yamaya, T., & Yamaguchi, J. (2003). Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1*; 1–1; 3) in rice. *Plant and Cell Physiology*, 44(7), 726-734.

- Stitt, M., & Feil, R. (1999). Lateral root frequency decreases when nitrate accumulates in tobacco transformants with low nitrate reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and root1. *Plant and Soil*, 215(2), 143-153.
- Suda, J., Krahulcová, A., Trávníček, P., & Krahulec, F. (2006). Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon*, 55(2), 447-450.
- Tavares, A. R., Young, J. L. M., Ori, S. S., Kanashiro, S., Lima, G. P., Chu, E. P., & Suzuki, R. M. (2012). Orchid in vitro growth as affected by nitrogen levels in the culture medium. *Horticultura Brasileira*, 30(1), 119-124.
- Trávníček, P., Kubátová, B., Čurn, V., Rauchová, J., Krajníková, E., Jersáková, J., & Suda, J. (2011). Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. *Annals of Botany*, 107(1), 77-87.
- Trépanier, M., Lamy, M. P., & Dansereau, B. (2009). *Phalaenopsis* can absorb urea directly through their roots. *Plant and soil*, 319(1-2), 95-100.
- Trueman, L. J., Richardson, A., & Forde, B. G. (1996). Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 175(1), 223-231.
- Tsay, Y. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A., & Crawford, N. M. (1993). The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 72(5), 705-713.
- Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. (2006): Microbial producers of plant growth Stimulators and their practical use: A review – *Applied Biochemistry and Microbiology* 42 (2): 117 126.
- Tun, N. N., Holk, A., & Scherer, G. F. (2001). Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS letters*, 509(2), 174-176.
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. S., & Scherer, G. F. (2006). Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 47(3), 346-354.
- Tun, N. N., Livaja, M., Kieber, J. J., & Scherer, G. F. (2008). Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytologist*, 178(3), 515-531.

- Vidmar, J. J., Zhuo, D., Siddiqi, M. Y., & Glass, A. D. (2000). Isolation and characterization of HvNRT2.3 and HvNRT2.4 cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. *Plant Physiology*, 122(3), 783-792.
- Tsiftsis, S., & Antonopoulos, Z. (2011). *Pseudorchis albida*: an enigmatic orchid of the Greek flora. *J. Eur. Orch.*, 43(4), 795-806.
- Sakamoto, A., Sakurao, S. H., Fukunaga, K., Matsubara, T., Ueda-Hashimoto, M., Tsukamoto, S., ... & Morikawa, H. (2004). Three distinct Arabidopsis hemoglobins exhibit peroxidase-like activity and differentially mediate nitrite-dependent protein nitration. *FEBS letters*, 572(1), 27-32.
- Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J. F., & Lesaint, C. Joliv et E. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 25, 805-12.
- Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D. J., ... & Delgado, M. J. (2010). Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(5), 702-711.
- Seaton, P.T., Hu, H., Perner, H., Pritchard, H.W.: Ex Situ Conservation of Orchids in a Warming World. – *Bot. Rev.* 76: 193-203, 2010.
- Schmidt HH, Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78(6):919–925.2.
- Smith, Z.F., James, E.A., McDonnell, M.J., McLean, C.B.: Planting conditions improve translocation success of the endangered terrestrial orchid *Diuris fragrantissima* (Orchidaceae). – *Aust. J. Bot.* 57: 200-209, 2009.
- Smith, S.E., Read, D.J.: *Mycorrhizal Symbiosis*. - Academic Press, London 2008.
- Spoerl, E. (1948). Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *American Journal of Botany*, 88-95.
- Stamler, J. S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions.
- Steele, W.K.: Large Scale Seedling Production of North American *Cypripedium* Species. - In: Allen, C. (ed.): *North American Native Terrestrial Orchids – Propagation and Production*. Pp 11-26. Conference Proceedings, The North American Native Terrestrial Orchid Conference, Maryland 1996.
- 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.

Strahm, B. D., & Harrison, R. B. (2006). Nitrate sorption in a variable-charge forest soil of the Pacific Northwest. *Soil Science*, 171(4), 313-321.

Stöhr, C., & Stremlau, S. (2006). Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 463-470.

Schiller, P., Heilmeier, H., & Hartung, W. (1998). Uptake of amino acids by the aquatic resurrection plant

Schimel, J. P., & Chapin, F. S. (1996). Tundra plant uptake of amino acid and NH_4^+ nitrogen in situ: plants compete well for amino acid N. *Ecology*, 77(7), 2142-2147.

Schwarz, G. (2012). Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4562-4571.

Lillo, C. (2008). Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal*, 415(1), 11-19.

Singh, R. J., Hogg, N., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (1996). Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18596-18603.

Stewart, S.L., Kane, M.E.: Asymbiotic germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. - *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 86: 147–158, 2006.

Stamler, J. S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78(6), 931-936.

Suenaga, A., Moriya, K., Sonoda, Y., Ikeda, A., Von Wirén, N., Hayakawa, T., ... & Yamaya, T. (2003). Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 44(2), 206-211.

Sugiura, M., Georgescu, M. N., & Takahashi, M. (2007). A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 48(7), 1022-1035.

Swarts, N.D., Dixon, K.W.: Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. – *Ann. Bot.* 104: 543-556, 2009.

The Plant List (2016). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (Přístup 10.8.2016).

The International Plant Names Index (2016). Published on the Internet <http://www.ipni.org> [accessed 26 March 2016]

Teppner, H., & Klein, E. (1991). *Nigritella rhellicani* spec. nova und *N. nigra* (L.) Rchb. f. str. (Orchidaceae-Orchideae). In *Phyton: annales rei botanicae*.

- Trainito E.: *Orchidee d'Italia*, (2016) Guida alle orchidee spontanee. – GIROS, Gruppo Italiano per la Ricerca sulle Orchidee Spontanee, Il Castello, Via Milano, Cornaredo, Italia, p. 244.
- Tsiftsis, S., & Antonopoulos, Z. (2011). *Pseudorchis albida*: an enigmatic orchid of the Greek flora. *J. Eur. Orch*, 43(4), 795-806.
- Ullrich, W. R., Larsson, M., Larsson, C. M., Lesch, S., & Novacky, A. (1984). Ammonium uptake in *Lemna gibba* G 1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. *Physiologia plantarum*, 61(3), 369-376.
- Walker, D. J., Smith, S. J., & Miller, A. J. (1995). Simultaneous measurement of intracellular pH and K^+ or NO_3^- in barley root cells using triple-barreled, ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology*, 108(2), 743-751.
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., & Glass, A. D. (1993). Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of $13 NH_4^+$ influx across the plasmalemma). *Plant physiology*, 103(4), 1259-1267.
- Wang, R., Xing, X., & Crawford, N. (2007). Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 145(4), 1735-1745.
- Wu, J., Ma, H., Xu, X., Qiao, N., Guo, S., Liu, F., ... & Zhou, L. (2013). Mycorrhizas alter nitrogen acquisition by the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii*. *Annals of botany*, 111(6), 1181-1187.
- Vacin, E. F., & Went, F. W. (1949). Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical gazette*, 175-183.
- Van Waes J (1984) In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideën. Thesis, Rijkuniversiteit Gent. In: Rasmussen (1995).
- Van Waes, J.M., Debergh, P.C.: In vitro germination of some Western European orchids. - *Physiol. Plant.* 67: 253-261, 1986.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y. F., Nishimura, N., Chan, W. Y., Valerio, G., ... & Schroeder, J. I. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 452(7186), 487-491.
- Vasudevan, R., & Van Staden, J. (2010). In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 496-504.
- *Veyret, Y. (1969). 3. La structure des semences des Orchidaceae et leur aptitude à la germination in vitro en cultures pures. In Rasmussen 1992

- Vyhláška č. 252/2004 Sb. - Vyhláška, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
- WCSP: World Checklist of Selected Plant Families. - Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://apps.kew.org/wcsp/>. Přístup 5.8.2016.
- Virtanen, A. I., & Linkola, H. (1946). Organic nitrogen compounds as nitrogen nutrition for higher plants. *Nature*, 158(4015), 515-515.
- von der Fecht-Bartenbach, J., Bogner, M., Dynowski, M., & Ludewig, U. (2010). CLC-b-mediated NO⁻ 3/H⁺ exchange across the tonoplast of Arabidopsis vacuoles. *P*
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., & Glass, A. D. (1993). Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of 13 NH₄⁺ influx across the plasmalemma). *Plant physiology*, 103(4), 1259-1267.
- *van der Kinderen, G. (1987). Abscisic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. *Lindeleyana*, 2, 84-7. In: Rasmussen (1995).
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., & Frommer, W. B. (1997). Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*, 196(2), 191-199.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., & Frommer, W. B. (2000). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 254-261.
- von Wiren, N., Bergfeld, A., Ninnemann, O., & Frommer, W. B. (1997). OsAMT1-1: A high-affinity ammonium transporter from rice (*Oryza sativa* cv. Nipponbare). *Plant Mol. Biol*, 3, 681.
- Wilkins, K. A., Bancroft, J., Bosch, M., Ings, J., Smirnoff, N., & Franklin-Tong, V. E. (2011). Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of papaver. *Plant Physiology*, 156(1), 404-416.
- Wilkinson, K.G., Dixon, W., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L.: Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid associated bacteria. - *Plant Soil* 159: 291-295, 1994.
- Wotavová Novotná, K., Vejsadová, H., Kindlmann, P.: Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. – *Biol. Plant.* 51: 198-200, 2007.
- Wittig R. et Wittig M. (2007): *Epipactis helleborine* (L.) Crantz - the first (semi)ruderal orchid of Central Europe. - *Feddes Repetitorium*, Wienheim, 118"46-50.

- WCSP: World Checklist of Selected Plant Families. - Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://apps.kew.org/wcsp/>. Accessed 23.3.2016.
- Wu, J., Ma, H., Xu, X., Qiao, N., Guo, S., Liu, F., ... & Zhou, L. (2013). Mycorrhizas alter nitrogen acquisition by the terrestrial orchid *Cymbidium goeringii*. *Annals of botany*, 111(6), 1181-1187.
- Xiong, J., Fu, G., Yang, Y., Zhu, C., & Tao, L. (2012). Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research?. *Journal of experimental botany*, 63(1), 33-41.
- Yamagata, M., & Ae, N. (1996). Nitrogen uptake response of crops to organic nitrogen. *Soil science and plant nutrition*, 42(2), 389-394.
- Yamato, M., Iwase, K.: Introduction of asymbiotically propagated seedlings of *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae) into natural habitat and investigation of colonized mycorrhizal fungi. – *Ecol. Res.* 23: 329-337, 2008.
- 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.
- Yamasaki, H., Watanabe, N. S., Sakihama, Y., & Cohen, M. F. (2016). An Overview of Methods in Plant Nitric Oxide (NO) Research: Why Do We Always Need to Use Multiple Methods?. *Plant Nitric Oxide: Methods and Protocols*, 1-14.
- Ye, X., Rubakhin, S. S., & Sweedler, J. V. (2008). Detection of nitric oxide in single cells. *Analyst*, 133(4), 423-433.
- Yendrek, C. R., Lee, Y. C., Morris, V., Liang, Y., Pislariu, C. I., Burkart, G., ... & Lloyd, M. (2010). A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 62(1), 100-112.
- Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2014). Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist*, 202(4), 1142-1156.
- Yuan, L., Graff, L., Loqué, D., Kojima, S., Tsuchiya, Y. N., Takahashi, H., & von Wirén, N. (2009). AtAMT1; 4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology*, 50(1), 13-25.

- Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B., Le Bihan, T., Yu, M., ... & Pallas, J. A. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, 478(7368), 264-268.
- Zanin, L., Tomasi, N., Wirdnam, C., Meier, S., Komarova, N. Y., Mimmo, T., ... & Pinton, R. (2014). Isolation and functional characterization of a high affinity urea transporter from roots of *Zea mays*. *BMC plant biology*, 14(1), 222.
- Zelený, D. (2012). Poznámky k používání průměrných Ellenbergových indikačních hodnot při analýze vegetačních dat.
- Zeng, S., Wu, K., da Silva, J.A.T., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N., Duan, J.: Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. - *Sci. Hort.* 138: 198-209, 2012.
- Zhang, H., & Forde, B. G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 279(5349), 407-409.
- Zhang, H., Annich, G. M., Miskulin, J., Osterholzer, K., Merz, S. I., Bartlett, R. H., & Meyerhoff, M. E. (2002). Nitric oxide releasing silicone rubbers with improved blood compatibility: preparation, characterization, and in vivo evaluation. *Biomaterials*, 23(6), 1485-1494.
- Zhen, R. G., Koyro, H. W., Leigh, R. A., Tomos, A. D., & Miller, A. J. (1991). Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. *Planta*, 185(3), 356-361.
- *Ziegler H. (1981). Mikromorphologie der Orchideensamen unter Berücksichtigung taxonomischer Aspekte – Ph.D. thesis, Ruprecht Karls Universität, Heidelberg – In: Rasmussen (1995)

Sekundární citace jsou označeny *.

Příloha I.

Zásobní roztoky použité na přípravu kultivačních médií

Mo (1l)

objem	1 l
KH ₂ PO ₄	2,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,8 g
CaCL ₂	2,0 g

skladováno v chladničce

MS-B (500ml)

KI	0,083 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,860 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg
CoCl ₂	1,3 mg

Skladováno v chladničce

ViMi (100 ml)

thiamin (HCl)	0,020 g
pyridoxin (HCl)	0,020 g
kyselina nikotinová	0,020 g
kyselina listová	0,020 g

zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)

Fe (500 ml)

FeSO₄·7H₂O 2,78 g

Na₂EDTA·2H₂O 3,73 g

Obě složky byly rozpuštěny odděleně ve 200 ml destil

ované vody, zahřáty v mikrovlnné troubě na cca 80°C, poté byl roztok FeSO₄·7H₂O pozvolna přilít za stálého míchání k roztoku Na₂EDTA·2H₂O, stále mícháno až do vychladnutí, doplněno destilovanou vodou na objem 500 ml. zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)

zamraženo po 5 ml v nádobkách (-20°C)

Roztoky fytohormonů

Roztoky byly rozpuštěny v 1ml rozpouštědla a doplněny destilovanou vodou na koncentraci 1mg/ml

fytohormon	GA ₃	NAA	BAP	kinetin
rozpouštědlo	1M KOH	1 M NaOH	1 M NaOH	96% ethanol

Roztoky byly skladovány v ledničce

Příloha II

Předpisy pro přípravu kultivačních médií

MoN

MS-B	1,25 ml
Fe	1,25 ml
Mo	25 ml
ViMi	5 ml
kyselina citronová	0,15 g (300 µl roztoku)
yeast extract	0,5 g
casein enz. hydrolyzát	0,5 g
sacharóza	10 g
aktivní uhlí	0,5 g
agar	7g
pH	5,8

--- --

NaNO₃

	MoN0	MoN1	MoN10	MoN50	MoN100
NaNO ₃ [mg/l]	0	1,370774	13,70774	68,5387	137,0774
Roztoku [µl]	0	13,71	137,08	685,39	1370,77

pro roztok 0,1g / ml aq.

OMA3 - mykorhizní médium (11)

mleté ovesné vločky 3 g

agar 10 g

pH neřešit