

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Experimentální biologie rostlin



Bc. Zuzana Hudáková

Význam aminokyselin hubového původu pro metabolismus protokormov orchideí
The role of amino acids of fungal origin for the metabolism of orchid protocorms

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jan Ponert, Ph.D.

Praha, 2024

Čestné vyhlásenie

Čestne vyhlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Praha dňa

.....

Bc. Zuzana Hudáková

Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela pod'akovať svojmu školiteľovi RNDr. Janovi Ponertovi, Ph.D. za všetko, čo ma naučil a za podporu a ústretovosť pri procese písania diplomovej práce. Ďalej ďakujem kolektívu z lab. 007 za pomoc pri spracovaní praktickej časti, a to od prípravy kultivačných médií, cez výsev, až po analýzu na HPLC. V neposlednom rade ďakujem svojmu okoliu za podporu a nekonečnú trpezlivosť.

Abstrakt

Čeľad' vstavačovité (*Orchidaceae*) patrí medzi jednu z najväčších a najrozmanitejších čeľadí kvitnúcich rastlín. Orchidey prechádzajú zložitým vývojovým cyklom, ktorý zahŕňa mykoheterotrofnú fázu vývoja protokormov po vyklíčení semien. Hypotézou tejto práce je, že v rámci orchideoidne mykorhíznej symbiózy môže byť vyvíjajúcemu sa heterotrofnému protokormu dodávaný dostatok organického uhlíka a energie nielen z rozpustných sacharidov, ale aj z aminokyselín hubového pôvodu. Cieľom práce je pomocou axenických *in vitro* experimentov zistiť, ktoré vybrané aminokyseliny a iné látky môžu slúžiť ako významný zdroj uhlíka a energie u protokormov orchidey *Dactylorhiza majalis*. Podľa výsledkov experimentov nemôžu všetky testované aminokyseliny sami o sebe nahradiť exogénny rozpustný sacharid. Významnú úlohu v prenose uhlíka by však mohla mať kyselina glutámová, aj kyselina asparágová, ktoré významne podporovali rast protokormov. Pomerne dobrým zdrojom uhlíka bol pre protokormy tiež enzymatický hydrolyzát kazeínu. Je teda možné, že niektoré exogénne aminokyseliny by mohli orchideám slúžiť nielen ako zdroj dusíka, ale aj ako významný zdroj uhlíka.

Kľúčové slová: orchideoidná mykorhíza, *Dactylorhiza majalis*, aminokyseliny, pyruvát, prenos uhlíka, mykotrofia

Abstract

The orchid family (*Orchidaceae*) belongs to one of the largest and most diverse families of flowering plants. Orchids undergo a complex developmental cycle that includes a mycoheterotrophic stage of protocorm after seed germination. The hypothesis of this work is that within the orchid mycorrhizal symbiosis, the developing heterotrophic protocorm can be supplied with enough organic carbon and energy not only from soluble carbohydrates, but also from amino acids of fungal origin. The aim of the work is to find out which selected amino acids and other substances can serve as a significant source of carbon and energy for protocorms of the orchid *Dactylorhiza majalis* using axenic *in vitro* experiments. According to the results of this thesis, not every tested amino acid can replace the exogenous soluble carbohydrate. However, both glutamic acid and aspartic acid, which strongly supported the growth of protocorms, could play an important role in carbon transfer. Casein enzymatic hydrolysate was also a relatively good source of carbon for protocorms. It is therefore possible that some exogenous amino acids could serve orchids not only as a source of nitrogen, but also as a significant source of carbon.

Key words: orchid mycorrhiza, *Dactylorhiza majalis*, amino acids, pyruvate, carbon flow, mycotrophy

Obsah

Zoznam skratiek	7
Zoznam tabuliek	8
Zoznam grafov	9
Úvod	10
Ciele práce	11
1 Literárny prehľad	12
1.1 Charakteristika orchideí	12
1.2 Orchideoidná mykorhíza	15
1.3 Príjem a distribúcia látok	17
1.3.1 Uhlíkaté látky	18
1.3.2 Dusíkaté látky	23
1.3.3 Fosfor	25
1.3.4 Iné látky	26
2 Materiál a metódy	27
2.1 Kultivačné médiá	27
2.1.1 Zloženie kultivačných médií	27
2.1.2 Príprava kultivačných médií	28
2.1.3 Kultivácia	29
2.2 Dizajn experimentov	29
2.2.1 Kazeín enzymatický hydrolyzát	29
2.2.2 Detailné experimenty pre vybrané látky	30
2.3 Výsev semien	31
2.3.1 Pôvod a skladovanie semien	31
2.3.2 Sterilizácia a výsev semien	31
2.4 Zber a analýza dát	32
2.4.1 Fotodokumentácia	32
2.4.2 Obrazová analýza	32
2.4.3 Štatistická analýza	32
2.4.4 Zber rastlinného materiálu	33
2.5 Analýza obsahu sacharidov v rastlinnom materiáli	33
2.5.1 Extrakcia rozpustných sacharidov	33
2.5.2 Extrakcia škrobu	34
2.5.3 HPLC	36

3 Výsledky.....	37
3.1 Efekt vybraných látok na veľkosť protokormov	37
3.1.1 Kazeín enzymatický hydrolyzát	37
3.1.2 Kyselina glutámová.....	38
3.1.3 Glycín	39
3.1.4 Alanín.....	40
3.1.5 Kyselina asparágová	41
3.1.6 Pyruvát.....	42
3.2 Extrakcia rozpustných sacharidov	43
3.2.1 Kyselina glutámová.....	43
3.2.2 Glycín	46
3.2.3 Alanín.....	48
3.3 Extrakcia škrobu	50
3.3.1 Kyselina glutámová.....	50
3.3.2 Glycín	51
3.3.2 Alanín.....	52
4 Diskusia.....	54
4.1 Efekt vybraných aminokyselín a iných látok na veľkosť protokormov <i>D. majalis</i>	54
4.1.1 Kazeín enzymatický hydrolyzát	54
4.1.2 Kyselina glutámová a kyselina asparágová.....	55
4.1.3 Glycín	56
4.1.4 Alanín.....	57
4.1.5 Pyruvát.....	58
4.2 Efekt vybraných aminokyselín na obsah rozpustných sacharidov a škrobu v protokormoch <i>D. majalis</i>	58
4.3 Prenos uhlíka v orchideoidnej mykorrhíze	61
Záver	64
Použitá literatúra.....	65

Zoznam skratiek

OM – orchideoidná mykorhíza

OMF – orchideoidne mykorhízne huby (z angl. orchid mycorrhizal fungi)

NADH - nikotínamidadeníndinukleotid

RNA – kyselina ribonukleová (z angl. ribonucleic acid)

Zoznam tabuliek

<i>Tab. 1: Zloženie SMS média.....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 2: Zloženie roztoku RAM3_A.....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 3: Zloženie roztoku MS-B.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 4: Zloženie roztoku Fe.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 5: Zloženie roztoku MS-D-2.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 6: Dizajn experimentu 1.....</i>	<i>30</i>
<i>Tab. 7: Dizajn experimentov 2 až 5.....</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 8: Prídavok demineralizovanej vody pre analýzu rozpustných sacharidov.....</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 9: Zloženie Na-acetátového pufru.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 10: Zloženie enzymatického roztoku na štiepenie škrobu.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 11: Počet spracovaných vzoriek u jednotlivých variantov.....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 12: Obsah rozpustných sacharidov – experiment 2.....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 13: Obsah rozpustných sacharidov – experiment 3.....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 14: Obsah rozpustných sacharidov – experiment 4.....</i>	<i>48</i>

Zoznam grafov

<i>Graf 1: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 1.....</i>	<i>37</i>
<i>Graf 2: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 2.....</i>	<i>38</i>
<i>Graf 3: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 3.....</i>	<i>39</i>
<i>Graf 4: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 4.....</i>	<i>40</i>
<i>Graf 5: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 5.....</i>	<i>41</i>
<i>Graf 6: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 6.....</i>	<i>42</i>
<i>Graf 7: Extrakcia rozpustných sacharidov – experiment 2.....</i>	<i>45</i>
<i>Graf 8: Extrakcia rozpustných sacharidov – experiment 3.....</i>	<i>47</i>
<i>Graf 9: Extrakcia rozpustných sacharidov – experiment 4.....</i>	<i>49</i>
<i>Graf 10: Extrakcia škrobu – experiment 2.....</i>	<i>51</i>
<i>Graf 11: Extrakcia škrobu – experiment 3.....</i>	<i>52</i>
<i>Graf 12: Extrakcia škrobu – experiment 4.....</i>	<i>53</i>

Úvod

Počas evolúcie sa zástupcovia čeľade *Orchidaceae* adaptovali na niekoľko zvláštnych životných stratégií, vďaka ktorým by sa dali považovať za jednu z najrozmanitejších rastlinných čeľadí. Svoju variabilitu dokázali navýšiť schopnosťou osídľovať nové stanovištia, a to napríklad adaptáciou vzdušných koreňov a CAM metabolizmu u epifytických druhov (Givnish *et al.*, 2015), alebo jednoduchosťou a mikroskopickou stavbou semien, vďaka ktorým sú ľahko distribuované v prostredí (Rasmussen, 1995). Ďalšou zaujímavou charakteristikou semien zástupcov tejto čeľade je absencia endospermu (Yeung, 2017), kvôli čomu orchidey nemajú dostatočné zásoby na výživu klíčiaceho semena (Brink a Cooper, 1947). V raných štádiách vývoja preto aplikujú mykotrofný spôsob výživy (Rasmussen, 1995), ku ktorému dochádza naviazaním symbiotického vzťahu medzi hubovými jedincami a jedinečnou štruktúrou orchideí nazývanou protokorm (Yeung, 2017).

Dodnes nie je celkom známe, ktoré energeticky bohaté látky sú prenášané z húb do orchideí a vplyvajú na správny rast a vývoj týchto rastlín. Taktiež s určitosťou nevieme, akým spôsobom sú tieto živiny prenášané. Na základe vedeckých výsledkov predpokladáme, že vhodnými zdrojmi uhlíka a energie pre rastúcu orchideu sú pravdepodobne aminokyseliny alebo sacharidy, a to napríklad vďaka ich pomerne jednoduchej metabolizácii v pletivách. V diplomovej práci sa zaoberám otázkou, či by mykoheterotrofné protokormy boli schopné rásť bez prísunu rozpustných sacharidov a k rastu využívať výhradne aminokyseliny. V axenických kultúrach *in vitro* skúmam schopnosť heterotrofných protokormov orchidey *Dactylorhiza majalis* využívať vybrané aminokyseliny a pyruvát ako zdroj uhlíka a energie. Táto práca nadväzuje na diplomovú prácu, v ktorej bola skúmaná utilizácia sacharidových alkoholov protokormami *D. majalis*, rovnako ako aj aminokyselina glutamín, ktorá však, ako sa ukázalo, neslúži pre túto orchideu ako dostatočný zdroj uhlíka a energie (Dostálová, 2016).

Práca je rozdelená na niekoľko kapitol, pričom v prvej časti sa venujem teoretickým poznatkom z dostupnej literatúry na tému čeľade orchideí, ale i orchideoidnej mykorhízy a príjmu a distribúcie látok v nej. V ďalšej kapitole popisujem materiál a metódy použité pri praktickej časti výskumu. Predposledná kapitola je venovaná výsledkom experimentov, pričom sú do nej zahrnuté grafy a tabuľky s nazbieranými dátami a ich stručný popis. Na záver diskutujem nielen o možných vzťahoch v rámci získaných výsledkov, ale aj o súvislosti s dostupnou literatúrou.

Ciele práce

Hlavným cieľom diplomovej práce je zistiť, či môžu vybrané aminokyseliny a látky poskytovať dostatočný zdroj uhlíka a energie pre správny rast a vývoj protokormov orchidey *Dactylorhiza majalis*. Medzi čiastkové ciele patrí otestovanie efektu enzymatického hydrolyzáta kazeínu, kyseliny glutámovej, glycínu, alanínu, kyseliny asparágovej a pyruvátu na protokormy, a to bez prítomnosti alebo za prídavku ľahko využiteľnej sacharózy v axenických *in vitro* kultivačných prístupoch.

1 Literárny prehľad

1.1 Charakteristika orchideí

Čeľaď vstavačovité (*Orchidaceae*) je najrozmanitejšou a po čeľadi astrovité (*Asteraceae*) najväčšou čeľaďou cievnatých rastlín obsahujúc približne 736 rodov a asi 28 tisíc druhov (Chase *et al.*, 2015; Christenhusz a Byng, 2016), ktoré môžeme nájsť takmer po celom svete. Rozličné podmienky v jednotlivých biómoch si vyžiadali od orchideí vysokú variabilitu vo svojich adaptívnych vlastnostiach, čo sa najviac odráža na ich rastových návykoch a formách, v ktorých ich môžeme nájsť (Arditti, 1967). Čeľaď *Orchidaceae* je zložená z druhov s odlišnými nárokmi na stanovištia, ktoré obývajú. Približne dve tretiny zástupcov tejto čeľade sú epifytické alebo litofytické, zvyšnú tretinu tvoria druhy terestrické (Swarts a Dixon, 2009).

Epifytické orchidey vytvárajú vzťahy s hosťiteľskými rastlinami, ktoré im poskytujú správne prostredie a podmienky pre rast (Ai *et al.*, 2023), pričom zahŕňajú asi viac ako dve tretiny všetkých cievnatých epifytických rastlín (Zotz, 2013). Množstvo orchideí dokáže rásť len na vybranom rastlinnom druhu a okrem toho sa na jednej hosťiteľskej rastline spravidla usídľuje len niekoľko málo rôznych druhov orchideí, čo ešte viac posilňuje vysoko špecializované vzťahy medzi orchideou a jej hosťiteľom (Ai *et al.*, 2023). Epifytické orchidey sú charakteristické predovšetkým sukulentnými listami s CAM (z angličtiny crassulacean acid metabolism) spôsobom fixácie uhlíka v procese fotosyntézy (Winter *et al.*, 1983; Silvera *et al.*, 2009). Iné druhy zase adaptovali svoje korene na rôzne podmienky prostredia, napríklad pre zvýšenie príjmu uhlíkatých látok obsahujú v pletivách chloroplasty a vykazujú fotosyntetickú aktivitu (Ho *et al.*, 1983). Špeciálnym znakom vzdušných koreňov epifytických orchideí je ich pokrytie mŕtvymi bunkami, zrejme s taxonomicky špecifickým počtom vrstiev, nazývané velamen, ktorý má okrem základnej funkcie koreňa – absorpcie vody (Barthlott a Capesius, 1975) a príjmu živín (Zotz a Winkler, 2013), tiež schopnosť ochrany rastliny pred UV-B žiarením. To bolo dokázané pozorovaním hladiny flavonoidov v koreňoch epifytických druhov po vystavení tomuto typu radiácie, keďže fenolické látky, a to najmä flavonoidy, sú účinnými fotoprotektantmi. U terestrických orchideí však tento jav nebol pozorovaný (Chomicki *et al.*, 2015). Flavonoidy a lignín okrem toho slúžia ako bariéra proti prieniku húb do pletív rastliny, z čoho vyplýva, že kolonizované bývajú mladé pletivá a hýfy sa ďalej šíria priepustnými bunkami koreňa (Esnault *et al.*, 1994). Mykoheterotrofný spôsob výživy si

u niekoľkých druhov terestrických orchideí zrejme vyžiadal redukciu obsahu flavonoidov a neprítomnosť velamen v koreňoch (Chomicki *et al.*, 2014). Čo sa ďalej týka terestrických orchideí, tých typicky v priebehu roka vyrastie nad zem len obmedzený počet, pretože sú schopné počkať na vyžadované podmienky v dormantnom stave aj niekoľko rokov (Coates *et al.*, 2006).

V priebehu skúmania klíčenia semien u čeľade *Orchidaceae* by sa dalo vymedziť niekoľko etáp, ktoré pomohli k zlepšeniu predstavy o jej ontogenéze. Po jednoduchých pozorovaniach prišiel objav orchideoidnej mykorhízy, neskôr sa začalo brať do úvahy pôsobenie iónov, či komplexných organických látok, pričom tieto údaje sa často využívajú v taxonomickom rozlíšení jednotlivých druhov. Vzhľadom k veľkej variabilite tejto čeľade sú dodnes naše znalosti o podrobných potrebách pre rast orchideí obmedzené (Arditti, 1967). Od ostatných čeľadí sa orchidey odlišujú predovšetkým obrovským množstvom mikroskopických semien, ktoré sú pre ich miniatúrnu veľkosť v anglickom jazyku označované ako „dust seeds“ (Leake, 1994; Rasmussen a Whigham, 1993), čo by sa dalo do slovenčiny preložiť ako „prachové semená“. V jednej tobolke sa nachádza tisíc až milión semien, pričom každé váži len niekoľko jednotiek mikrogramov. Rozmermi spravidla nedosahujú viac ako 1 milimeter, vďaka čomu môžu byť semená jednoducho distribuované vetrom, zrážkami (Arditti a Ghani, 2000) a v ojedinelých prípadoch aj zoochoricky (Leake, 1994). Väčšina semien orchideí však napriek jednoduchej distribúcii prostredím v pôde sama nevyklíči, pretože nemá k dispozícii dostatočné množstvo zásobných látok (Rasmussen, 1995).

Semená orchideí obsahujú malé embryo guľovitého tvaru (Arditti, 1967) a v porovnaní s inými kvitnúcimi rastlinami sú popisované ako málo vyvinuté, keďže apikálne meristémy sú zakladané až v nasledujúcom vývojovom štádiu (Yeung, 2017). Embryá sú pokryté osemením, ktorého vlastnosti vo veľkosti, tvare, či farbe môžu byť veľmi rôznorodé (Arditti, 1967). Embryo orchideí síce obsahuje podiel lipidov a proteínov, ale tieto zásoby nie sú dostatočným energetickým zdrojom v počiatočných štádiách ich vývoja (Leake, 1994). Typicky u rastlín znamená porucha pri vývoji endospermu zastavenie vývinu embrya a jeho odumretie (Brink a Cooper, 1947), ale orchidey si neschopnosť vzniku funkčného endospermu kompenzujú mykotrofným spôsobom výživy (Eriksson a Kainulainen, 2011), čo znamená, že získavajú živiny vytvorením vzťahu s hubou (Merriam-Webster, 2024). Predpokladá sa, že u obligátne mykotrofných (holomykotrofných) druhov, ale aj u orchideí, ktoré sú v dospelosti plne heterotrofné, sú v procese klíčenia zapojené mykorhízne huby (Leake, 1994). Ako už bolo načaté vyššie, po embryonálnom štádiu vývoja semená orchideí klíčia v jedinečnú štruktúru nazývanú protokorm, ktorý je spočiatku tvorený najmä

parenchymatickými bunkami. Tento útvar je zodpovedný za tvorbu apikálneho meristému nadzemnej časti rastliny a je hlavným miestom, kde prebieha mykotrofná výživa (Rasmussen, 1995; Yeung, 2017).

Správny proces vyklíčenia semena v protokorm umožňuje naviazanie vzťahu s hubou, ktorá rastlinu vyživuje, pričom významná je druhová špecifita rastliny aj huby (Rasmussen a Whigham, 1993). Semeno schopné klíčiť umiestnené na kultivačné médium obsahujúce sacharidy začína pučať a prechádza sledom metabolických aktivít, ktoré zahŕňajú aj rozklad lipidov a zásobných proteínov a tvorbu škrobu (Manning a Staden, 1987). Aj keď u niektorých orchideí bol bez prídavku exogénnej glukózy po rehydratácii semien pozorovaný čiastkový rozklad proteínov, pre rozklad lipidov je nutné dodať sacharid z vonkajšieho prostredia (Leake, 1994). Okrem vzniku orchideoidne mykorhízneho vzťahu sú však pre vyklíčenie dôležité aj ďalšie faktory, ako napríklad dostupnosť svetla, ale aj kvalita a vlhkosť pôdy (Arditti, 1967). Orchideoidnej mykorhíze sa bližšie venuje nasledujúca kapitola.

Podľa spôsobu výživy rozlišujeme orchidey na mykoheterotrofné a autotrofné (zelené) druhy. Zelené orchidey sú v raných štádiách vývoja iniciálne mykoheterotrofné, tzn. schopné získavať uhlík od húb, pričom neskôr u nich vznikajú fotosynteticky aktívne orgány. Činnosť fotosyntetického aparátu môže v neskorších fázach života orchideí viesť k zmene na autotrofný spôsob príjmu živín (Rasmussen, 1995; Smith a Read, 2008), ale častokrát aj dospelé zelené rastliny prijímajú časť uhlíkatých látok od mykorhíznych húb (Selosse a Martos, 2014).

Achlorofylné, alebo úplne mykoheterotrofné druhy orchideí celkom stratili schopnosť fotosyntetizovať, a preto obligátne získavajú živiny od hubového partnera po celý svoj život (Rasmussen, 1995; Smith a Read, 2008). Pre tieto rastlinné druhy je typická redukcia veľkosti plastidového genómu, čo spôsobuje vypustenie génov kódujúcich napríklad NADH a ribozomálne komponenty, či gény pre fotosyntézu. To zapríčiňuje aj limitáciu génu pre plastidovú RNA-polymerázu, ktorá inak slúži na transkripciu vyššie popísaných skupín génov (Schelkunov *et al.*, 2015). Niektoré achlorofylné rastliny nedokážu kvôli redukovanému plastómu zabezpečiť základné metabolické procesy, ako biosyntézu aminokyselín, mastných kyselín a ďalších energeticky bohatých uhlíkatých a dusíkatých zlúčenín (Wolfe *et al.*, 1992) a sú preto odkázané na parazitický alebo symbiotický spôsob života. Úplná mykoheterotrofia v prírode nie je veľmi častá, vyskytuje sa u asi 1 % kvitnúcich rastlín, ale nájdeme ju aj u machorastov a nahosemenných rastlín. Svoje pozorovania o ontogenéze nefotosyntetizujúcej orchidey *Neottia nidus-avis* zhrnul Bernard v roku 1899

ako prežívanie jedincov v mykorhíznej symbióze po celú dobu ich vývoja (Selosse *et al.*, 2017; Bernard, 1899).

Prechodný stupeň medzi plne mykoheterotrofnými a autotrofnými druhmi označujeme ako mixotrofné, alebo čiastočne mykoheterotrofné rastliny (Selosse a Martos, 2014). Mixotrofný spôsob výživy umožňuje orchideám vyššiu plasticitu napríklad za nevhodných svetelných podmienok prostredia, keď účinnosť ich fotosyntézy nie je dostatočne vysoká na to, aby pokryla vlastné nároky na uhlík (Girlanda *et al.*, 2006). Na rozdiel od iných rastlín, orchidey nevytvárajú „klasický“ koreňový systém, ale ich korene sú málo vetvené a menej početné. Kvôli ich výraznej hrúbke a červovitému tvaru nemajú tak veľký povrch, aby mohli prijímať živiny priamo z pôdy. Výrazným morfológickým rozdielom je redukovaný koreň u rastlín, ktoré preferujú mixotrofný spôsob výživy. Bolo pozorované, že rastliny s menším koreňovým systémom majú vyššie nároky na dodanie týchto látok z pôdy a predstavujú tak extrémnu závislosť na svojom mykorhíznom vzťahu (Leake, 1994).

1.2 Orchideoidná mykorhíza

Orchideoidná mykorhíza (OM) je špecifická asociácia semien zástupcov čeľade *Orchidaceae* s mykorhíznyimi hubami (Tedersoo *et al.*, 2020). Predstavuje ich asi 100 rôznych druhov húb, najčastejšie patria k rodu *Rhizoctonia* (He *et al.*, 2010), ale bežné sú aj rody *Ceratohiza*, *Epulorhiza* alebo *Moniliopsis*, všetky patriace do čeľade *Ceratobasidiaceae* (Zelmer *et al.*, 1996). Presné taxonomické zaradenie orchideoidne mykorhíznych húb (OMF) je možné až po analýze DNA, keďže mycéliá v pletivách netvorí žiadne druhovo špecifické štruktúry. Štúdium špecificity OMF na molekulárnej úrovni by však mohlo výrazne pomôcť pri ochrane ohrozených druhov orchideí (Hossain, 2022). Mykorhízna symbióza zabezpečuje v ekosystéme tok látok medzi hubami a rastlinami pomocou mykorhíznych sietí v pôde. Závislosť na príjme látok od mykorhíznych partnerov a špecifický výber OMF u orchideí výrazne ovplyvňuje lokálne rozšírenie týchto rastlín v ekosystéme a ich schopnosť sa rozmnožovať (Waller *et al.*, 2018). Hlavným benefitom mykorhízneho vzťahu pre rastlinu je dodanie živín a vody od hubového partnera pre jej klíčenie a ďalší vývoj (Arditti, 1967). Vyskytuje sa u všetkých typov orchideí (Dearnaley *et al.*, 2016), medzi týmito skupinami je však rozdiel v trvaní vytvoreného mykorhízneho vzťahu. U niektorých druhov pozorujeme mykoheterotrofiu len v iniciálnych štádiách – doplnok pred ziskom energie z vlastnej fotosyntézy, iné sú odkázané na kompenzáciu energie z fotosyntézy výživou od húb po celú

dobu života (Rasmussen, 1995; Rasmussen a Whigham, 2002). Nebolo však vedecky potvrdené, že by sa orchidey živili odumierajúcimi zvyškami organizmov v pôde, takže sa dá s určitosťou povedať, že nejde o saprofytizmus, ako sa častokrát o mykoheterotrofných druhoch orchideí nesprávne tvrdí (Leake, 2005).

Spôsob iniciálneho kontaktu medzi OMF a orchideou sa pravdepodobne líši od druhu oboch partnerov (Hadley a Williamson, 1971) a môže mať dve dráhy – prvou je kolonizácia suspenzoru a druhou kolonizácia cez rhizoidy, pričom miesto prieniku hýfy do pletiva môže rozhodovať o úspešnosti vzniku mykorhízneho vzťahu (Yeung, 2017). Zatiaľ čo rhizoidná kolonizácia je podmienená diferenciáciou buniek a ich vakuolizáciou, suspenzor môže byť kolonizovaný v štádiu pučania semena, kde by mykorhízny partner mohol dodávať živiny už pri samotnom klíčení. Niektoré druhy orchideí ale pomocou obranných mechanizmov inhibujú kolonizáciu suspenzoru, čo znamená, že semeno musí investovať časť svojich zásobných látok do tvorby rhizoidov a OMF kompenzujú limitované množstvo živín v rastline takmer okamžite po kolonizácii, čo bolo dokázané prudkým nárastom veľkosti buniek a obsahu škrobových zŕn v nich (Rasmussen, 1990). Špecifita orchideoidne mykorhízneho vzťahu teda môže byť vymedzená spôsobom kolonizácie OMF a prítomnosťou suspenzoru v raných štádiách vývoja orchideí (Yeh *et al.*, 2019).

Dalo by sa tvrdiť, že OMF kolonizujú v rozličných životných štádiách orchideí rôzne časti týchto rastlín (Zhao *et al.*, 2021). V raných štádiách je iniciálnym miestom kolonizácie protokorm, ktorý predstavuje achlorofylné pletivo (Peterson a Farquhar, 1994), ale hýfy OMF boli nájdené dokonca aj v kvetnej stopke a v piestiku (Selosse *et al.*, 2017). Napriek tomu tento vzťah nazývame mykorhízou (Peterson a Farquhar, 1994), pretože hýfy hubového partnera sa dostávajú aj do koreňov orchideí (Dearnaley *et al.*, 2016).

Orchideoidne mykorhízne huby kolonizujú pletivá orchideí a vytvárajú charakteristickú spleť hýf do tvaru závitú, ktoré nazývame pelotóny (Rasmussen, 1995). Hubové pelotóny nevstupujú priamo do rastlinnej cytoplazmy, ale sú od bunkového obsahu rastliny oddelené plazmatickou membránou a interfaciálnou matrix (Uetake *et al.*, 1997). Zatiaľ čo prítomnosť mladých hubových vlákien v rastlinnom pletive vedie k ďalšej kolonizácii a tvorbe nových pelotónov, zmotané hubové hýfy sú v hostiteľovi po čase lýzované a menia sa na žltohnedé zhluky, ale podrobný mechanizmus tohto procesu nepoznáme (Rasmussen, 1995; Rasmussen a Whigham, 2002; Selosse *et al.*, 2017). Staršie korene obsahujú v bunkách primárnej kôry vyšší počet degradovaných pelotónov, než nájdeme u mladších rastlín (Sathiyadash *et al.*, 2012). V bunkách primárnej kôry koreňov, ktoré po určitú časť roka bežne obsahujú veľké zásoby škrobových zŕn (Leake, 1994), boli

pozorované väčšie zásoby škrobu u nekolonizovaných (Kuga *et al.*, 2014) a u čerstvo kolonizovaných pletív. Naopak v rastlinách obsahujúcich rozpadnuté pelotóny bolo zistené menšie zastúpenie škrobových zŕn (Peterson a Currah, 1990), čomu napovedá, že vytvorenie OM vedie v koreňoch rastliny k hydrolýze škrobu (Leake, 1994).

Ako už bolo spomenuté v predošlej kapitole, klíčenie semien je u orchideí propagované hubami, čo je dôležité kvôli absencii endospermu, ktorého funkciou je okrem iného aj výživa embrya (Zhao *et al.*, 2021). Po kolonizácii hubami sa zásobné lipidy a proteíny v semene zložito metabolizujú na zásobné polysacharidy. U rôznych rastlinných čeľadí prebiehajú tieto metabolické procesy v rozličnom poradí a rôznou rýchlosťou. Napríklad u *D. majalis* bola najskôr pozorovaná hydrolýza proteínov sprevádzaná vakuolizáciou a tvorbou škrobových zŕn, pričom zásoby lipidov ostávali v pletivách po dlhšiu dobu (Rasmussen, 1990). Semená rodu *Dactylorhiza* vyžadujú k správne mu klíčeniu v mykorhíznom vzťahu aspoň dva týždne bez prístupu svetla, kolonizované semená kultivované v *in vitro* podmienkach vykazujú vysokú citlivosť k bielemu svetlu (Rasmussen, 1990; Harvais a Hadley, 1967).

1.3 Príjem a distribúcia látok

Mykorhízne siete v pôde vo všeobecnosti zabezpečujú translokáciu živín medzi rastlinami, čím prispievajú k recyklácii uhlíka, dusíka a fosforu na globálnej úrovni. Uvádza sa, že z celkového príjmu živín rastlinou sa môže až 80 % dusíka a fosforu získať z hubového partnera vďaka mykorhíznym symbiózám (Heijden *et al.*, 2015), za čo mykorhízne huby od autotrofných rastlín čerpajú uhlíkaté zlúčeniny (Smith a Read, 2008). Okrem prenosu týchto prvkov sa môžu mykorhíznym partnerom distribuovať aj minerály a voda. Zároveň, udržiavanie tohto vzťahu môže mať aj iné výhody, napríklad poskytnutie prostredia a stabilných podmienok pre život OMF v pletivách rastliny (Leake, 1994). Orchideoidná mykorhíza je zvláštna tým, že podľa Camerona (Cameron *et al.*, 2006) je v raných štádiách vývoja orchideí tok uhlíka jednostranný v smere od huby k rastline, a to kvôli neschopnosti protokormov fotosyntetizovať (Peterson a Farquhar, 1994). Po dosiahnutí fotosyntetickej aktivity u zelených orchideí už je prenos látok medzi rastlinou a OMF obojstranný (Cameron *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2008). Avšak, poznáme tiež achlorofylné plne mykoheterotrofné druhy, ktoré sú na prísune uhlíka od OMF závislé po celý život (Leake, 1994). Rozlišujeme dva spôsoby prenosu živín z OMF do orchidey. Prvým je zabezpečenie toku látok pomocou

interfáciálnej matrix medzi neporušenými pelotónmi a rastlinnými membránami a druhým je lýza pelotónu v rastlinných pletivách a následný príjem týchto látok orchideou (Kuga *et al.*, 2014; Dearnaley a Cameron, 2017; Leake, 1994).

Je zrejmé, že orchideoidne mykorhízne huby dodávajú orchideám látky potrebné pre ich rast nielen v raných fázach vývoja, ale u niektorých druhov aj po celú dobu života, a to bez závislosti na ich fotosyntetickej aktivite (Rasmussen, 1995). Čo však dlho nebolo zjavné, je to, či aj nefotosyntetizujúce orchidey poskytujú nejaké látky svojmu mykorhízному partnerovi, a či tento vzťah máme nazývať mutualizmom, alebo skôr parazitizmom. Leake (1994) tvrdí, že vzhľadom na nároky orchideí by bolo množstvo uhlíka prijaté degradáciou pelotónov pre ich metabolizmus nedostačujúce. Ďalej by podľa neho mal existovať mechanizmus, ktorý zabezpečuje, že uhlíkaté látky nie sú prenášané z orchideí naspäť do húb. Sekvenovaním genómu dvoch druhov obligátne mykotrofnej orchidey *Gastrodia* sa zistilo, že v porovnaní s autotrofnými rastlinami je jej genóm znateľne menší, ale zato kompatibilnejší pre vzťah s hubovým partnerom. V týchto rastlinách boli nájdené okrem iného gény pre biosyntézu tryptofánu a mastných kyselín, či syntézu a degradáciu škrobu. Prítomnosť génov pre rôzne transportéry, napríklad pre transmembránový prenos aminokyselín, transportéry amónneho kationu alebo mastných kyselín, nasvedčujú tomu, že existuje obojstranná výmena látok medzi OMF a koreňmi orchideí (Jiang *et al.*, 2022; Fochi *et al.*, 2017b). Distribúcia živín z rastliny do huby však ale pravdepodobne nie je tak silná, ako pri opačnom smere, teda z huby do orchidey (Jiang *et al.*, 2022).

1.3.1 Uhlíkaté látky

Klíčiace semeno orchidey dostáva od naviazaného mykorhízneho partnera okrem iného uhlík (Dearnaley a Cameron, 2017), ktorý ektomykorhízne druhy húb pravdepodobne získavajú v podobe produktov fotosyntézy priamo zo stromov, s ktorými sú súčasne v mykorhíznom vzťahu (Lallemand *et al.*, 2019; Hynson *et al.*, 2013). Na základe skúmania ťažkého izotopu ^{13}C , sa dá odhadnúť, koľko uhlíka mixotrofná orchidea dokázala asimilovať fotosyntézou (Hynson *et al.*, 2013), a koľko látok bolo prenesených mykorhíznymi hubami pomocou mykorhíznych sietí z autotrofných rastlín v okolí (Mayor *et al.*, 2009).

Väčšina druhov zelených orchideí je v dospelosti plne autotrofná a uhlík fixuje samostatne v procese fotosyntézy (Leake, 2005). To potvrdil aj experiment na zelenej orchidei *Goodyera repens* s prídavkom nerozpustného sacharidu celulózy v kultivačnom médiu, ktorý viedol k zastaveniu transportu uhlíka z OMF do rastliny po začiatku jej fotosyntetickej aktivity (Alexander a Hadley, 1985). Napriek tomu, niektoré druhy zelených orchideí,

podobne ako druhy achlorofylné, prijímajú uhlíkaté látky z OM vzťahu po celý svoj život, pretože prítomnosť zelených pigmentov v pletivách nemusí znamenať, že v rastline prebieha fotosyntéza (Leake, 2005; Leake, 1994).

Podľa Hadleya a Purvesa (1974) nebolo experimentálne dokázané, že by rastlina poskytovala fotosynteticky fixovaný uhlík svojmu hubovému partnerovi, ako je známe u iných typov mykorhíz alebo u parazitizmu. Je možné, že OMF nie sú závislé na metabolitoch od svojho orchideového hostiteľa, pretože majú k dispozícii dostatok uhlíkatých látok prepojením myceliálnych sietí v pôde. Cameron so svojimi tímami (2006; 2008) však ako jedni z prvých potvrdili obojstranný transport uhlíka medzi hubou a orchideou, a to skúmaním značeného izotopu uhlíka ^{14}C , ktorý bol dodaný OMF ako aminokyselina, následne transportovaný a respirovaný dospelou fotosynteticky aktívnou orchideou *G. repens* a znova prijatý hubou vo forme oxidu uhličitého.

Ako už bolo popísané vyššie, poznáme dva typy transportu látok z huby do rastliny, a to cez živé hýfy, alebo ich degradáciou v pletivách orchidey (Dearnaley a Cameron, 2017). Zatiaľ ale nie je celkom jasné, ako prebieha samotný transport uhlíka medzi OMF a rastlinou, ani v akých formách si ho rastlina ukladá (Leake, 1994). Výsledky experimentov, ktoré viedla Kuga a jej tím (2014) však potvrdzujú, že uhlíkaté látky môžu byť prenášané zo živých, aj degradujúcich vlákien OMF do orchidey. Pozorovaním zvýšeného obsahu značeného uhlíka ^{13}C na rozhraní senescentného pelotónu bolo dokázané, že uhlík môže byť transportovaný do buniek orchidey počas degradácie hubových vlákien. Následná distribúcia uhlíka rastlinnými pletivami bola preukázaná rovnomernou distribúciou značeného uhlíka v cytoplazme buniek obsahujúcich senescentné pelotóny. Avšak, značený uhlík bol prenášaný aj pomocou intaktných hýf, keďže jeho koncentrácia v amyloplastoch buniek bola vyššia v miestach s mladými pelotónmi, než v bunkách bez nich. Okrem toho taktiež popisujú rozdiely v obsahu amyloplastov u kolonizovaných a nekolonizovaných pletív. U nekolonizovaných pletív sa zvyšuje veľkosť a množstvo amyloplastov v bunkách a naopak, v kolonizovaných pletivách dochádza k hydrolýze škrobu a dediferenciácii amyloplastov na proplastidy. Uhlík je pravdepodobne prenášaný z OMF do buniek rastliny počas hydrolýzy škrobu v amyloplastoch, čo by mohlo znamenať, že rozklad škrobu a zvýšená tvorba sacharózy ešte viac posilňujú tok uhlíka z huby do orchidey (Kuga *et al.*, 2014).

Z *in vitro* experimentov na terestrických druhoch orchideí bolo dokázané, že semená mnohých druhov dokážu vyklíčiť za prítomnosti špecifických druhov húb, ale aj len za prídavku uhlíkatých zlúčenín, ktoré reprezentujú látky charakteristické pre hubový metabolizmus (Peterson a Farquhar, 1994). Ektomykorhízne huby tvoriace OMF môžu byť

zároveň v mykorhíznom vzťahu so stromami, z ktorých prijímajú sacharózu a ukladajú ju vo forme manitolu, trehalózy a glykogénu (Lewis a Harley, 1965). Orchidey však nie sú schopné spracovávať, ani využívať exogénne polysacharidy zložené z glukózových podjednotiek, ako škrob alebo celulóza a uprednostňujú rozpustné sacharidy (Ernst a Arditti, 1990; Ernst *et al.*, 1971). Nižšie v texte sú rozpísané výsledky niekoľkých experimentov skúmajúcich vybrané sacharidy a cukorné alkoholy.

Galaktóza môže u orchideí viesť k zmenám priepustnosti membrán a letálnemu poškodeniu buniek, a to aj za nízkych koncentrácií, pri ktorých za použitia iných sacharidov, napríklad glukózy a fruktózy, nebolo pozorované žiadne poškodenie vnútorných štruktúr rastliny (Ernst *et al.*, 1971). V experimentoch na protokormoch vybraných orchideí bolo u médií s prídavkom galaktózy zistené spomalenie rastu a poškodenie embryí v raných fázach ich vývoja (Ernst *et al.*, 1971; Ponert *et al.*, 2021).

Hadley (1984) skúmal účinok značenej ^{14}C glukózy v médiu na troch druhoch intaktných a kolonizovaných zelených orchideí – *Goodyera repens*, *Dactylorhiza purpurella* a *Cymbidium*. Značený izotop uhlíka bol v mycéliu nájdený vo forme trehalózy a manitolu. Transport látok z huby do rastliny začal až po osídlení pletív hýfami, pričom v rastline bol izotop uhlíka súčasťou glukózy, fruktózy a sacharózy, ale nájdený bol aj v štruktúre trehalózy. U orchidey *G. repens* boli pozorované rozdiely v rýchlosti akumulácie značeného uhlíka. V kolonizovaných pletivách bolo po prídavku glukózy pozorované vyčerpanie zásob škrobu, vďaka čomu rastlina dokázala rýchlo rásť, naopak pre intaktnú rastlinu bol charakteristický zase pomalý rast a vyššie množstvo uloženého škrobu, ktorý protokormy akumulujú pri pretrvávajúcej absencii mykorhízneho vzťahu (Purves a Hadley, 1976). U skúmaných rastlín vedie naviazanie mykorhízneho vzťahu aj k zmene rýchlosti využitia pridanej glukózy. Nekolonizované protokormy *D. purpurella* obsahovali menej značeného uhlíka, než kolonizované protokormy, čo je pravdepodobne spôsobené zníženou schopnosťou naviazať rozpustné sacharidy a zapojiť ich do metabolizmu (Hadley, 1984).

Orchidey však podľa výsledkov niektorých experimentov uprednostňujú fruktózu pred glukózou (Arditti, 1967; Ernst *et al.*, 1971), keďže pomer týchto dvoch monosacharidov u orchideí kultivovaných na médiu s prídavkom sacharózy, ukazoval vyšší obsah fruktózy v pletivách a vyšší obsah glukózy v médiu (Ernst *et al.*, 1971). Na orchidei *Oeceoclades decaryana* bol zase pri prídavku fruktózy a zmesi glukózy s fruktózou pozorovaný významný rast protokormov, avšak nedosahovali takých veľkostí, ako pri prídavku samotnej glukózy, či sacharózy, ktorá spomedzi vybraných sacharidov dosahovala úplne najlepších výsledkov (Ponert a Lipavská, 2017). Kultiváciou hubových vlákien na médiu so značeným izotopom

^{14}C vo fruktóze sa zistilo, že daný izotop uhlíka sa v hube objavil tiež ako manitol (Smith, 1967). Cukorné alkoholy ako manitol a sorbitol dokážu u rôznych druhov orchideí vykazovať široké spektrum účinku (Ponert a Lipavská, 2017; Ponert *et al.*, 2021). V experimentoch s orchideou *Bletia purpurea* bolo pozorované, že prídavok rôznych koncentrácií manitolu alebo sorbitolu do kultivačných médií nevedie oproti kontrole k významnému efektu na klíčenie, či rast protokormov. Malý prídavok fruktózy a sacharózy dokáže v zmesi s manitolom zvýšiť klíčivosť a môže mať pozitívny efekt na vývoj protokormov a rhizoidov tejto orchidey. Naopak, vyššie koncentrácie sorbitolu spôsobili aj za vyšších koncentrácií pridanej fruktózy a sacharózy skôr negatívny účinok (Johnson a Kane, 2013). Cukorné alkoholy zrejme nepatria medzi významné látky v prenose a asimilácii uhlíka v OM (Smith, 1967), pretože ako sa ukázalo, niektoré druhy orchideí nevedia vo veľkej miere využívať exogénny manitol, ani sorbitol (Ernst, 1967; Johnson a Kane, 2013; Ponert a Lipavská, 2017; Ponert *et al.*, 2021). To bolo okrem *B. purpurea* (Johnson a Kane, 2013) pozorované aj u *D. majalis* (Ponert *et al.*, 2021) alebo *Ophrys iricolor* (Ponert a Lipavská, 2017).

Trehalóza je disacharid, ktorý sa v hubách vyskytuje v relatívne vysokých koncentráciách (Jorge *et al.*, 1997). S postupom evolúcie sa však jej obsah v rastlinách rapídne znížil a zvýšená koncentrácia trehalózy v pletivách môže byť spájaná s rôznymi interakciami rastlín s okolím. Tento disacharid býva tiež označovaný ako signálny metabolit rastlín, či faktor ich nákazlivosti patogénmi (Lunn *et al.*, 2014). Smithová (1967) vo svojich experimentoch ošetrovala protokormy *D. purpurella* prídavkom trehalózy so značeným izotopom ^{14}C , čo ukázalo spotrebu trehalózy kvôli poklesu jej obsahu v médiu a nárast koncentrácie sacharózy v protokormoch. Stále nie je jasné, či orchidea prijíma trehalózu až po jej hydrolýze v hube, alebo je schopná prijať neporušenú trehalózu a sama ju rozštiepiť na dve molekuly glukózy (Leake, 1994), keďže obaja mykorhízni partneri sú schopní efektívnej trehalázovej aktivity (Smith, 1967; Ponert *et al.*, 2021). Prídavok špecifického inhibítora trehalázy, Validamycínu A, do asymbiotických kultúr protokormov *D. majalis* s prídavkom trehalózy zastavil ich rast, keďže veľkosť týchto protokormov bola podobná veľkostiam protokormov v kontrolných kultúrach bez prídavku rozpustných sacharidov do média. Validamycín A podľa Ponerta (2021) výrazne vplýva na utilizáciu trehalózy v protokormoch. To bolo dokázané vyšším obsahom trehalózy a nižšou koncentráciou glukózy a sacharózy v pletivách pri prídavku inhibítora, ale vyšším obsahom glukózy, ak inhibítor trehalázy nebol pridaný. Inhibícia trehalázovej aktivity viedla k zastaveniu rastu protokormov, čo nasvedčuje tomu, že jednou z významne prijímaných uhlíkatých látok z OM je práve trehalóza (Smith, 1967; Ponert *et al.*, 2021).

Rast protokormov na médiu s rafinózou je veľmi pomalý. Rafinóza síce podporuje vývoj protokormov, ale veľkosťou nedosahujú takých rozmerov, ako na médiu so sacharózou (Arditti, 1967). To môže byť spôsobené prítomnosťou galaktózy v tejto štruktúre (Ernst *et al.*, 1971), keďže rafinóza je trisacharid zložený práve z galaktózy a fruktózy prepojených glukózou. Na rovnakom princípe sa ukázali ako nevhodné aj ďalšie zložené sacharidy obsahujúce podjednotku galaktózy, ako napríklad laktóza, stachyóza alebo melibióza (Ernst *et al.*, 1971).

Ponert a Lipavská (2017) vo svojich pokusoch na *Ophrys iricolor* skúmali, ktoré sacharidy by mohli byť vhodným zdrojom uhlíka pre klíčiace semená orchideí. Sacharóza je podľa nich sacharidom, ktorý má najvýraznejší vplyv na veľkosť protokormov, pričom fruktóza, glukóza a trehalóza by sa mohli zaradiť na rovnakú úroveň kvality zdroja energie, ako sacharóza (Arditti, 1967). Dalo by sa teda zhrnúť, že významnú rolu v metabolizme orchideí hrajú fruktóza a glukóza a zložené sacharidy, ktoré obsahujú práve tieto dve cukorné jednotky, pričom značne je to sacharóza (Ernst *et al.*, 1971; Purves a Hadley, 1976, Avigad *et al.*, 1982) a trehalóza (Smith, 1967; Ernst, 1971; Ponert *et al.*, 2021). Tieto závery môžu nepriamo poukazovať na látky, ktoré by mohli byť do orchideí prenášané od hubového partnera v OM. Keďže pozitívne vplyvajú na rast a vývoj protokormov a v pôde sa bežne nevyskytujú v koncentráciách, ktoré by pokryli nároky klíčiacych orchideí, predpokladáme, že sú rastline dodávané od OMF (Smith, 1966; Ernst *et al.*, 1971).

Ako ďalší dôležitý zdroj energie pre rastúce protokormy by sa dali považovať aminokyseliny hubového pôvodu (Cameron *et al.*, 2006; Alghamdi, 2019), z ktorých je do orchideí dodávaný uhlík a dusík (Martin a Botton, 1993; Bougoure *et al.*, 2010; Alghamdi, 2019). To ukázal aj experiment porovnávajúci niekoľko anorganických aj organických zlúčenín, v ktorom mala najvýznamnejší efekt na rast orchideí práve prítomnosť glycínu so značeným ^{13}C a ^{15}N . Okrem toho bol pozorovaný dominantný prenos uhlíka nad dusíkom. Tieto výsledky by mohli viesť k záveru, že OMF orchideám zabezpečujú primárne prísun uhlíka (Cameron *et al.*, 2006; Alghamdi, 2019), ale že aminokyseliny môžu rastlinám slúžiť ako dobrý zdroj oboch týchto prvkov (Persson a Näsholm, 2001).

Dostálová (2016) vo svojej diplomovej práci skúmala klíčivosť semien a rast protokormov *D. majalis* a *Anacamptis morio* na kultivačných médiách s prídavkom glutamínu (100 mM) a rôznych sacharidov. Zo všetkých variantov boli najmenšie protokormy namerané pri prídavku glutamínu, ktorý výrazne negatívne ovplyvňoval rast oboch druhov orchideí. Ďalej bolo zistené, že najväčší efekt na rast protokormov mal prídavok sacharózy a manózy, ale protokormy oproti kontrole rástli aj na médiách s ďalšími sacharidmi. Čo sa týka klíčivosti

semien, tá bola u *A. morio* vo variantoch s prídavkom glutamínu výrazne vyššia, ako u *D. majalis*. Glutamín však pravdepodobne nie je pre orchidey dobre využiteľný zdroj uhlíka a rozpustné sacharidy sú pre rastúce protokormy zrejme lepším zdrojom energie (Dostálová, 2016; Ponert *et al.*, 2021). Kvôli vysokej variabilite čeľade *Orchidaceae* a špecifickosti ich mykorhíznych partnerov však nemôžeme generalizovať účinok jednotlivých uhlíkatých látok na vývoj a rast protokormov u jej zástupcov (Ponert a Lipavská, 2017).

1.3.2 Dusíkaté látky

Orchidey sú na OMF závislé okrem uhlíka aj na príjme dusíka, na ktorý majú relatívne vysoké nároky kvôli rozličným životným stratégiám a spôsobom výživy, napríklad u mykoheterotrofných druhov zapríčiňuje nedostatočný príjem látok ich nedokonalý koreňový systém (Gebauer a Meyer, 2003). Epifytické orchidey sa adaptovali na špecifické podmienky vyvinutím unikátnych mechanizmov, ako je velamen, na príjem živín zo zrážok alebo trusu živočíchov. Keďže zrážky, z ktorých získavajú najmä dusík a síru, nie sú v prírode pravidelné, dusíkaté látky si zabezpečujú aj cez mykorhíznu symbiózu (Biswas *et al.*, 2021). Gebauer a Meyer (2003) zistili, že listy mykoheterotrofných orchideí, a o čosi menej aj autotrofných orchideí, obsahovali vyššie koncentrácie dusíka, ako iné rastliny z rovnakých lokalít bez závislosti na type, či prítomnosti mykorhízneho vzťahu. To podporuje predstavu o konštantnom toku látok medzi OMF a rastlinou, a to aj po dosiahnutí jej dospelosti.

Najnovšie štúdie ukazujú, že preferovanou formou dusíka prijímaného OMF z prostredia, ktorý je do nich transportovaný špecifickými membránovými prenášačmi, je ľahko dostupný amónny kation, na rozdiel od zložitých zlúčenín dusíka alebo nitrátu, a to preto, že vybrané druhy húb pravdepodobne neobsahujú nitrátové transportéry (Novotná *et al.*, 2023). Toto tvrdenie podporuje aj Fochi (2017b), ktorá sa domnieva, že preferovaným typom prijímaného dusíka je veľmi pravdepodobne jeho organická forma, keďže sa neukázalo, že by pozorovaná OMF *Tulasnella calospora* bola schopná asimilovať nitrát. Naopak, bolo popísaných niekoľko transportérov pre aminokyseliny a dva transportéry pre amónny kation, čo potvrdzuje vyššie popísané závery. Prenos amónneho kationu bol potvrdený aj experimentami so značeným izotopom dusíka ^{15}N , v ktorých Cameron (2006) použil zelenú orchideu *Goodyera repens* pestovanú na jednej časti delenej Petriho misky. Po niekoľkých dňoch pozoroval hýfy príslušnej OMF v druhej časti Petriho misky a o pár dní na to bol zistený aj pokles koncentrácie značeného dusíka v hubových hýfách a nárast dusíka v koreňoch a výhonkoch orchidey.

Rastliny ale nemajú jednu špecifickú preferovanú formu, v ktorej by dusík prijímali a ide skôr o zmes zlúčenín, ako organický dusík z pôdy, amónny kation, nitrát, či atmosférický dusík (Harrison *et al.*, 2000). Schopnosť prijímať a metabolizovať dusík sa môže líšiť nielen vlastnosťami média, či podmienkami okolia, rozdiely môžu existovať aj medzi jednotlivými taxónmi, ale i medzi jedincami toho istého druhu. Experiment vedený na médiách v kvapalnej a pevnej forme, pričom charakter živného média zapríčiňoval rozdiel v príjme látok. Napríklad u glycínu a močoviny bol pozorovaný vyšší príjem hubami, ak boli podané v kvapalnom médiu. Nie všetky zdroje organického dusíka sú ale pre huby rovnako užitočné, ani dobre spracovateľné, čo sa ukázalo zlou schopnosťou metabolizovať aminokyseliny ako kyselina glutámová alebo glycín, a naopak ako dobre využiteľné aminokyseliny sa ukázali glutamín a arginín (Novotná *et al.*, 2023).

Podobne tak prídavok glycínu do pôdy, v ktorej bola pestovaná rastlina *Coriandrum sativum*, mal pozitívny efekt na nárast čerstvej hmotnosti koreňov i nadzemných častí, rovnako ako na celkovú výšku rastliny. Efekt glycínu vo vyšších koncentráciách bol o niečo vyšší ako vo variantoch s prídavkom klasického hnojiva obsahujúceho dusík, fosfor a draslík a zároveň bol výrazne vyšší od kontrolných rastlín (Mohammadipour a Souri, 2019). V inom experimente bol na dvoch druhoch orchideí rodu *Anacamptis* pozorovaný presun značených izotopov ^{13}C a ^{15}N v pletivách, pričom skúmaný bol aj rozdiel v príjme dusíka medzi dodanými aminokyselinami zastupujúcimi organický zdroj dusíka a anorganickým dusičnanom amónnym, a to s alebo bez prídavku glukózy. Organické zlúčeniny posilňovali rast a tvorbu biomasy, čo bolo zistené značným nárastom koncentrácie značeného izotopu uhlíka, v porovnaní s prídavkom zmesi dusičnanu. Varianty, ktoré obsahovali anorganický dusík s cukrom vykazovali o čosi lepšie výsledky, ako samotný dusičnan, ale prídavok aminokyselín jednoznačne vykazoval najvýznamnejší transport medzi OMF a rastlinami (Alghamdi, 2019). Vysoké koncentrácie dusíka v pletivách mykoheterotrofných a mixotrofných orchideí teda môžu byť spojené s príjmom aminokyselín, ktoré sú okrem uhlíkatých látok bohaté aj na dusík (Dearnaley a Cameron, 2017; Fochi *et al.*, 2017b; Suetsugu *et al.*, 2017; Lallemand *et al.*, 2019).

Veľký objav učinili Fochi a jej tím, keď zdokumentovali spätný transport dusíkatých živín z orchidey neschopnej fotosyntetizovať do jej OMF (Fochi *et al.*, 2017b), čím vyvrátili pochyby niektorých autorov o tom, že OM nie je „pravým“ mutualistickým vzťahom, a to dôkazmi o obojstrannom toku látok v OM (Fochi *et al.*, 2017b; Cameron *et al.*, 2006). V dvoch štúdiách (Fochi *et al.*, 2017a; Fochi *et al.*, 2017b) boli skúmané procesy príjmu a transportu živín v rámci OM a gény pre transportéry týchto živín a ich bunkovo špecifická

expresia, a to v porovnaní u rastlín v OM vzťahu a u nekolonizovaných rastlín. Tento experiment taktiež napovedá tomu, že existuje unikátny spôsob prenosu látok obsahujúcich dusík medzi OMF a orchideou, a to napríklad v prípade amónneho kationu cez apoplastické rozhranie v okolí pelotónov v smere z orchidey do jej mykorhízneho partnera (Fochi et al., 2017b).

Ako bolo popísané na začiatku tejto kapitoly, predpokladáme existenciu dvoch typov prenosu látok medzi orchideoidne mykorhíznu hubou a orchideou – degradáciou pelotónov, alebo cez živé hýfy (Kuga *et al.*, 2014). Prvý model prenosu dusíka bol skúmaný v experimente Gebauera a Meyera (2003) porovnávajúcom príjem živín autotrofnými a mykoheterotrofnými orchideami s referenčnými rastlinami patriacimi do inej čeľade, než je *Orchidaceae*. Pri tomto experimente sa predpokladalo, že referenčné rastliny nemajú na rozdiel od orchideí prístup do mycélia k použitému izotopicky značenému dusíku a uhlíku, a že mykoheterotrofné orchidey budú prijímať tieto prvky od OMF priamo, pretože vo svojich pletivách degradujú pelotóny partnerských húb. Predloženú hypotézu však nedokázali overiť. V inej štúdií však bola v kolonizovaných pletivách na rozhraní degradujúceho pelotónu a rastliny pozorovaná zvýšená koncentrácia izotopu dusíka ^{15}N (Kuga *et al.*, 2014). Okrem toho bolo pozorované nerovnomerné umiestnenie značeného izotopu dusíka v bunkách, a to najviac v okolí membrán a organel. Pre senescentný pelotón je charakteristické zväčšenie jeho objemu pred samotnou lýzou a je to štádium najviac bohaté na dusík. O niečo menej dusíka obsahovali pletivá s mladými pelotónmi a najmenej ho mali nekolonizované pletivá orchideí. Tieto výsledky ale neznamenajú, že dusík je do orchidey dodávaný výhradne degradáciou hubových hýf (Kuga *et al.*, 2014). Stále nie je úplne jasné, či prenos živín z huby do orchidey prebieha lýzou pelotónov (Gebauer a Meyer, 2003; Cameron *et al.*, 2006), cez neporušené membrány OMF pomocou hýf (Dearnaley a Cameron, 2017), prípadne obomi spôsobmi (Kuga *et al.*, 2014).

1.3.3 Fosfor

Ďalším dôležitým prvkom pre správny rast a vývoj rastlín je fosfor, ktorý je taktiež poskytovaný orchideám od ich hubového partnera a je hromadený v protokormoch. Táto distribúcia fosforu z OMF do rastlín bola potvrdená podobne ako u pozorovaní s uhlíkom alebo dusíkom, a to značeným izotopom fosforu ^{32}P pridaným do kultivačného média (Smith, 1967). Aj Cameron (2007) vo svojom experimente s delenými Petriho miskami s podobným princípom, ako vo vyššie popísanom pokuse s glycínom, potvrdil, že značený izotop fosforu ^{33}P je transportovaný OMF mycéliom do orchidey. Nevyhnutnosť vzťahu orchidey s OMF

ukázal aj experiment, v ktorom bol pozorovaný vyšší príjem fosforu u kolonizovanej orchidey *G. repens*, než u nekolonizovaného jedinca toho istého druhu. To bolo potvrdené prídavkom fungicídnej látky, ktorá zastavila transport fosforu z huby do rastliny a výrazne tak ovplyvnila koncentráciu fosforu v nej (Alexander *et al.*, 1984).

Čo sa týka konkrétnych foriem, v ktorých orchidey môžu prijímať fosfor, Novotná s tímom (2023) pri štúdiu vybraných OMF potvrdila za použitia dihydrogenfosforečnanu sodného zvýšený príjem anorganického fosfátu pomocou špecifických prenášačov, ktorých funkcia už bola popísaná u húb tvoriacich iné typy mykorhíz (Tatry *et al.*, 2009; Harrison a Buuren, 1995). Ukázalo sa tiež, že orchideoidne mykorhízne huby neprijímajú nukleové kyseliny ako zdroj organického fosforu. Naopak, jeho najviac prijímanou formou bola kyselina fytová (Novotná *et al.*, 2023), čo znamená, že v hube musia byť prítomné špeciálne hydrolytické enzýmy na jej spracovanie (Jarosch *et al.*, 2019).

1.3.4 Iné látky

Orchidey, rovnako, ako iné rastliny, potrebujú pre správny rast a vývoj adekvátne množstvo makroprvkov a mikroprvkov, pričom ich koncentrácie v pletivách orchideí sú, okrem dusíka a fosforu, porovnateľné s obsahom v iných rastlinách (Biswas *et al.*, 2021; Barman a Naik, 2007). U orchideí taktiež prebieha recyklácia živín a ich transport zo zásobných orgánov do potrebných častí rastliny (Biswas *et al.*, 2021). Aj keď o distribúcii týchto látok zatiaľ nevieme veľa, pravdepodobne sú z huby do rastliny tiež prenášané vitamíny a rastové faktory, ktoré môžu hrať významnú úlohu pri raste protokormov (Smith a Read, 2008). Pretože orchidey v raných fázach vývoja rastú pomalšie a trvá dlhšie, kým sa u nich prejaví symptómy z nedostatku niektorého prvku, je zložité u nich identifikovať deficit živín (Biswas *et al.*, 2021).

2 Materiál a metódy

Všetky experimenty, ktoré boli vykonané k tejto práci, sa konali v priestoroch Katedry experimentálnej biológie rastlín patriacej pod Prírodovedeckú fakultu Karlovej Univerzity v Prahe.

2.1 Kultivačné médiá

2.1.1 Zloženie kultivačných médií

Na výsev semien a kultiváciu protokormov bolo použité SMS médium (Tab. 1) podľa Ponerta (2010). Zloženie roztokov použitých pre prípravu SMS média je popísané v príslušných tabuľkách (Tab. 2 až Tab. 5).

Látka	Množstvo na 1 l roztoku
RAM3_A (Tab. 2)	20 ml
MS-B (Tab. 3)	2 ml
Fe (Tab. 4)	2 ml
MS-D-2 (Tab. 5)	2 ml
Kyselina citrónová	0.15 g (0.3 ml roztoku)
Aktívne uhlie	0.5 g
Kazeín enzymatický hydrolyzát	2 g
Agar	7 g

Tab. 1: Zloženie SMS média.

Látka	Množstvo na 1 l roztoku
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 g

Tab. 2: Zloženie roztoku RAM3_A. Roztok RAM3_A bol skladovaný v chladničke.

Látka	Množstvo na 500 ml roztoku
KI	0.083 g
H ₃ BO ₃	0.620 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

Tab. 3: Zloženie roztoku MS-B. Roztok MS-B bol skladovaný v chladničke.

Látka	Množstvo na 500 ml roztoku
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3.73 g

Tab. 4: Zloženie roztoku Fe.

Jednotlivé zložky roztoku Fe boli osobitne rozpustené v 200 ml destilovanej vody a zahriate v mikrovlnnej rúre na asi 80 °C. Následne bol roztok FeSO₄·7H₂O postupne pridávaný k roztoku Na₂EDTA·2H₂O za stáleho miešania, a to až kým sa roztok nevychladil. Konečným krokom bolo doplnenie roztoku destilovanou vodou do objemu 500 ml. Roztok bol uchovávaný v mrazničke pri teplote -20 °C.

Látka	Množstvo na 500 ml roztoku
Kyselina nikotínová	50 mg
Pyridoxín – HCl	50 mg
Thiamín – HCl	50 mg

Tab. 5: Zloženie roztoku MS-D-2. Roztok MS-D-2 bol skladovaný v 2 ml mikroskúmavkách v mrazničke pri teplote -20 °C.

2.1.2 Príprava kultivačných médií

Pri príprave kultivačných médií bola kadička s objemom 1 l naplnená 500 ml destilovanej vody a za stáleho miešania použitím elektromagnetickej miešačky do nej boli postupne pridávané zložky SMS média (Tab. 1) okrem kazeín enzymatického hydrolyzátu. Po doliatí roztoku destilovanou vodou na objem 1 l bol obsah kadičky rovnomerne rozdelený do

štyroch menších kadičiek s objemom 250 ml. Kultivačné média pre prvý výsev boli ďalej pripravené podľa dizajnu prvého experimentu (Tab. 6). V prípade detailných experimentov (Tab. 7) bolo do každého roztoku pridané konkrétne množstvo vybranej aminokyseliny alebo pyruvátu sodného (ďalej označovaný len ako pyruvát). Podľa príslušných tabuliek bola pri oboch typoch experimentov do roztokov v stanovených koncentráciách pridávaná ešte sacharóza.

Po úprave pH každého roztoku na hodnotu 5.8 za použitia pH metra Orion 410 A+ a 1 M hydroxidu sodného, prípadne 0.2 M kyseliny chlorovodíkovej, bol do jednotlivých roztokov pridaný agar. Každý takto pripravený roztok bol zahrievaný v mikrovlnnej rúre do doby, kým nebol privedený k varu, ale dbalo sa na to, aby nevykypel. Následne boli roztoky preliate do sklenených fliaš vhodných na autoklávovanie a uzavreté plastovým viečkom, ale nezatahnuté na doraz. Sterilizácia prebiehala v autokláve Tuttnauer 2540EK (121 °C, 30 min) a po ukončení cyklu boli fľaše s kultivačnými médiami presunuté do flowboxu a rovnomerne rozliate v sterilnom prostredí do plastových Petriho misiek s priemerom 9 cm. Petriho misky s médiami boli do ďalšieho spracovania uchovávané v chladničke v mikroténovom vrecku, aby sa predišlo ich kontaminácii či vyschnutiu.

2.1.3 Kultivácia

Semená boli kultivované pri teplote 23 ± 1 °C a uložené v kartónových škatuliach uzavretých tak, aby dnu neprenikalo svetlo.

2.2 Dizajn experimentov

Dizajn experimentov bol navrhnutý, aby sa dal porovnať význam vybraných látok na metabolizmus protokormov orchideí. Medzi vybrané látky bola zaradená nielen samotná forma aminokyselín, ale aj pyruvát a zmes voľných aminokyselín v podobe enzymatického hydrolyzátu kazeínu. Experimenty boli pomenované číslami 1 až 6, pričom experiment číslo 1 obsahoval kazeín enzymatický hydrolyzát, čísla 2 až 5 vybrané aminokyseliny a v experimente číslo 6 bol testovaný pyruvát.

2.2.1 Kazeín enzymatický hydrolyzát

Pre prvý experiment bolo použité SMS médium (Tab. 1) pripravené v štyroch variantoch, a to: kontrola označená kódom SMS-0, SMS médium bez prídavku kazeínu, ale

s prídavkom sacharózy (SMS-S), SMS médium s kazeín hydrolyzátom, ktorý zastupoval zmes aminokyselín (SMS-A) a médium s prídavkom sacharózy aj hydrolyzáta kazeínu, ktoré bolo pomenované SMS-SA (Tab. 6).

Označenie média	Obsah enzymatického hydrolyzáta kazeín [g/l]	Obsah sacharózy [g/l]
SMS-0	0	0
SMS-S	0	17.12
SMS-A	2	0
SMS-SA	2	17.12

Tab. 6: Dizajn experimentu 1. SMS médium bolo pripravené podľa Tab. 1.

Vzhľadom k nečakaným výsledkom na variantoch s prídavkom samotnej sacharózy a samotného hydrolyzáta kazeínu bol prevedený kontrolný test, aby sa zistilo, či Petriho misky s kultivačnými médiami a príslušné štítky, ktorými boli misky označené, neboli omylom zamenené. Kontrolou bolo premeranie obsahu sacharózy v médiu pomocou HPLC nasledovným postupom. Najskôr bolo k 0,5 g kultivačného média pridaných 0,5 ml ultračistej Milli Q vody a zmes bola dôkladne premiešaná na vibračnej trepačke. Roztok bol po dobu 1 hodiny uchovávaný pri 4 °C a po uplynutí tejto doby prefiltrovaný cez jednorazový filter s veľkosťou pórov 0.22 µm. Ďalej prebiehala analýza pomocou HPLC podľa postupu uvedeného v kapitole 2.5.3. Ukázalo sa, že Petriho misky s médiami boli označené správne a naozaj mala samotná sacharóza na veľkosť protokormov slabší efekt, než enzymatický hydrolyzáta kazeínu.

2.2.2 Detailné experimenty pre vybrané látky

Pre druhý až šiesty experiment bol použitý ďalej popísaný dizajn. Podobne ako pri prvom experimente, aj pri nasledujúcich piatich experimentoch boli určité varianty kultivačného média obohatené o sacharózu. Okrem sacharózy však boli do médií pridávané aj iné vybrané látky, a to v koncentráciách (Tab. 7), ktoré boli zvolené na základe predchádzajúcich experimentov tímu (Ponert *et al.*, 2021; Dostálová, 2016). Keďže pridávanými zložkami do jednotlivých kultivačných médií boli štyri vybrané aminokyseliny a pyruvát, všetky varianty SMS média boli pripravované bez kazeín enzymatického

hydrolyzátu. Pre experimenty 2 až 5 boli v rovnakom číselnom poradí zvolené kyselina glutámová, glycín, alanín a kyselina asparágová.

Číslo variantu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aminokyselina/pyruvát	0	0.1	1	10	0	0	0	0	0.1	1	10
Sacharóza	0	0	0	0	0.1	1	10	30	10	10	10

Tab. 7: Dizajn experimentov 2 až 5. Koncentrácie vybraných látok a sacharózy v médiu [mM] v jednotlivých variantoch.

2.3 Výsev semien

2.3.1 Pôvod a skladovanie semien

Vo všetkých experimentoch boli použité semená dospelých rastlín orchidey *Dactylorhiza majalis* pestovaných vo voľnej pôde v Botanickej záhrady hlavného mesta Praha (pôvodom z lokality Rádlo u Jablonce). Semená boli pomocou pinzety očistené od suchých rastlinných zvyškov a iných nečistôt a boli uchovávané v papierových vrecúškach v tme a v suchu pri izbovej teplote. Pri výsevoch boli použité semená nie staršie ako rok od zberu.

2.3.2 Sterilizácia a výsev semien

Pred samotným výsevom semien na kultivačné médium boli semená sterilizované nasledujúcim spôsobom (Ponert *et al.*, 2011). Ako prvý bol zmiešaním 30 g chlóróvého vápna a 150 ml destilovanej vody pripravený roztok, ktorý bol po 1 hodine prefiltrovaný do čistej kadičky. Do tohto roztoku boli následne pridané 1 až 2 kvapky zmáčadla TWEEN 20 a od tejto doby bol roztok prekrytý alobalom a spotrebovaný čo najskôr. Medzitým bolo pripravených niekoľko kusov sejúceho aparátu, ktorý pozostával z injekčnej striekačky s objemom 5 ml a ihly s rozmermi 1.2×40 mm, medzi ktoré bol vložený štvorec jemnej nylonovej sieťoviny s veľkosťou strany asi 1 cm. Do pripravených striekačiek boli pomocou pinzety vložené semená a striekačky boli následne uzavreté piestom. Samotná sterilizácia bola zložená z dvoch častí, pričom najskôr boli semená ošetrené 70 % etanolom po dobu 4 minút, potom trikrát premyté destilovanou vodou. Po štvrtom a zároveň poslednom opakovaní nebola voda odstránená, ale bola ponechaná v striekačke až do ďalšieho kroku sterilizácie. Od tohto bodu boli všetky ďalšie činnosti vykonávané v sterilnom prostredí vo flowboxe, počínajúc 10-minútovým pôsobením roztoku chlóróvého vápna. Sterilizácia chlóróvym

vápnom prebiehala tak, že po 2 minútach sa roztok chlóróvého vápna zo striekačky odstránil a okamžite bol nasatý čerstvý roztok. Rovnako ako po ošetroení etanolom, aj po pôsobení roztoku chlóróvého vápna boli striekačky trikrát vymyté, tentokrát ale sterilnou vodou umiestnenou v malej Erlenmeyerovej banke prekrytej alobalom, ktorá vopred prešla sterilizačným cyklom v autokláve. Po každom nabraní alkoholu a chlóróvého vápna a pri každom opakovaní ich vymývania boli striekačky jemne pretrepané a bol do nich nasatý malý obsah vzduchu, aby sa semená nezachycovali v ústí striekačky. Po dokončení týchto krokov boli ihly a nylonové sieťky zo striekačiek opatrne odstránené a nahradené širšími ihlami s priemerom 1.8 mm, pomocou ktorých bola suspenzia semien v sterilnej vode prenesená na Petriho misky s médiami. Po výseve boli Petriho misky zafixované parafilmom a uložené v kartónových škatuliach do kultivačnej miestnosti.

2.4 Zber a analýza dát

2.4.1 Fotodokumentácia

Približne po 4 mesiacoch od výsevu boli protokormy zdokumentované pomocou fotoaparátu Canon 760D umiestnenom na statíve, aby sa po celú dobu udržala rovnaká vzdialenosť medzi objektívom a fotografovanými protokormami. Pre lepšiu kontrast a presnejšiu obrazovú analýzu boli Petriho misky ukladané na čierny podklad a osvetlené LED žiarovkami. Rastlinný materiál bol po zdokumentovaní fotoaparátom spracovaný pre ďalšie analýzy popísané nižšie.

2.4.2 Obrazová analýza

Veľkosť vyklíčených semien a protokormov bola zmeraná z vyfotografovaných Petriho misiiek v programe ImageJ (verzia 1.53t) funkciou rovná čiara. Mierka bola kalibrovaná podľa pravítka, ktoré bolo priebežne dokumentované fotoaparátom pri fotografovaní misiiek. Z každej fotografie bolo zmeraných maximálne 50 hodnôt, ktoré odpovedali maximálnemu priemeru meraných objektov a tieto hodnoty boli zapisované do textového dokumentu.

2.4.3 Štatistická analýza

Štatistická analýza bola vykonaná v programe R verzie 4.2.2 (R Core Team 2022), pričom pre hodnotenie rozdielov medzi variantmi vo veľkosti protokormov bol použitý test

ANOVA pre prvý experiment a hierarchická ANOVA pre druhý až šiesty experiment. Ďalej bol pri experimentoch dva až šesť skúmajúcich veľkosť protokormov porovnávaný efekt sacharózy a vybraných aminokyselín alebo pyruvátu a ich interakcie pomocou dvojfaktorovej ANOVA metódy. Párové kombinácie jednotlivých variantov u všetkých typov experimentov boli vyhodnotené pomocou TukeyHSD testu. Vo všetkých testoch bola použitá hladina významnosti $\alpha = 0.05$.

2.4.4 Zber rastlinného materiálu

Na uskladnenie nazbieraného rastlinného materiálu boli použité mikroskúmavky typu Eppendorf, ktorých hmotnosť bola vopred zmeraná na analytickej váhe a zaznamenaná. Viečka mikroskúmaviek bolo potrebné pred použitím prepichnúť, a to kvôli tomu, aby pri ďalšom uskladnení a spracovaní, ako je zmrazenie a lyofilizácia, mohlo dôjsť k výmene plynov. Na samotný zber vyklíčených semien a protokormov bola použitá pinzeta so zahnutým koncom, aby bol rastlinný materiál presunutý z Petriho misiek do predom označených mikroskúmaviek bez nadbytočného zásahu do kultivačného média. Z každého variantu boli pripravené 3 až 4 mikroskúmavky s čerstvou hmotnosťou vždy aspoň 10 mg, pričom vzorky boli tvorené z jednej až piatich Petriho misiek. Medzi každou pripravovanou mikroskúmavkou bola pinzeta očistená buničitou vatou. Okamžite po zvážení a zaznamenaní hmotnosti boli vzorky vložené do tekutého dusíka a do ďalšieho spracovania boli uskladnené v mrazničke pri teplote $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5 Analýza obsahu sacharidov v rastlinnom materiáli

2.5.1 Extrakcia rozpustných sacharidov

Prvým krokom extrakcie rozpustných sacharidov zo vzoriek bolo vysušenie zmrazených mikroskúmaviek pomocou lyofilizátora Lyovac GT2, ktorý bol zapnutý podľa návodu na použitie na program sušenie a mrazenie 30 minút pred samotnou lyofilizáciou vzoriek. Po asi 17-20 hodinách sušenia mikroskúmaviek vo vákuu vnútri lyofilizátora boli vzorky zvážené na analytických váhach a na základe toho bola vypočítaná ich suchá hmotnosť. Do každej mikroskúmavky bol pridaný 80 % metanol v objeme 0.5 ml a následne sa vzorky temperovali 15 minút vo vopred predhriatom termobloku pri teplote $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ďalším krokom bolo odparenie metanolu vo vákuovom koncentrátore SpeedVac pri programe na alkoholy (V-AL, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 3 hodín. Následne bolo do jednotlivých mikroskúmaviek

pridané príslušné množstvo ultračistej vody Milli Q podľa hmotnosti suchých vzoriek (Tab. 8), ktorá bola zistená po dokončení cyklu v lyofilizátore. Mikroskúmavky boli po pridaní vody vložené na 15 minút do ultrazvukového kúpeľa, pričom aby nevyplávali, ani neklesli na dno, boli upevnené v plastovej mriežke. Po tomto cykle boli vzorky presunuté do centrifúgy Eppendorf 5415 D zapnutej na čas 10 minút a na maximálny výkon ($RCF = 16\,110\times g$). Mikroskúmavky boli do centrifúgy vkladané rovnakým spôsobom, jednak kvôli lepšej stabilite, ale aj preto, aby bolo hneď zjavné, na ktorej strane mikroskúmavky sa usadili pelety.

Posledným krokom bola filtrácia supernatantu s obsahom rozpustných sacharidov pomocou jednorazových filtrov s veľkosťou pórov $0.22\ \mu\text{m}$ alebo $0.45\ \mu\text{m}$ a injekčnej striekačky. Supernatant bol nasatý pomocou striekačky tak, aby sa neporušila peleta, a to priložením šikmej strany ihly na protiľahlú stenu mikroskúmavky. Po nabratí maximálneho možného množstva tekutiny sa do injekčnej striekačky nasal ešte malý objem vzduchu, ihla bola vymenená za filter a obsah striekačky bol prefiltrovaný do menšej čistej popísanej mikroskúmavky, tentokrát už bez dier vo viečku. Medzi každou filtrovanou vzorkou bol použitý nový filter a injekčná striekačka bola vždy 3-krát premytá ultračistou vodou a po treťom premytí asi 5-krát natiahnutá a stlačená naprázdno, aby sa odstránili zvyšky vody pred prácou s ďalšou mikroskúmavkou. Vzorky pripravené na analýzu rozpustných sacharidov pomocou HPLC boli uložené do mrazničky s teplotou $-20\ ^\circ\text{C}$ v označenom stojane na skúmavky. Pôvodné mikroskúmavky s peletami boli uchovávané pri teplote $-75\ ^\circ\text{C}$ do ďalšieho spracovania – extrakcie a analýzy škrobu.

Suchá hmotnosť vzorky	Objem pridanej ultračistej vody Milli Q
< 1 mg	0.2 ml
1 až 5 mg	0.3 ml
5 až 10 mg	0.5 ml

Tab. 8: Prídavok demineralizovanej vody pre analýzu rozpustných sacharidov.

2.5.2 Extrakcia škrobu

Prvým krokom prípravy vzoriek na analýzu škrobu bolo premytie peliet v poradí úkonov popísaných ďalej v texte. Do pôvodných mikroskúmaviek s prepichnutými viečkami, ktoré boli po extrakcii rozpustných sacharidov skladované v mrazničke, bol pridaný 1 ml ultračistej vody Milli Q a obsah bol dôkladne premiešaný na vibračnej trepačke. Po dobu 15 minút na vzorky pôsobil najskôr ultrazvukový kúpeľ, po ktorom nasledovala 15-minútová centrifugácia na maximálny výkon ($RCF = 16\,110\times g$). Mikroskúmavky boli do centrifúgy

ukladané rovnakým spôsobom, ako pri extrakcii rozpustných sacharidov a rovnako sa aj pomocou injekčnej striekačky a ihly z mikroskúmaviek vysal supernatant. Supernatant ale zatiaľ obsahoval len odpadové látky, ktoré boli vymývané z pelety obsahujúcej škrob, preto nebolo nutné medzi jednotlivými vzorkami meniť ihlu, ani preplachovať injekčnú striekačku. Po tomto kroku sa do mikroskúmavky pridal znova 1 ml ultračistej vody a celý postup premývania sa opakoval celkovo 4-krát. Po premytí peliet sa do každej mikroskúmavky pridalo 0.5 ml Na-acetátového pufru o koncentrácii 0.1 M (Tab. 9) a vzorky vložené do stojanu na skúmavky boli sterilizované jeden cyklus v autokláve Tuttnauer 2540EK (121 °C, 30 min).

Roztok A	0.2 M CH ₃ COOH
Roztok B	0.2 M HCl

Tab. 9: Zloženie Na-acetátového pufru. Roztok B bol po kvapkách pridávaný do roztoku A do dosiahnutia pH 4.5 a následne bol uchovávaný v chladničke.

Po vychladnutí mikroskúmaviek sa ku každej vzorke pridalo 100 µl enzymatického roztoku (Tab. 10) a následne boli vzorky do ďalšieho dňa uložené v termobloku vopred zahriatom na 40 °C. Po asi 12-18 hodinách temperovania prebehla inaktivácia enzýmov trvajúca 5 minút zahriatím v termobloku na 95 °C a potom boli vzorky presunuté do vákuového koncentrátora SpeedVac a zapnuté na program na odparovanie vody (V-AQ, 60 °C, 3 h). Po ukončení cyklu sa do každej mikroskúmavky s čistou hmotnosťou suchých protokormov pod 5 mg pridalo 0.2 ml ultračistej vody Milli Q, alebo 0.3 ml, ak čistá hmotnosť protokormov po lyofilizácii prekročila váhu 5 mg. Mikroskúmavky boli po dobu 15 minút uložené do ultrazvukového kúpeľa a následne boli 10 minút centrifugované na rovnaký program ako vzorky, z ktorých boli extrahované rozpustné sacharidy.

Látka	Množstvo v roztoku
α-amyláza (Sigma-Aldrich)	30 mg
Amyloglukozidáza (Sigma-Aldrich)	30 mg
Na-acetátový pufer (Tab. 9)	3 ml

Tab. 10: Zloženie enzymatického roztoku na štiepenie škrobu. Roztok bol pripravený vždy čerstvý zmiešaním jednotlivých zložiek a ich premiešaním pomocou vibračnej trepačky.

Nakoniec bol supernatant s obsahom škrobu opatrne nasatý pomocou ihly a striekačky tým istým spôsobom, ako bolo popísané pri príprave vzoriek s rozpustnými sacharidmi a rovnakým postupom bol tiež prefiltrovaný pomocou jednorazových membránových filtrov s pórmami o veľkosti 0.22 μm alebo 0.45 μm do nových označených mikroskúmaviek bez dier vo viečkach. Vzorky boli uložené v mrazničke pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do spracovania v HPLC.

2.5.3 HPLC

Analýza obsahu sacharidov v rastlinnom materiáli prebehla pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC, odvodené z anglického názvu High-Performance Liquid Chromatography) s refraktometrickou detekciou. Parametre systému sú: refraktometrická detekcia (Shodex RI-101), pumpa DeltaChrom™ SDS 030 (Watrex), teplota $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, integrácia v programe Clarity (verzia 7.2.0.73), predkolónka – polymér IEX 8 μm Pb^{2+} (Watrex), kolóna 250×8 mm (Watrex) – polymér IEX 8 μm Pb^{2+} (pre rozpustné sacharidy aj pre škrob), eluent – ultračistá demineralizovaná voda (MilliQ), rýchlosť prietoku 0.5 ml/min, objem vpichovanej vzorky 50 μl .

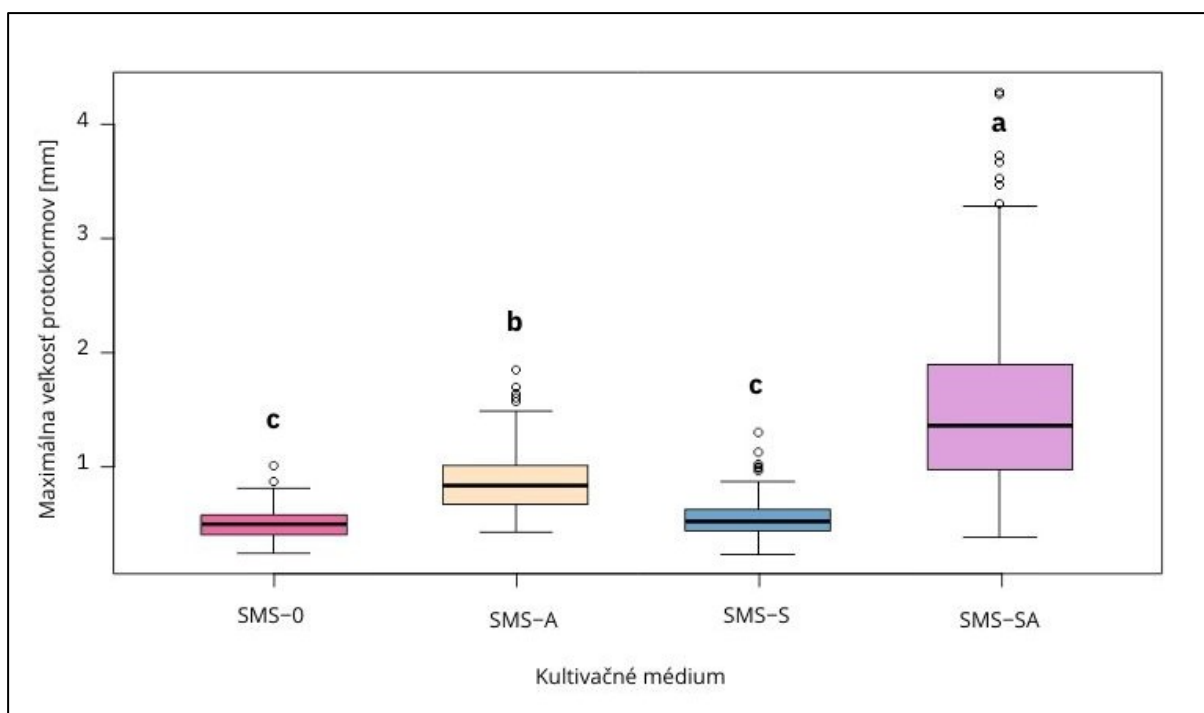
3 Výsledky

3.1 Efekt vybraných látok na veľkosť protokormov

3.1.1 Kazeín enzymatický hydrolyzát

Rozdiely medzi jednotlivými variantmi boli štatisticky preukazné metódou ANOVA ($F_{[3,1360]} = 421.3$, $\alpha = <2 \times 10^{-16}$). Varianty sú pomenované podľa zloženia kultivačného média, ako je uvedené v Tab. 6.

Prídavok sacharózy do SMS média obsahujúceho kazeín enzymatický hydrolyzát (kultivačné médium SMS-SA) má značne pozitívny účinok na veľkosť protokormov *D. majalis* (Graf 1). Aj základné SMS médium pripravené podľa Tab. 1 (SMS-A), podnecovalo rast protokormov, ale výsledky nedosahujú až na úroveň SMS-SA média. Kontrolné médium (SMS-0), teda SMS médium bez kazeín enzymatického hydrolyzáta, malo na veľkosť protokormov porovnateľný účinok, ako SMS médium s prídavkom sacharózy (SMS-S).

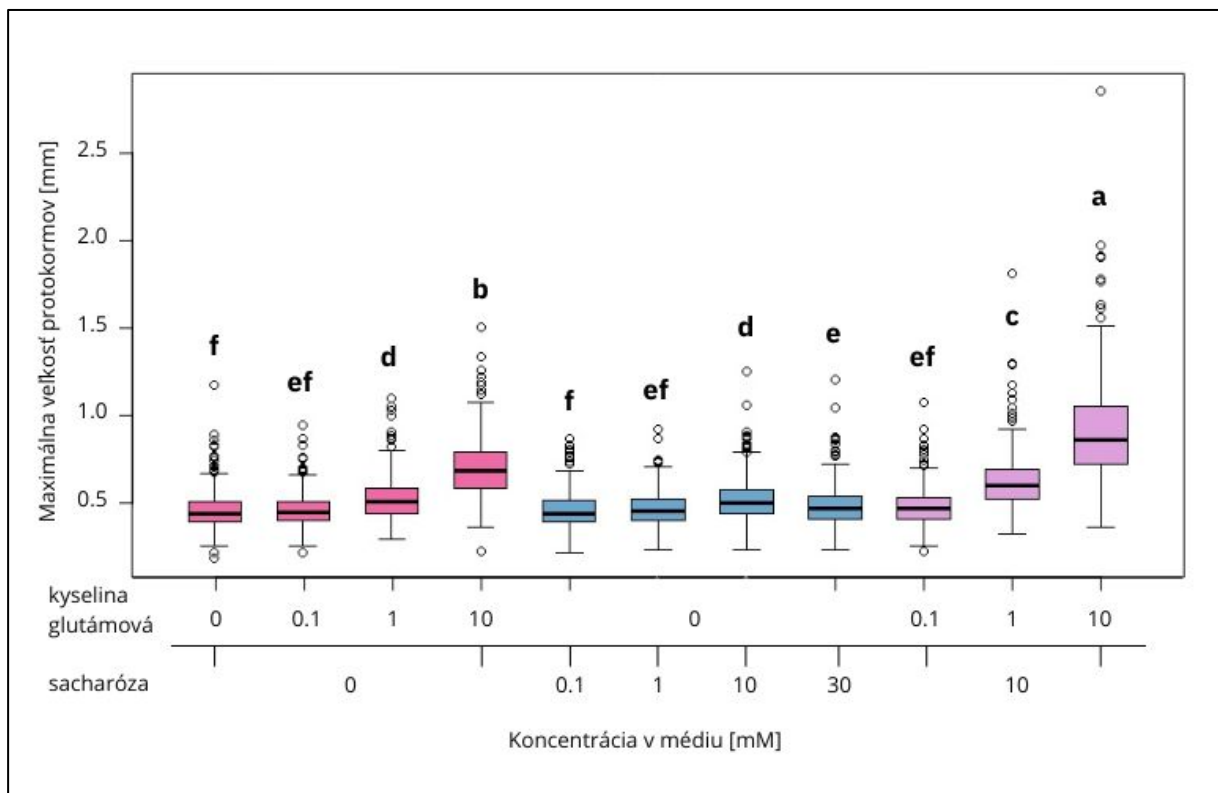


Graf 1: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 1. Maximálna veľkosť protokormov *D. majalis* na médiách s obsahom kazeín hydrolyzáta a sacharózy (vid' Tab. 6). Odlíšné písmená značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu.

3.1.2 Kyselina glutámová

Rozdiely medzi variantmi vo veľkosti protokormov boli štatisticky preukazné (hierarchická ANOVA: $F = 45.35$, d.f. = 10,11, $\alpha = 1.73 \times 10^{-7}$). Dvojfaktorová metóda ANOVA, ktorá porovnávala efekt sacharózy a kyseliny glutámovej, ukázala silný efekt oboch faktorov (sacharóza: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$; kyselina glutámová: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$).

Z grafu (Graf 2) je zrejмый výrazne pozitívny účinok kyseliny glutámovej na veľkosť protokormov *D. majalis* s jej zvyšujúcou sa koncentráciou v kultivačnom médiu. Podobne je to tak aj v kombinácii 10 mM sacharózy a zvyšujúcej sa koncentrácie kyseliny glutámovej, pričom variant s koncentráciou 10 mM danej aminokyseliny a 10 mM sacharidu podporuje rast protokormov najviac. Varianty obsahujúce len sacharózu vykazujú medzi sebou výrazne menšie rozdiely. U variantov s rastúcou koncentráciou sacharózy môžeme pozorovať malý nárast veľkosti protokormov, avšak koncentrácia sacharózy 30 mM už bola suboptimálna.

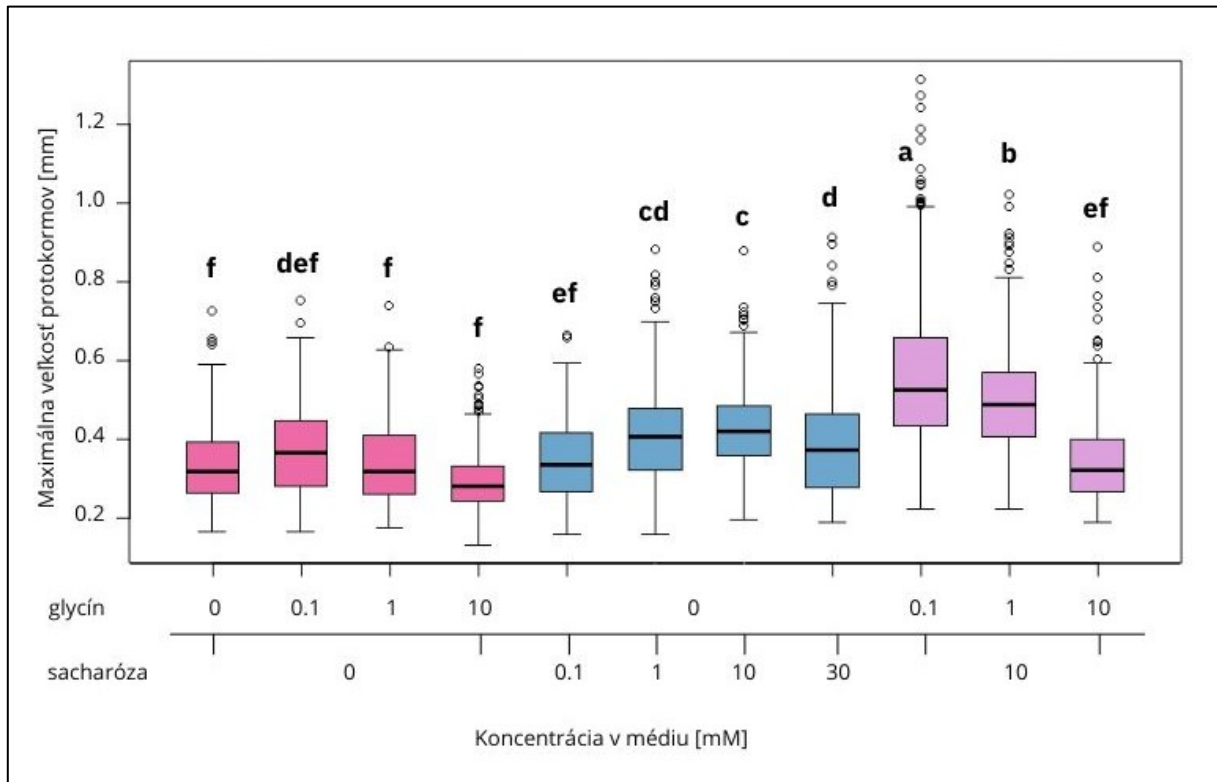


Graf 2: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 2. Maximálna veľkosť protokormov *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom kyseliny glutámovej a sacharózy. Odlišné písmená značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu.

3.1.3 Glycín

Bol dokázaný štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi vo veľkosti protokormov (hierarchická ANOVA: $F = 12.62$, $d.f = 10,11$, $\alpha = 1.16 \times 10^{-4}$). Dvojfaktorová metóda ANOVA porovnávajúca efekt sacharózy a glycínu ukázala silný efekt oboch faktorov (sacharóza: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$; glycín: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$).

Najvyššie hodnoty vo veľkosti protokormov *D. majalis* (Graf 3) dosahovalo médium s obsahom 10 mM sacharózy a 0.1 mM glycínu. So zvyšujúcou sa koncentráciou glycínu v kultivačnom médiu s prídavkom 10 mM sacharózy sa veľkosť protokormov znižovala. Naopak rôzne koncentrácie samotného glycínu sa medzi sebou výrazne nelíšili a nemali na rast protokormov preukazný vplyv. Je však zrejmé, že koncentrácie glycínu presahujúce 0.1 mM rast protokormov mierne znižovali. Variant so samotnou sacharózou pri koncentrácii 0.1 mM dosahoval podobných výsledkov, ako varianty so samotným glycínom. Pri zvyšných troch variantoch so zvýšenou koncentráciou samotnej sacharózy sa veľkosti protokormov o čosi zvýšili. Je teda zjavné, že pri nízkej koncentrácii glycínu (0.1 mM) viedol prídavok 10 mM sacharózy k zlepšeniu rastu, ale pri vyššej koncentrácii glycínu (10 mM) už prídavok sacharózy nemal žiaden vplyv.

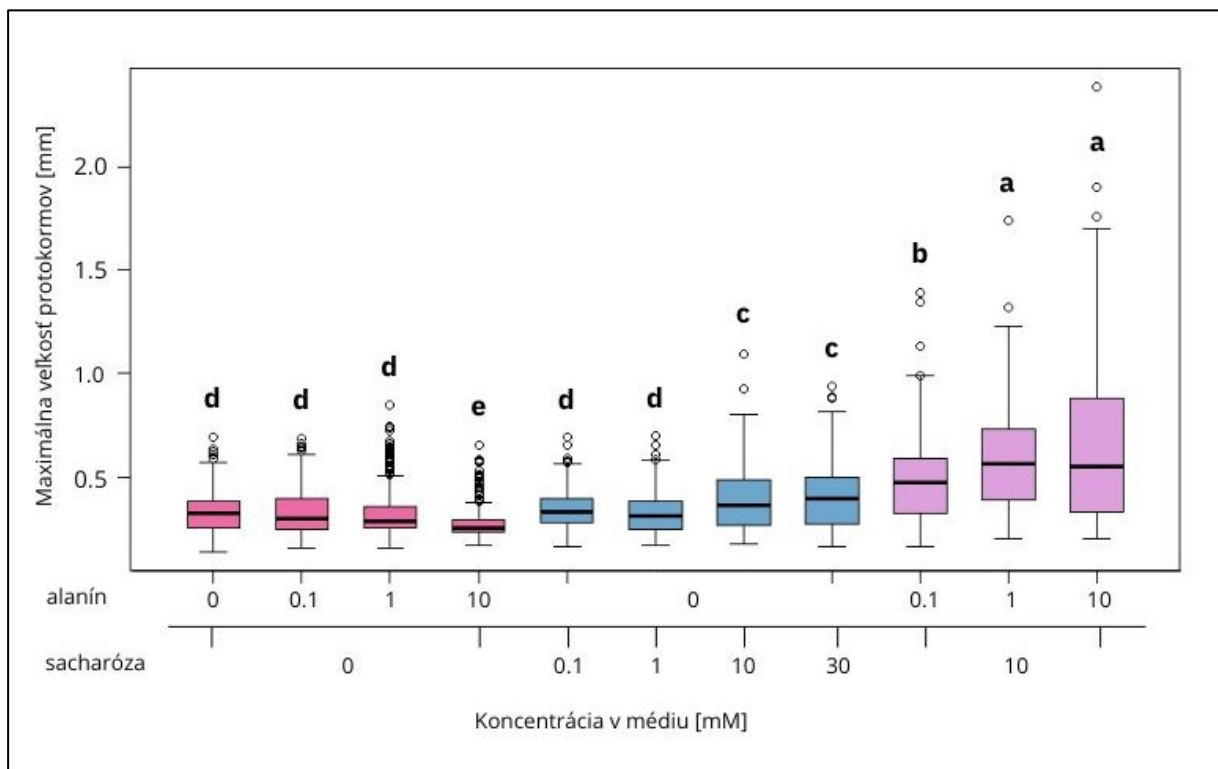


Graf 3: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 3. Maximálna veľkosť protokormov *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom glycínu a sacharózy. Odlišné písmená značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu.

3.1.4 Alanín

Rozdiely medzi variantmi vo veľkosti protokormov boli štatisticky preukazné (hierarchická ANOVA: $F = 16.99$, d.f. = 10,11, $\alpha = 2.72 \times 10^{-5}$). Taktiež bol ukázaný silný efekt sacharózy a alanínu (sacharóza: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$; alanín: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$), a to metódou dvojfaktorová ANOVA, ktorá porovnávala efekt oboch faktorov.

Významný vplyv na rast protokormov *D. majalis* (Graf 4) vykazovali varianty o zmesi 10 mM sacharózy a alanínu, pričom pri koncentráciách alanínu 1 a 10 mM dosahovali protokormy najväčších veľkostí. Kultivačné médiá s prídavkom samotnej sacharózy mali na veľkosť protokormov výrazne slabší vplyv. Jej vyššie koncentrácie 10 a 30 mM rast protokormov zlepšili, ale stále nedosahovali takých veľkostí, ako na variantoch kombinujúcich sacharózu s alanínom. Semená vysiate na varianty obsahujúce iba alanín mali podobný efekt, ako slabšie koncentrácie sacharózy, a teda veľkosti protokormov boli podobné kontrolnému médiu bez sacharózy aj bez alanínu. Vysokým obsahom aminokyseliny v médiu (alanín 10 mM, sacharóza 0 mM) vplyv na rast protokormov ešte viac klesol.

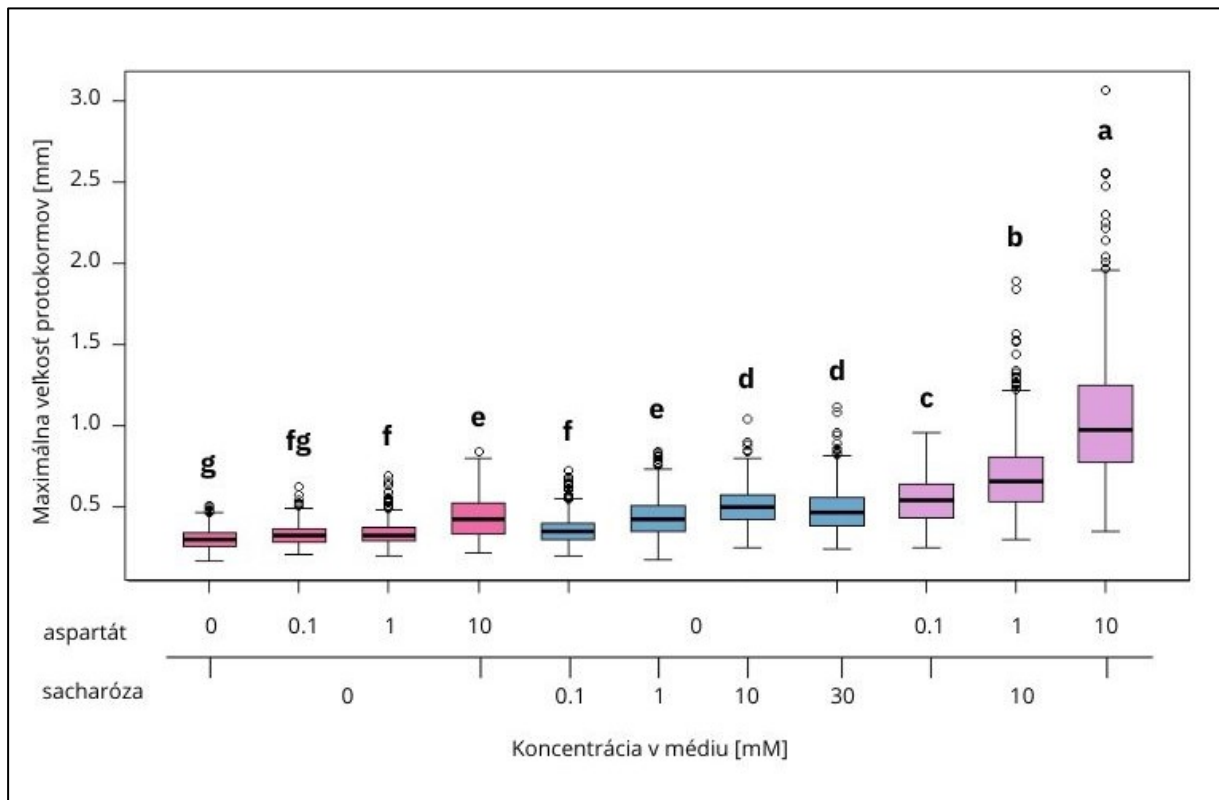


Graf 4: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 4. Maximálna veľkosť protokormov *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom alanínu a sacharózy. Odlišné písmená značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu.

3.1.5 Kyselina asparágová

Boli dokázané štatisticky preukazné rozdiely medzi variantmi vo veľkosti protokormov (hierarchická ANOVA: $F = 66.72$, d.f. = 10,11, $\alpha = 2.22 \times 10^{-8}$). Dvojfaktorová metóda ANOVA, ktorá porovnávala efekt sacharózy a kyseliny asparágovej, ukázala silný efekt obidvoch faktorov (sacharóza: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$; kyselina asparágová: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$).

Z grafu (Graf 5) je vidieť významný efekt variantov obsahujúcich zmes 10 mM sacharózy a troch zvolených koncentrácií kyseliny asparágovej, pričom výrazne pozitívny efekt na veľkosti protokormov *D. majalis* dosahovala kombinácia najvyššej testovanej koncentrácie kyseliny asparágovej (10 mM) a 10 mM sacharózy. So znižujúcou sa koncentráciou kyseliny asparágovej v kultivačných médiách obsahujúcich 10 mM sacharózy, sa znižovala aj veľkosť protokormov, pričom podobný trend platil aj pri samej aminokyseline pridanej do SMS média – na najvyššej testovanej koncentrácii kyseliny asparágovej boli protokormy väčšie než na jeho nižších koncentráciách. Samotná sacharóza v médiu taktiež mierne zvyšovala veľkosť protokormov.

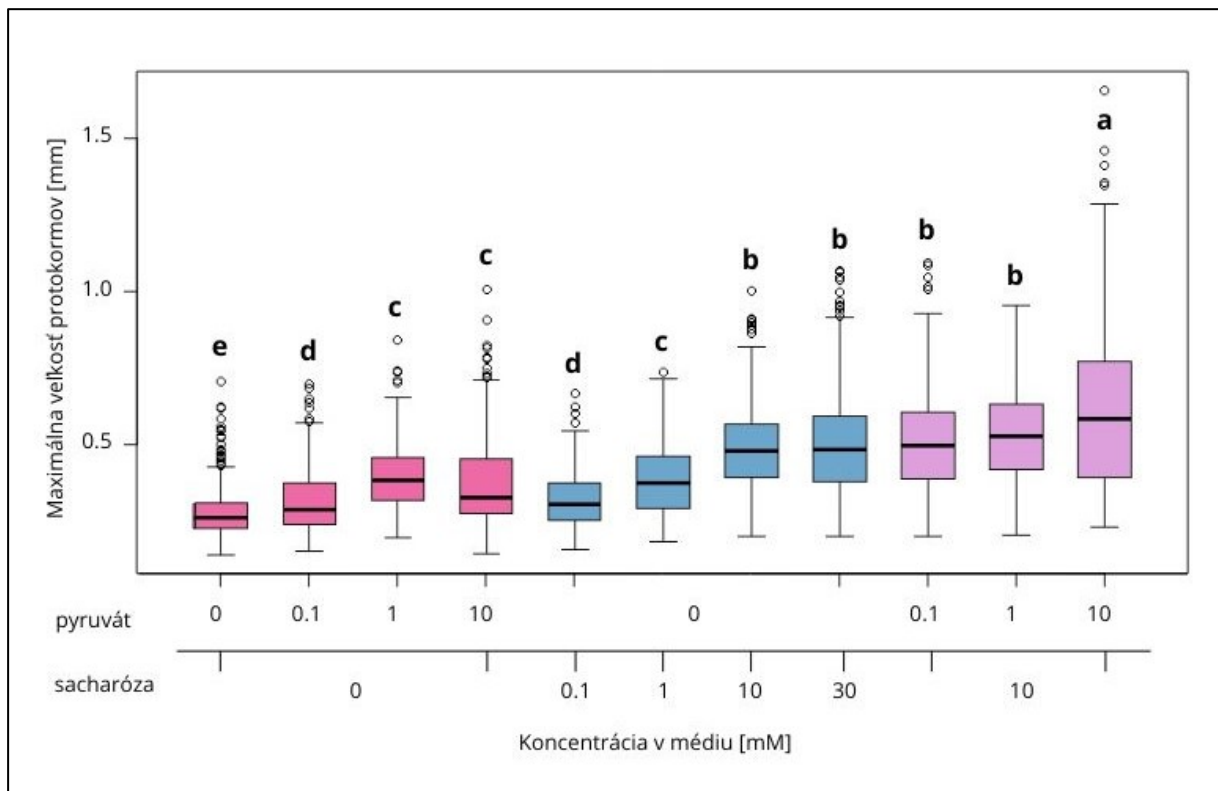


Graf 5: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 5. Maximálna veľkosť protokormov *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom kyseliny asparágovej a sacharózy. Odlišné písmená značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu.

3.1.6 Pyruvát

Rozdiely medzi variantmi vo veľkosti protokormov boli štatisticky preukazné (hierarchická ANOVA: $F = 31.42$, d.f. = 10,11, $\alpha = 1.19 \times 10^{-14}$). Bol ukázaný aj silný efekt sacharózy a pyruvátu (sacharóza: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$; pyruvát: $\alpha = <2 \times 10^{-16}$) metódou dvojfaktorová ANOVA, ktorá porovnávala efekt oboch faktorov.

Z grafu (Graf 6) je možné pozorovať rastúci efekt prídavku samotného pyruvátu na veľkosť protokormov *D. majalis* s jeho zvyšujúcou sa koncentráciou v kultivačnom médiu. Koncentrácie 1 a 10 mM samotného pyruvátu v médiu dosahujú podobného účinku. Podobný trend je viditeľný aj u variantov s rastúcou koncentráciou samotnej sacharózy, kde sa veľkosť protokormov zväčšovala so zvyšujúcou sa koncentráciou sacharózy. Prídanie nižších koncentrácií pyruvátu (0.1 a 1 mM) k 10 mM sacharóze nevedlo k zlepšeniu rastu protokormov. Pri vyššej koncentrácii pyruvátu (10 mM) pridanej ku rovnakej koncentrácii sacharózy však vyrástli najväčšie protokormy.



Graf 6: Maximálna veľkosť protokormov – experiment 6. Maximálna veľkosť protokormov *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom pyruvátu a sacharózy. Odlišné písmená značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu.

3.2 Extrakcia rozpustných sacharidov

V tejto podkapitole sú zhrnuté dáta získané pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC), pričom výsledky sú rozdelené na obsah rozpustných sacharidov – sacharózy, glukózy, fruktózy a na obsah škrobu. Ďalej v texte sa zaoberám len kyselinou glutámovou, glycínom a alanínom, keďže vzorky z experimentov obsahujúcich kyselinu asparágovú a pyruvát boli pri uskladnení omylom zničené a z časových dôvodov nebolo možné pripraviť nové vzorky. V tabuľke nižšie (Tab. 11) sú uvedené počty vzoriek jednotlivých variantov experimentov, z ktorých boli extrahované rozpustné sacharidy a škrob.

Koncentrácia v médiu [mM]		Počet spracovaných vzoriek		
Sacharóza	Aminokyselina	Kyselina glutámová	Glycín	Alanín
0	0	3	3	3
0	0.1	2	3	3
0	1	4	2	3
0	10	5	2	2
0.1	0	3	3	4
1	0	3	3	3
10	0	3	3	2
30	0	3	3	3
10	0.1	4	4	3
10	1	5	4	4
10	10	8	2	4

Tab. 11: Počet spracovaných vzoriek u jednotlivých variantov. Varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky, neboli zahrnuté do štatistickej analýzy.

3.2.1 Kyselina glutámová

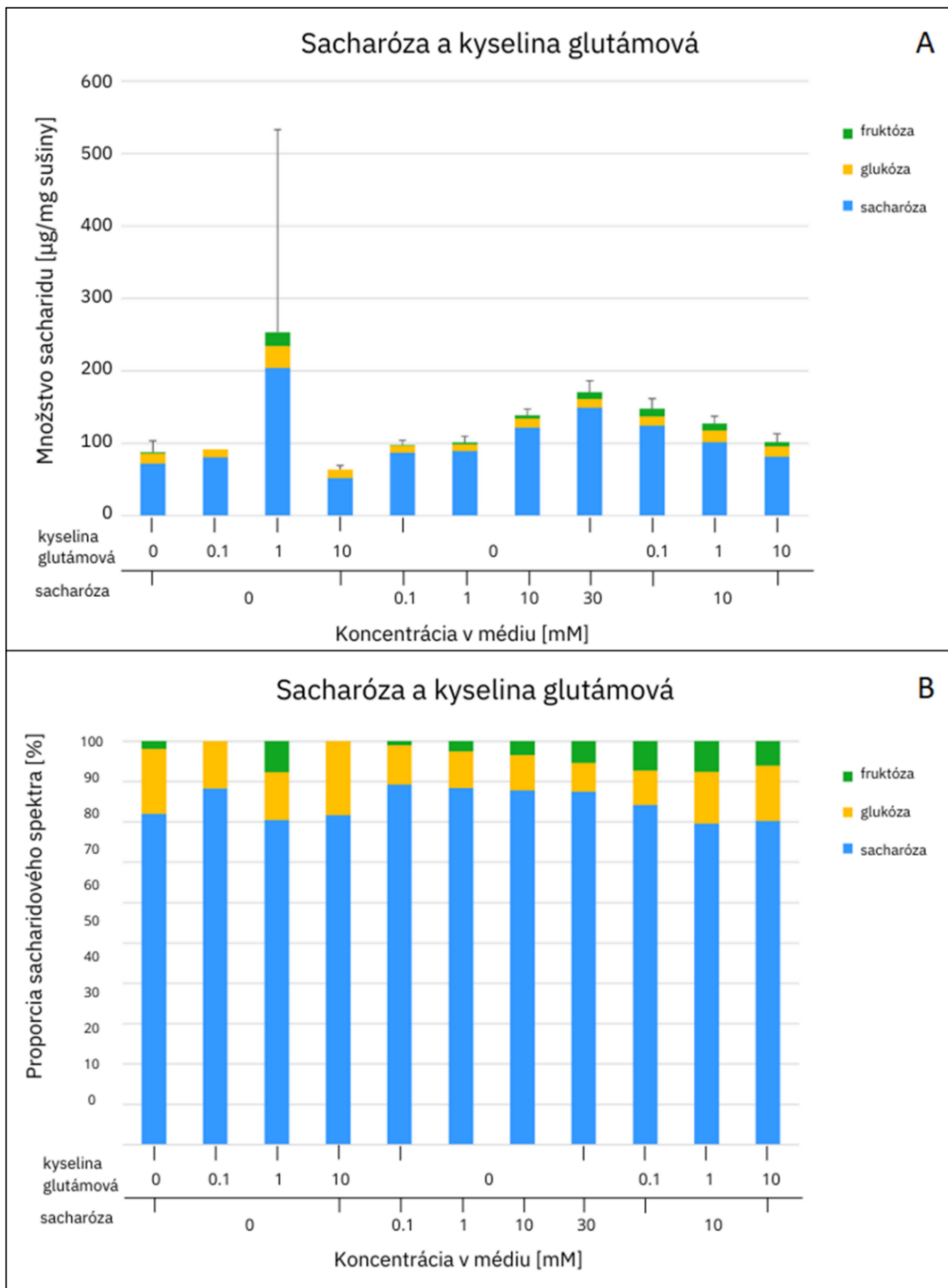
Rozdiely medzi variantmi boli štatisticky preukazné len v obsahu fruktózy, napriek tomu sú pozorovateľné zaujímavé trendy (Tab. 12). Z grafu (Graf 7A) je zrejmé rastúce množstvo rozpustných sacharidov v protokormoch *D. majalis* so zvyšujúcou sa koncentráciou iniciálne pridanej sacharózy do kultivačného média. U variantov obsahujúcich 10 mM sacharózu a kyselinu glutámovú sa množstvo rozpustných sacharidov znižovalo so

zvyšujúcou sa koncentráciou aminokyseliny. Najvýraznejší bol obsah rozpustných sacharidov u variantu 1 mM kyseliny glutámovej bez prídavku sacharózy, kde však bola nameraná aj najväčšia variabilita. Výrazná hodnota rozpustných sacharidov a príslušná nameraná chyba u tohto variantu sú však pravdepodobne spôsobené chybou merania.

Naopak, najnižších hodnôt dosahoval variant 10 mM kyseliny glutámovej bez sacharózy. Rozpustné sacharidy protokormov rastúcich na kontrolnom médiu a na médiu s nízkou koncentráciou kyseliny glutámovej (0.1 mM) bez sacharózy dosahovali podobných hodnôt. Protokormy týchto variantov obsahovali menšie množstvá rozpustných sacharidov, ako protokormy rastúce na zmesi sacharózy a aminokyseliny.

Koncentrácia v médiu [mM]		Obsah rozpustných sacharidov [$\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny]			
Sacharóza	Kyselina glutámová	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza	Rozpustné sacharidy celkom
0	0	72.10 \pm 13.16	14.19 \pm 5.10	1.65 \pm 2.85 ^{ab}	87.93 \pm 15.82
0	0.1	80.86 \pm 6.56	10.68 \pm 1.21	0	91.53
0	1	204.28 \pm 225.87	30.06 \pm 33.42	19.26 \pm 20.71 ^a	253.60 \pm 279.34
0	10	52.38 \pm 5.87	11.71 \pm 1.64	0	64.09 \pm 5.73
0.1	0	87.46 \pm 6.03	9.58 \pm 2.24	0.91 \pm 1.57 ^b	97.94 \pm 6.42
1	0	89.55 \pm 10.07	9.31 \pm 0.81	2.49 \pm 4.31 ^{ab}	101.35 \pm 8.41
10	0	121.93 \pm 11.20	12.23 \pm 0.52	4.66 \pm 3.35 ^{ab}	138.82 \pm 8.50
30	0	149.54 \pm 12.89	12.07 \pm 0.68	9.20 \pm 4.38 ^{ab}	170.80 \pm 15.99
10	0.1	124.67 \pm 13.81	12.55 \pm 0.89	10.73 \pm 3.39 ^{ab}	147.94 \pm 13.92
10	1	101.64 \pm 7.19	16.37 \pm 1.79	9.61 \pm 2.63 ^{ab}	127.62 \pm 9.91
10	10	81.89 \pm 9.78	13.95 \pm 1.24	6.10 \pm 2.03 ^{ab}	101.94 \pm 11.45
p-hodnota (ANOVA)		1.93\times10⁻¹	3.49\times10⁻¹	1.3\times10⁻²	2.01\times10⁻¹

Tab. 12: Obsah rozpustných sacharidov – experiment 2. Priemerný obsah rozpustných sacharidov ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny) v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznymi koncentraciami sacharózy a kyseliny glutámovej a ich príslušné smerodajné odchýlky. Odlišné písmená uvedené v hornom indexe značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu. Varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky, neboli zahrnuté do štatistickej analýzy (Tab. 11).



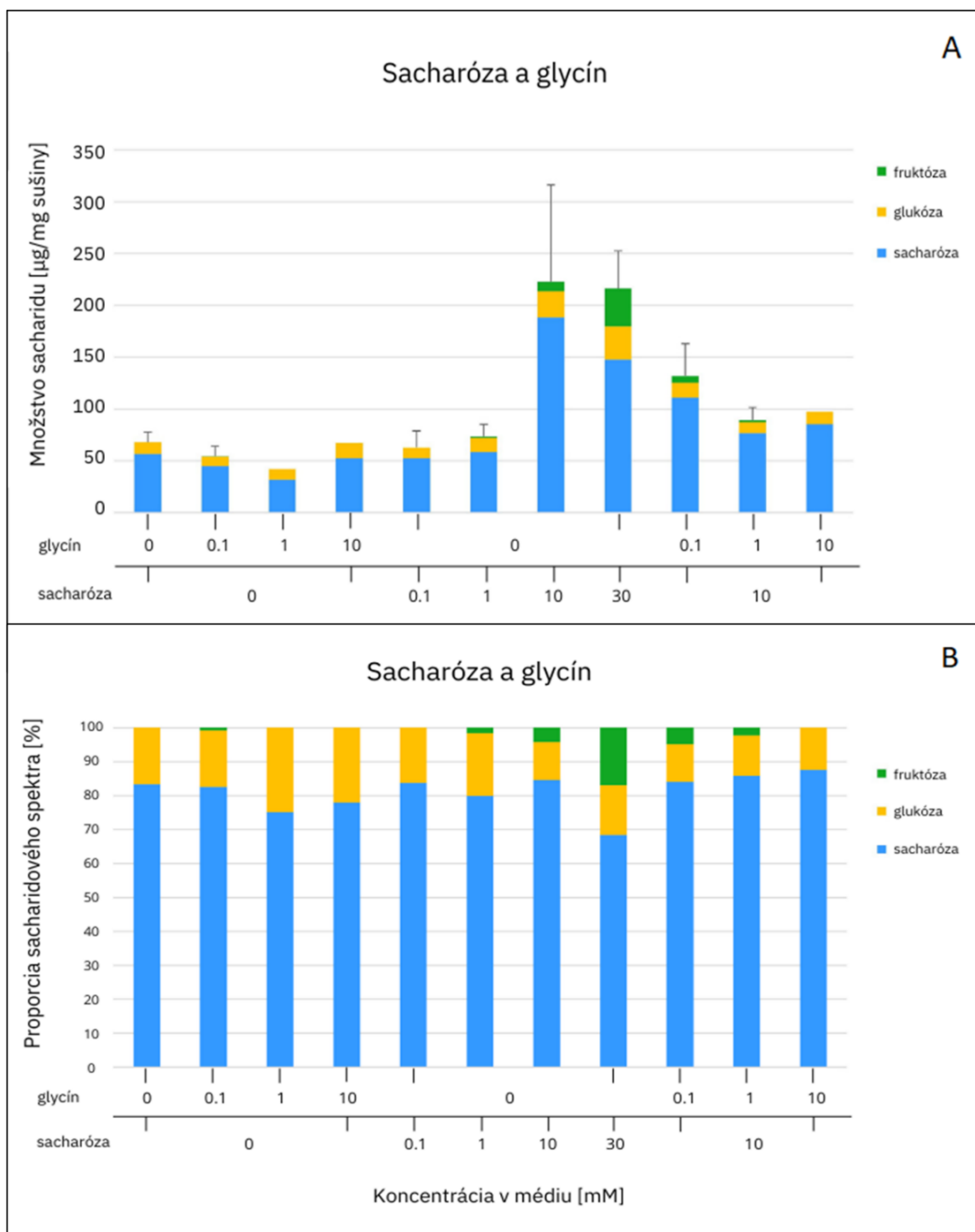
Graf 7: Extrakcia rozpustných sacharidov – experiment 2. Množstvo rozpustných sacharidov [µg/mg sušiny] (Graf 7A) a proporcia sacharidového spektra [%] (Graf 7B) v *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom kys. glutámovej a sacharózy. V grafe sú znázornené priemerné hodnoty hmotností. Chybové úsečky v grafe 7A znázorňujú smerodajnú odchýlku celkového množstva rozpustných sacharidov, pričom varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky, neboli zahrnuté do štatistickej analýzy (Tab. 11). Detailné hodnoty obsahu rozpustných sacharidov sú popísané v Tab. 12.

3.2.2 Glycín

Rozdiely medzi variantmi boli štatisticky preukazné medzi sacharózou a celkovým obsahom rozpustných sacharidov, z grafu (Graf 8A) sú však pozorovateľné rozdiely medzi dátami (Tab. 13). Množstvo rozpustných sacharidov v protokormoch *D. majalis* nebolo vo variantoch s prídavkom samotného glycínu vysoké, dokonca žiaden z týchto variantov nedosahoval vyšších hodnôt, ako kontrola. S rastúcou koncentráciou glycínu v médiu obsah rozpustných sacharidov v protokormoch klesal, no pri 10 mM glycínu množstvo sacharidov mierne stúplo. Pri variantoch zmesi 10 mM sacharózy a glycínu pozorujeme u rovnakých koncentrácií aminokyseliny podobný trend, ako u variantov so samotnou aminokyselinou.

Koncentrácia v médiu [mM]		Obsah rozpustných sacharidov [$\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny]			
Sacharóza	Glycín	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza	Rozpustné sacharidy celkom
0	0	56.73 \pm 8.82 ^b	11.32 \pm 2.07	0	68.05 \pm 9.70 ^b
0	0.1	45.09 \pm 7.94 ^{bc}	9.05 \pm 1.10	0.42 \pm 0.73	54.56 \pm 9.64 ^b
0	1	31.74 \pm 9.92 ^{bc}	10.49 \pm 1.15	0	42.23 ^b
0	10	52.47 \pm 9.26 ^b	14.79 \pm 1.63	0	67.26 ^b
0.1	0	52.74 \pm 11.17 ^b	10.19 \pm 4.65	0	62.93 \pm 15.77 ^b
1	0	58.73 \pm 8.16 ^b	13.57 \pm 4.03	1.15 \pm 1.99	73.45 \pm 11.88 ^b
10	0	188.57 \pm 83.93 ^a	25.03 \pm 9.34	9.28 \pm 0.97	222.88 \pm 93.28 ^a
30	0	147.75 \pm 51.68 ^{ab}	32.06 \pm 36.01	36.37 \pm 47.42	216.18 \pm 36.13 ^a
10	0.1	110.90 \pm 26.51 ^{ab}	14.70 \pm 3.42	6.31 \pm 2.65	131.90 \pm 30.90 ^{ab}
10	1	76.67 \pm 10.45 ^b	10.67 \pm 0.93	1.95 \pm 0.75	89.29 \pm 12.08 ^b
10	10	85.34 \pm 11.23 ^{ab}	12.01 \pm 8.83	0	97.35 ^b
p-hodnota (ANOVA)		3.84\times10⁻⁴	4.64\times10⁻¹	2.05\times10⁻¹	1.79\times10⁻⁵

Tab. 13: Obsah rozpustných sacharidov – experiment 3. Priemerný obsah rozpustných sacharidov ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny) v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznymi koncentraciami sacharózy a glycínu a ich príslušné smerodajné odchýlky. Odlišné písmená uvedené v hornom indexe značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu. Varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky, neboli zahrnuté do štatistickej analýzy (Tab. 11).



Graf 8: Extrakcia rozpustných sacharidov – experiment 3. Množstvo rozpustných sacharidov [$\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny] (Graf 8A) a proporcia sacharidového spektra [%] (Graf 8B) v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom glycínu a sacharózy. V grafe sú znázornené priemerné hodnoty hmotností. Chybové úsečky v hornom grafe znázorňujú smerodajnú odchýlku, pričom varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky, neboli zahrnuté do štatistickej analýzy (Tab. 11). Detailné hodnoty obsahu rozpustných sacharidov sú popísané v Tab. 13.

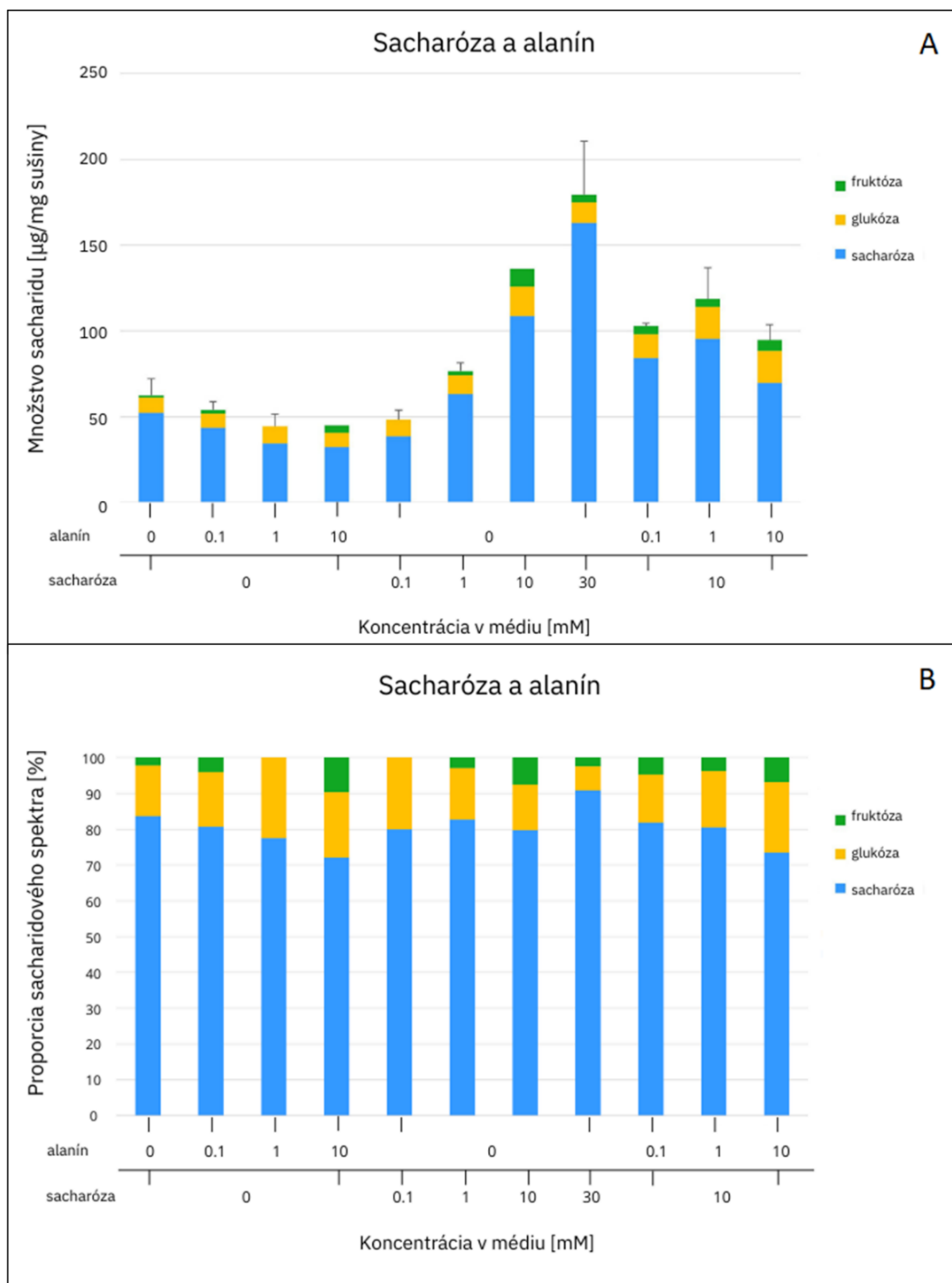
Najvyššiu hodnotu obsahu rozpustných sacharidov pri koncentrácii 0 mM glycínu, pokles so zvyšujúcou sa koncentráciou aminokyseliny (0.1 a 1 mM) a opätovný nárast pri

koncentracii 10 mM glycínu. Zmes sacharózy a glycínu však mala na obsah rozpustných sacharidov v protokormoch vyšší efekt, ako to bolo pri samotnej aminokyseline. Variant so samotnou sacharózou o koncentracii 10 mM viedol k najvyššiemu obsahu rozpustných sacharidov v protokormoch, o niečo menšie hodnoty dosahoval variant s 30 mM sacharózou. So zvyšujúcimi sa nízkymi koncentraciami iníciaľne pridanej samej sacharózy (0.1 a 1 mM) rástol aj obsah rozpustných sacharidov v pletivách, pričom tieto hodnoty sa pohybujú oveľa nižšie, ako spomínané varianty obsahujúce vyššie koncentrácie sacharózy v kultivačnom médiu.

3.2.3 Alanín

Koncentrácia v médiu [mM]		Obsah rozpustných sacharidov [$\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny]			
Sacharóza	Alanín	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza	Rozpustné sacharidy celkom
0	0	52.31 \pm 6.03 ^c	8.88 \pm 1.38 ^b	1.34 \pm 2.32 ^b	62.53 \pm 9.59 ^{cd}
0	0.1	43.59 \pm 0.85 ^c	8.30 \pm 0.28 ^b	2.16 \pm 4.09 ^{ab}	56.61 \pm 2.50 ^d
0	1	34.42 \pm 6.28 ^{cd}	10.00 \pm 1.15 ^{ab}	0	44.42 \pm 7.16 ^d
0	10	32.48 \pm 1.84 ^{cd}	8.18 \pm 0.75 ^b	4.34 \pm 6.14 ^{ab}	45.01 ^d
0.1	0	38.63 \pm 3.34 ^{cd}	9.68 \pm 3.03 ^b	0	49.07 \pm 5.51 ^d
1	0	63.33 \pm 5.01 ^c	11.03 \pm 1.45 ^{ab}	2.23 \pm 3.28 ^{ab}	76.59 \pm 4.88 ^{cd}
10	0	108.65 \pm 1.75 ^b	17.33 \pm 4.42 ^a	10.22 \pm 3.33 ^a	136.20 ^b
30	0	163.01 \pm 31.83 ^a	12.09 \pm 0.82 ^{ab}	4.37 \pm 0.29 ^{ab}	179.47 \pm 31.24 ^a
10	0.1	84.23 \pm 1.10 ^{bc}	13.84 \pm 0.81 ^{ab}	4.83 \pm 2.54 ^{ab}	102.90 \pm 1.60 ^{bc}
10	1	95.45 \pm 13.20 ^{bc}	18.63 \pm 4.18 ^a	4.46 \pm 1.81 ^{ab}	118.54 \pm 18.35 ^b
10	10	69.63 \pm 7.38 ^c	18.66 \pm 1.42 ^a	6.50 \pm 1.87 ^{ab}	94.78 \pm 8.84 ^{bc}
p-hodnota (ANOVA)		1.37\times10⁻¹¹	2.13\times10⁻⁶	3.93\times10⁻³	2.83\times10⁻¹¹

Tab. 14: Obsah rozpustných sacharidov – experiment 4. Priemerný obsah rozpustných sacharidov ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny) v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznymi koncentraciami sacharózy a alanínu a ich príslušné smerodajné odchýlky. Odlišné písmená uvedené v hornom indexe značia štatisticky preukazný rozdiel medzi variantmi podľa TukeyHSD testu. Varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky, neboli zahrnuté do štatistickej analýzy (Tab. 11).



Graf 9: Extrakcia rozpustných sacharidov – experiment 4. Množstvo rozpustných sacharidov [$\mu\text{g}/\text{mg}$ sušiny] (Graf 9A) a proporcia sacharidového spektra [%] (Graf 9B) v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom alanínu a sacharózy. V grafe sú znázornené priemerné hodnoty hmotností. Chybové úsečky v hornom grafe znázorňujú smerodajnú odchýlku, pričom varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky, neboli zahrnuté do štatistickej analýzy (Tab. 11). Detailné hodnoty obsahu rozpustných sacharidov sú popísané v Tab. 14.

Rozdiely medzi variantmi boli štatisticky preukazné, detailné hodnoty sú uvedené v Tab. 14. Z grafu (Graf 9A) môžeme pozorovať rastúci obsah rozpustných sacharidov v protokormoch *D. majalis* na médiách so zvyšujúcou sa koncentráciou samotnej iniciálne pridanej sacharózy od 0.1 do 30 mM. Varianty s 30 a 10 mM sacharózou mali celkovo najvyšší efekt na obsah rozpustných sacharidov v protokormoch. Hneď za tým nasledovali varianty so zmesou sacharózy (10 mM) a aminokyseliny, pričom obsah rozpustných sacharidov v pletivách postupne klesal podľa koncentrácie alanínu v médiu v poradí 1 mM, 0.1 mM a 10 mM alanínu.

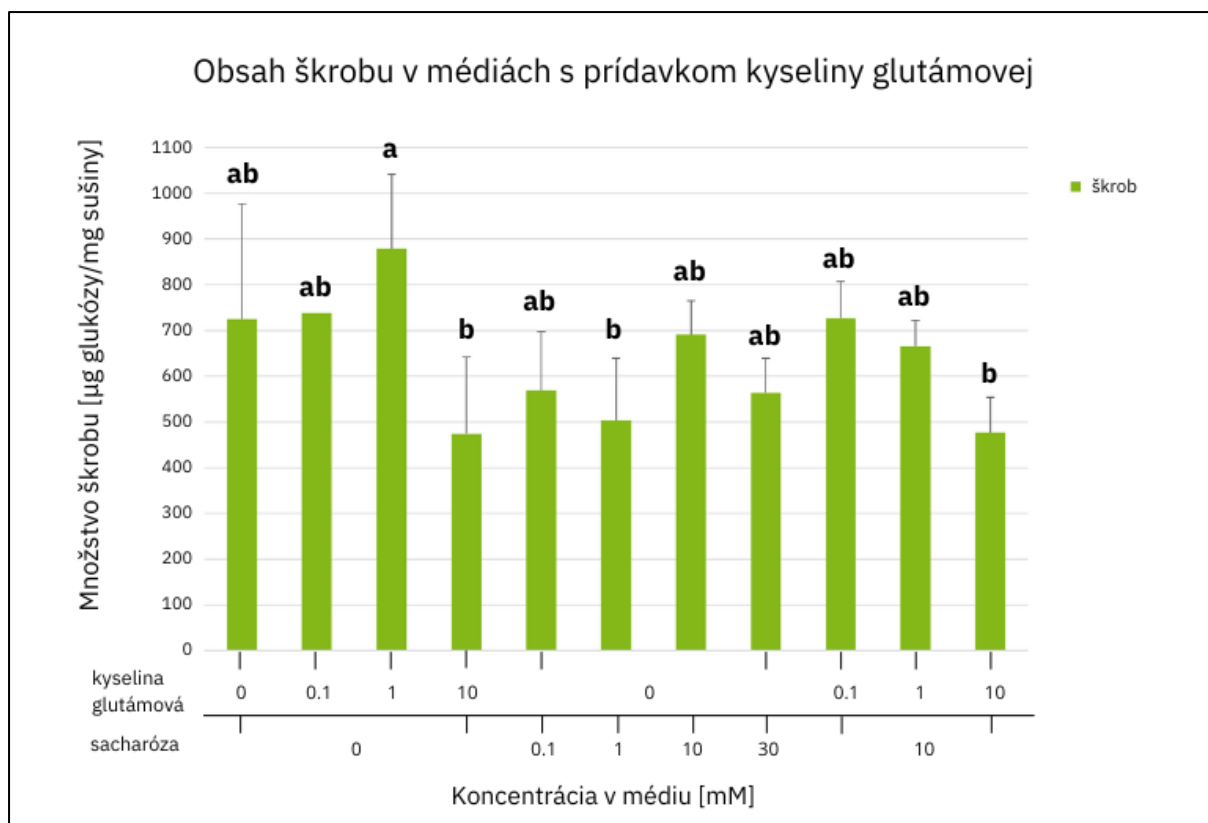
Najnižšie množstvá rozpustných sacharidov obsahovali protokormy kultivované na samotnom alaníne. Je zrejмый klesajúci efekt obsahu rozpustných sacharidov v protokormoch pri rastúcej koncentrácii samotného alanínu, pričom pri koncentrácii 10 mM sa obsah rozpustných sacharidov zase o trochu zvýšil. Tieto varianty však dosahovali nižšie hodnoty, aké boli namerané pri kontrole.

3.3 Extrakcia škrobu

3.3.1 Kyselina glutámová

Pomocou štatistickej metódy ANOVA boli nájdené preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Podľa štatistického testu TukeyHSD existuje rozdiel medzi variantom s obsahom 1 mM samotnej kyseliny glutámovej a variantom so samotnou aminokyselinou (1 mM), samotnou sacharózou (10 mM) a zmesou 10 mM sacharózy s 10 mM aminokyselinou. Ostatné varianty sa od seba preukazne nelíšili. Médium o koncentrácii sacharózy 10 mM dosahuje najvyššie hodnoty obsahu škrobu v protokormoch spomedzi variantov obsahujúcich samotnú sacharózu. Čo sa týka efektu samotnej kyseliny glutámovej, pri nízkych koncentráciách (0.1 a 1 mM) obsah škrobu v protokormoch oproti kontrole rástol, pričom koncentrácia 1 mM samotnej aminokyseliny dosahovala najlepších výsledkov zo všetkých variantov.

Naopak, čistý prídavok kyseliny glutámovej o koncentrácii 10 mM mal na obsah škrobu v protokormoch slabší efekt. Okrem toho je z grafu (Graf 10) zrejмый pokles obsahu škrobu v protokormoch *D. majalis* pri zvyšujúcej sa koncentrácii kyseliny glutámovej v zmesi s 10 mM sacharózou.

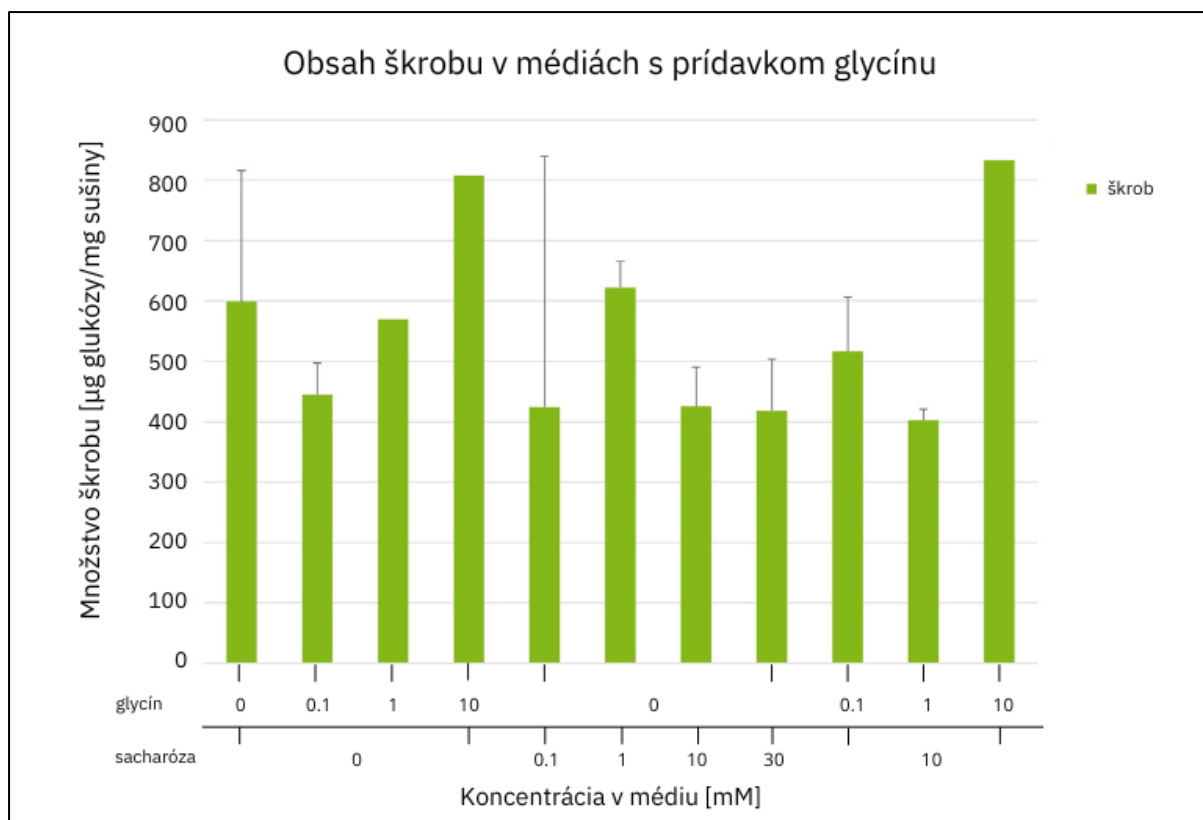


Graf 10: Extrakcia škrobu – experiment 2. Množstvo škrobu [μg glukózy/mg sušiny] v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom kyseliny glutámovej a sacharózy. V grafe sú znázornené priemerné hodnoty hmotností. Chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku, pričom varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky neboli zahrnuté do štatistickej analýzy – viď Tab. 11. Pomocou štatistickej metódy ANOVA boli medzi variantmi v obsahu škrobu štatisticky preukazné rozdiely, $p = 3.28 \times 10^{-4}$.

3.3.2 Glycín

Štatistická metóda ANOVA nepreukázala rozdiely, ale medzi variantmi sú zrejme zaujímavé trendy. Najvyšší obsah škrobu (Graf 11) bol nameraný v protokormoch *D. majalis* rastúcich na kultivačnom médiu obsahujúcom koncentráciu 10 mM glycínu a 10 mM sacharózy. Tesne nasledoval variant s koncentráciou 10 mM glycínu bez prídavku sacharózy. S rastúcou koncentráciou glycínu v médiu bez sacharózy sa zvyšovalo aj množstvo škrobu v protokormoch, ale nižšie koncentrácie aminokyseliny (0.1 a 1 mM) nedosahovali takých hodnôt, ako kontrola.

Protokormy rastúce na médiu s prídavkom 10 mM sacharózy a koncentráciou glycínu 0.1 mM obsahovali viac škrobu, ako varianty so sacharózou a 1 mM glycínu, čo malo na množstvo škrobu v protokormoch opačný efekt, ako vo variantoch bez prídavku sacharózy. Varianty so samotnou sacharózou obsahovali podobné množstvá škrobu, okrem variantu s koncentráciou sacharózy 1 mM, ktorý dosahoval výrazne vyšších hodnôt.

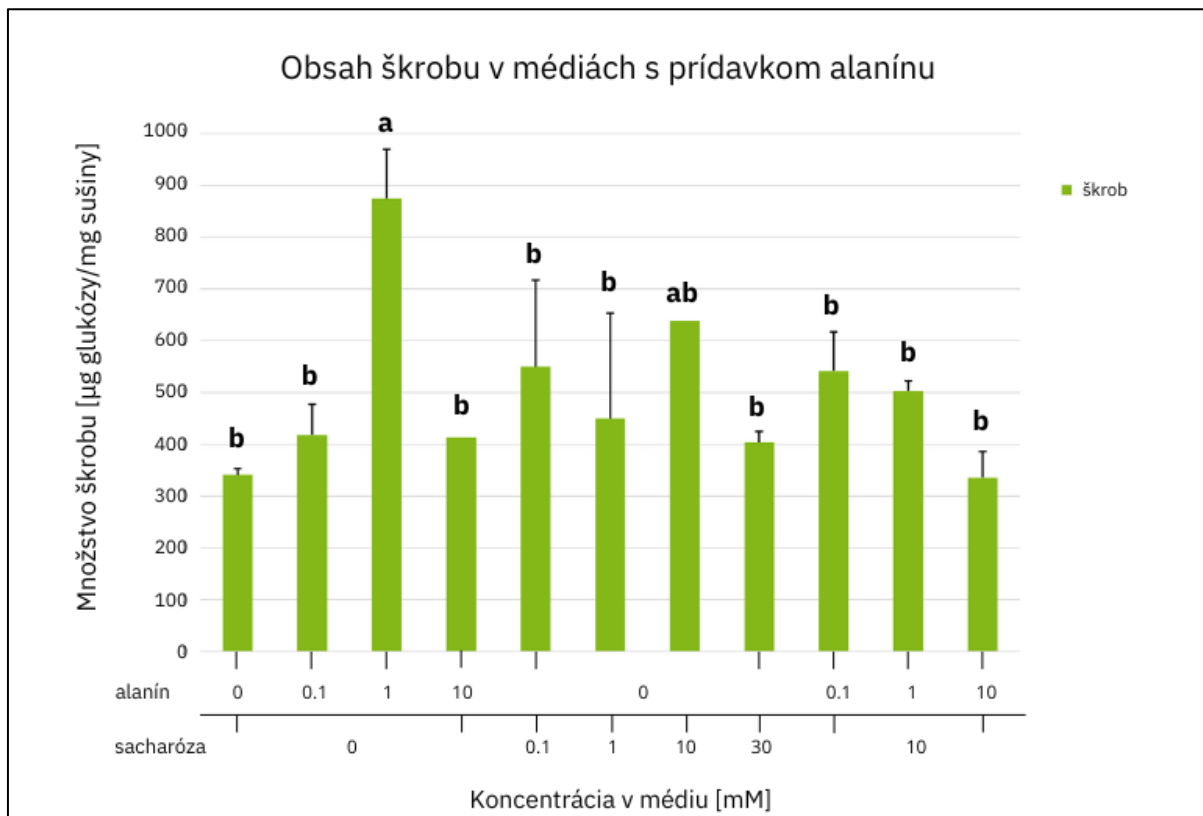


Graf 11: Extrakcia škrobu – experiment 3. Množstvo škrobu [μg glukózy/mg sušiny] v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom glycinu a sacharózy. V grafe sú znázornené priemerné hodnoty hmotností. Chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku, pričom varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky neboli zahrnuté do štatistickej analýzy – vid' Tab. 11. Pomocou štatistickej metódy ANOVA neboli medzi variantmi v obsahu škrobu štatisticky preukazné rozdiely, $p = 0.184$.

3.3.2 Alanín

Pomocou štatistickej metódy ANOVA boli nájdené preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi. Podľa štatistického testu TukeyHSD existuje oproti všetkým variantom rozdiel medzi variantmi so samotným 1 mM alanínom a samotnou 10 mM sacharózou. Ostatné varianty sa od seba preukazne nelíšili. Najviac škrobu teda obsahovali protokormy kultivované na médiu s prídavkom samotného alanínu o koncentrácii 1 mM.

Protokormy rastúce na médiách o koncentrácii 0.1 a 10 mM alanínu mali podobný efekt, ako kontrola, takže vyššia koncentrácia (10 mM) pridaného alanínu už nezvyšovala obsah škrobu v pletivách. Druhý najlepší efekt mal variant s obsahom samotnej 10 mM sacharózy. Z grafu (Graf 12) sú však na prvý pohľad viditeľné rôzne efekty variantov na obsah škrobu v protokormoch *D. majalis*, a to napríklad, že s rastúcou koncentráciou alanínu v zmesi s 10 mM sacharózou efekt na obsah škrobu postupne slabol.



Graf 12: Extrakcia škrobu – experiment 4. Množstvo škrobu [μg glukózy/mg sušiny] v protokormoch *D. majalis* na médiách s rôznym obsahom alanínu a sacharózy. V grafe sú znázornené priemerné hodnoty hmotností. Chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku, pričom varianty, ktoré obsahovali menej ako 3 vzorky neboli zahrnuté do štatistickej analýzy – vid' Tab. 11. Pomocou štatistickej metódy ANOVA boli medzi variantmi v obsahu škrobu štatisticky preukazné rozdiely, $p = 3.79 \times 10^{-5}$.

4 Diskusia

Aminokyseliny sú prekurzormi primárnych aj sekundárnych metabolitov a považujeme ich za kľúčovú chemickú zlúčeninu pri biosyntéze proteínov. V experimente na hydroponicky pestovaných rastlinách *Coriandrum sativum* bolo zistené, že prídavok exogénnych aminokyselín má priaznivý vplyv na rast a produkciu metabolicky aktívnych látok (Sowmya *et al.*, 2023), čím dokážu regulovať rôzne metabolické dráhy, ktoré sú súčasťou vegetatívnych aj generatívnych životných procesov (Ge *et al.*, 2009; Souri, 2016; Mohammadipour a Souri, 2019). Všeobecne sú aminokyseliny pre rastliny dobrým zdrojom uhlíka a energie a pravdepodobne dokážu zrýchliť príjem a tok látok v pletivách (Talaat *et al.*, 2014). Okrem toho sú dôležité aj pre metabolizmus dusíka, či už v rámci regulácie príjmu a spracovania nitrátu a amónneho kationu, alebo v už spomínanej proteosyntéze (Mohammadipour a Souri, 2019).

Na základe týchto znalostí by sme vedeli predpokladať, že by aminokyseliny mohli vyvíjajúcim sa protokormom slúžiť nielen ako vhodný zdroj dusíka, ale aj ako zdroj uhlíka a energie, keďže v raných štádiách potrebujú orchidey dostatok energie od svojich mykorhíznych partnerov. Kvôli nedostatku dostupnej literatúry dotýkajúcej sa touto témou priamo čeľade *Orchidaceae*, sú v rámci diskusie popisované rôznorodé experimenty vykonané aj na iných rastlinných čeľadiach, ktoré sa snažím dať do súvislosti. V nasledujúcich podkapitolách sú vyvedené domnienky, ktoré by nám mohli pomôcť priblížiť orchideoidne mykorhízny vzťah a prenos uhlíkatých látok medzi hubou a orchideou. Najskôr porovnávam efekt vybraných látok na veľkosť protokormov *D. majalis*, potom obsah rozpustných sacharidov a škrobu v protokormoch kultivovaných na médiách s prídavkom kyseliny glutámovej, glycínu a alanínu. Nakoniec sa venujem možnému prenosu uhlíka v rámci orchideoidnej mykorhízy.

4.1 Efekt vybraných aminokyselín a iných látok na veľkosť protokormov *D. majalis*

4.1.1 Kazeín enzymatický hydrolyzát

Pre výskum účinku aminokyselín na protokormy *D. majalis* bol použitý aj enzymatický hydrolyzát kazeínu (peptón z kazeínu), ktorý mal slúžiť ako kontrola toho, či a ako vedia orchidey využívať aminokyseliny, keďže ide o látku obsahujúcu vysoký podiel

rozičných voľných aminokyselín, či peptidov (Semiarti *et al.*, 2017) pochádzajúcich z tohto proteínu. Predpokladanými hypotézami bolo, že samotný hydrolyzovaný kazeín bude mať na rast protokormov slabší efekt, ako samotná sacharóza, a že najväčšie veľkosti protokormov budú namerané na variantoch obsahujúcich zmes hydrolyzáta kazeínu a sacharózy. Druhá časť hypotézy bola na rozdiel od prvej časti potvrdená a zmes hydrolyzovaného kazeínu a sacharózy mala naozaj štatisticky preukazný najvýznamnejší efekt na rast protokormov (Graf 1). Čo sa týka variantu obsahujúceho samotnú sacharózu, tieto výsledky boli porovnateľné s kontrolou, pričom prídavok samotného hydrolyzáta kazeínu mal oproti nim preukazne vyšší efekt. To by mohlo naznačovať, že protokormy sú schopné využiť ako zdroj živín dusík dostupný z voľných aminokyselín a peptidov.

Pri skúmaní rôznych typov organických kultivačných médií na orchideách *Vanda teres* (Sinha a Roy, 2004) a *Cymbidium pendulum* (Kaur a Bhutani, 2012) bolo zistené, že sa pri kultivácii protokormov na médiách s obsahom kazeín hydrolyzáta vyvinuli nadzemné časti u oboch orchideí a výrazne sa znásobil aj počet novo vzniknutých útvarov. Koncentrácia hydrolyzáta kazeínu v oboch experimentoch bola zhodná s koncentráciou, ktorá bola použitá v experimente k tejto diplomovej práci (2 g hydrolyzáta kazeínu na liter kultivačného média). Rovnako tak prídavok kazeín hydrolyzáta, spoločne s banánovým práškom, spôsobovali dobrý a rovnomerný rast týchto nadzemných častí. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri použití prídavku 100 mg na liter média (Sinha a Roy, 2004). Na základe záverov týchto experimentov by sa dalo zhrnúť, že proteínový hydrolyzát môže slúžiť orchideám ako vhodný zdroj látok a energie, keďže podporuje rast a ďalší vývoj kultivovaných protokormov.

4.1.2 Kyselina glutámová a kyselina asparágová

Z výsledkov je zrejmé, že kyselina glutámová (Graf 2) spoločne s kyselinou asparágovou (Graf 5) majú spomedzi ostatných vybraných látok najvýraznejší efekt na veľkosť protokormov. Veľkosti protokormov *D. majalis* sú väčšie u variantov so samotným obsahom kyseliny glutámovej v médiu, pričom kyselina asparágová má tento efekt najsilnejší v zmesi s 10 mM sacharózou. Celkovo však majú obe mnou skúmané aminokyseliny podobný trend (Graf 2, Graf 5). Veľkosť protokormov sa zväčšuje s rastúcou koncentráciou aminokyseliny v médiu, a to s prídavkom sacharózy, aj bez neho. Zvláštnosťou je slabý efekt variantu zmesi 10 mM sacharózy s 0.1 mM kyselinou glutámovou, keďže veľkosti protokormov nedosahovali takých hodnôt, ako pri samotnej sacharóze o koncentráciách 10 a 30 mM. U rovnakého variantu so zmesou kyseliny asparágovej a sacharózy bolo

dosiahnutých lepších výsledkov, ako vykazoval čistý prídavok sacharózy o koncentráciách 10 a 30 mM.

Kyselina glutámová je súčasťou rôznych metabolických dráh a slúži ako základ pre syntézu niektorých aminokyselín, z ktorých môžu byť syntetizované ďalšie aminokyseliny, či iné dusíkaté látky. Dalo by sa teda tvrdiť, že kyselina glutámová je nepriamym zdrojom aminoskupiny množstva metabolicky významných látok (Walker a Donk, 2016). Uhlík z kyseliny glutámovej môže po vzniku 2-oxoglutarátu taktiež vstúpiť do metabolizmu, a to napríklad do citrátového cyklu. Existujú organizmy, napríklad niektoré baktérie, ktoré dokonca ako zdroj uhlíka preferujú pred glukózou kyselinu glutámovú (Wezel *et al.*, 2006).

Experiment skúmajúci využitie dusíka protokormami vybraných orchideí ukázal, že použitie kyseliny asparágovej malo na rast semien orchidey *Cattleya* podobný efekt, ako prídavok dusičnanu amónneho. Použitie týchto dvoch látok viedlo k významnému rastu už po dvoch mesiacoch od výsevu, pričom rast na médiách s prídavkom kyseliny glutámovej alebo glycínu začal medzi druhým a tretím mesiacom. Oproti tomu semená kultivované na ostatných vybraných aminokyselinách začali významne rásť až po niekoľkých ďalších mesiacoch. Kyselina asparágová mala okrem toho pozitívny efekt na rast zrelých semien, ale inhibovala rast mladých embryí. Jedným zo záverov experimentu bolo, že dikarboxylové kyseliny môžu pozitívne vplývať na rast orchideí (Spoerl, 1948).

Persson a Näsholm (2001) skúmali príjem aminokyselín z pôdy koreňmi niekoľkých druhov boreálnych rastlín. Podľa ich výsledkov ale nebol príjem kyseliny glutámovej, ani kyseliny asparágovej z prostredia nijak významný. Príjem aminokyselín koreňmi z pôdy a protokormami z kultivačného média však nie je na tejto úrovni vhodné zrovnávať, keďže ide o celkom odlišné podmienky, ktoré môžu viesť k rozdielnym výsledkom. Okrem toho, príjem aminokyselín rastlinami môže byť závislý aj na ich koncentrácii v médiu (Borstlap, 1977).

4.1.3 Glycín

Najjednoduchšia aminokyselina – glycín – je podľa niektorých autorov vhodnou zložkou rastlinnej výživy (Souri, 2016). Glycín je v pletivách ľahko prenášaný a dobre využiteľný (Ge *et al.*, 2009). Je častou zložkou rôznych kultivačných médií, pretože je považovaný za univerzálny zdroj živín pre rastliny (Näsholm *et al.*, 2009; Abdelkader *et al.*, 2023). Taktiež je prekursorom ďalších komplexných organických látok, ako sú napríklad serín (Näsholm *et al.*, 2009), antioxidant glutatión alebo puríny (Kohlmeier, 2015).

Dalo by sa predpokladať, že by glycín mohol slúžiť ako zdroj uhlíka a dusíka (Taylor *et al.*, 2004). Podľa mojich výsledkov (Graf 3) bol najsilnejší efekt na veľkosť protokormov *D. majalis* viditeľný práve pri nízkej koncentrácii glycínu (0.1 mM). Zaujímavým zistením bolo, že zmes 0.1 mM glycínu a 10 mM sacharózy dosahuje najlepšie výsledky veľkostí protokormov. Dalo by sa preto povedať, že koncentrácia 0.1 mM glycínu má významný efekt na veľkosť protokormov, a to bez závislosti na prítomnosti sacharózy v médiu.

V porovnaní s ostatnými skúmanými látkami dosahoval experiment s glycínom ako jediný významné výsledky pri nízkych koncentráciách. Taktiež bol v tomto experimente viditeľný výrazný pokles veľkostí protokormov pri rastúcej koncentrácii aminokyseliny v zmesi s 10 mM sacharózou, pričom pri ostatných experimentoch bol pozorovaný opak. Okrem toho, zmesi sacharózy s 0.1 a 1 mM glycínu dosahujú lepších výsledkov, ako prítomnosť samotnej sacharózy v médiu. Prídavok nízkych koncentrácií glycínu k sacharóze má na veľkosť protokormov najpozitívnejší efekt, a to by mohlo znamenať, že ju orchidey dokážu prijímať ako zdroj uhlíka, prípadne dusíka, ale preferujú uhlík pochádzajúci zo sacharidov.

4.1.4 Alanín

Alanín je zapojený do syntézy rôznych metabolicky významných látok, napríklad do syntézy koenzýmu A (Broeckling *et al.*, 2005). Zároveň je známy svojou schopnosťou osmoprotekcie (Parthasarathy *et al.*, 2019) a pomáha tiež odolávať abiotickým stresom, napríklad stresu zo sucha (Broeckling *et al.*, 2005). Výsledky vyššie spomenutého experimentu Spoerla (1948), ktorý skúmal využitie dusíka z aminokyselín embryami vybraných orchideí, ukázali, že alanín inhibuje rast semien. Z výsledkov experimentov k diplomovej práci (Graf 4) sa dá tvrdiť, že nižšie koncentrácie alanínu (0.1 a 1 mM) boli podobné kontrole, ale prídavok alanínu o koncentrácii 10 mM významne inhiboval rast protokormov. Podobné výsledky boli dosiahnuté pri experimente s glycínom (Graf 3), kde je pozorovateľný pokles veľkosti protokormov pri koncentrácii 10 mM samotného glycínu, no v tomto prípade rozdiel nebol štatisticky preukazný.

Alanín ako jediná skúmaná látka spôsobovala nižšie veľkosti protokormov *D. majalis* pri prídavku vyššej koncentrácie tejto aminokyseliny do kultivačného média. Alanín teda nie je pre orchidey efektívnym zdrojom uhlíka. Efekt čistého prídavku sacharózy v nižších koncentráciách bol taktiež porovnateľný s kontrolou, pričom až koncentrácie 10 a 30 mM sacharózy o trochu zvýšili veľkosť protokormov. Zaujímavým výsledkom však bolo, že

zmesi sacharózy s postupne rastúcimi koncentráciami aminokyseliny mali preukazne najlepší efekt na protokormy *D. majalis*.

4.1.5 Pyruvát

Pyruvát je významný metabolit a finálny produkt glykolýzy. V diplomovej práci bol pyruvát sodný použitý ako „kontrola“ zapojenia do metabolizmu orchideí, keďže sa v organizmoch zúčastňuje rozličných metabolických procesov a slúži ako substrát pri rôznych chemických reakciách, či syntézach látok. V experimente skúmajúcom efekt pyruvátu sodného na riasu *Chlorella vulgaris* bol pozorovaný pozitívny vplyv prídavku pyruvátu na rast biomasy a obsahu chlorofylu tejto riasy (Tandon *et al.*, 2020). Prídavok pyruvátu do kultivačných médií mal pozitívny efekt aj na veľkosti protokormov *D. majalis*. Vyššie koncentrácie (1 a 10 mM) samotného pyruvátu mali na veľkosť protokormov silnejší efekt, než koncentrácia 0.1 mM (Graf 6). Zároveň mal prídavok nízkej koncentrácie pyruvátu (0.1 mM) silnejší efekt, než kontrolné médium.

Aj rastúca koncentrácia pyruvátu vo variantoch s prídavkom 10 mM sacharózy mala preukazne pozitívny vplyv na veľkosť protokormov, čo môže naznačovať, že pyruvát je efektívnym zdrojom uhlíka pre vývojové procesy *D. majalis*. Rovnaký trend bol pozorovaný aj u experimentov s aminokyselinami, okrem experimentu s glycínom (Graf 3), kde zvyšujúca sa koncentrácia aminokyseliny spôsobovala horší rast protokormov.

4.2 Efekt vybraných aminokyselín na obsah rozpustných sacharidov a škrobu v protokormoch *D. majalis*

Z grafov (Graf 7A, 8A, 9A) a náležitých tabuliek (Tab. 12, 13, 14) zobrazujúcich obsah rozpustných sacharidov (sacharózy, glukózy a fruktózy) v protokormoch *D. majalis* je viditeľné, že protokormy pestované na médiách s prídavkom glycínu a alanínu bez sacharózy vykazovali nižší obsah rozpustných sacharidov v protokormoch, než na médiách so sacharózou. Pokles bol pozorovaný taktiež u experimentu s kyselinou glutámovou, ale len u variantu samotnej aminokyseliny o koncentrácii 10 mM. Výrazne vysoké množstvo rozpustných sacharidov a príslušná nameraná chyba u variantu s koncentráciou 1 mM kyseliny glutámovej sú však pravdepodobne spôsobené chybou merania. Nízky obsah endogénnych sacharidov nasvedčuje, že dané varianty nedokážu protokormu plne nahradiť sacharózu. Dostálová (2016) vo svojej diplomovej práci takisto skúmala obsah endogénnych

rozpuštných sacharidov v protokormoch *D. majalis*, pričom do kultivačných médií bol pridávaný glutamín. Podľa jej výsledkov dosahovali protokormy rastúce na médiách so samotným glutamínom porovnateľné množstvo rozpuštných sacharidov, ako kontrola, i keď je vidieť malý pokles v obsahu sacharidov pri koncentrácii 10 mM glutamínu, čo je zjavné aj z mojich výsledkov.

U všetkých troch experimentov bol u variantov so samotnou sacharózou pozorovaný logický nárast obsahu rozpuštných sacharidov s rastúcou koncentráciou sacharózy v kultivačnom médiu. Rovnaké výsledky uvádza aj Dostálová (2016). Jedine u glycínu dosahoval variant s koncentráciou 30 mM sacharózy nižších hodnôt, ako predchádzajúci variant o koncentrácii 10 mM. Variant s 30 mM sacharózou však v experimente s glycínom ako jediný zo všetkých experimentov obsahoval najvyššie množstvo fruktózy a taktiež relatívne vysoké množstvo glukózy oproti koncentrácii 10 mM samotnej sacharózy.

Dostálová (2016) popisuje svoje výsledky zmesi sacharózy s glutamínom ako porovnateľné s výsledkami pre samotnú 10 mM sacharózu. Z príslušných meraní k mojej diplomovej práci sa vo väčšine prípadov tieto výsledky dajú tiež označiť ako porovnateľné. Výraznou odchýlkou je zmes sacharózy a vyšších koncentrácií glycínu (1 a 10 mM), kde bol oproti samotnej 10 mM sacharóze zistený štatisticky preukazný rozdiel. Podľa numerického vyhodnotenia mojich dát však vedie prídavok aminokyselín k 10 mM sacharóze k nižšiemu obsahu jednotlivých rozpuštných sacharidov v pletivách. Jedinou výnimkou je vyššie množstvo rozpuštných sacharidov u zmesi kyseliny glutámovej o koncentrácii 0.1 mM s 10 mM sacharózou, než u čistého prídavku sacharózy o koncentrácii 10 mM.

V odlišnom experimente, ktorý skúmal obsah rozpuštných endogénnych sacharidov v listoch *Solanum lycopersicum* po ich ošetrovaní roztokmi vybraných aminokyselín (Alfosea-Simón *et al.*, 2021), boli pozorované podobnosti s mojimi výsledkami. Ukázalo sa, že koncentrácia glukózy v listoch ošetrovaných alanínom bola výrazne nižšia, než pri použití kyseliny glutámovej (Alfosea-Simón *et al.*, 2021). Experiment s alanínom (Graf 9, Tab. 14), v súhrnnom porovnaní s mojimi ostatnými experimentmi, mal taktiež celkovo najnižší efekt na množstvo jednotlivých rozpuštných sacharidov v protokormoch *D. majalis*. Rovnako tak prídavok alanínu v koncentrácii 10 mM viedol k pomerovo najnižším hodnotám v obsahu endogénnych sacharidov, a to bez závislosti na prítomnosti sacharózy v kultivačnom médiu. Naopak, experiment s kyselinou glutámovou dosahoval najlepších priemerných výsledkov na obsah celkových rozpuštných sacharidov, ako aj najvyššie priemerné množstvo sacharózy a fruktózy v pletivách.

Klíčiace semeno pestované na kultivačnom médiu s prídavkom rozpustných sacharidov postupne prechádza rôznymi metabolickými reakciami, medzi ktoré patrí aj syntéza škrobu (Manning a Staden, 1987). Prídavok sacharózy do kultivačného média by mal teda korelovať s obsahom škrobu v protokormoch. Z grafov ukazujúcich obsah škrobu v protokormoch *D. majalis* (Graf 10 až Graf 12) však nebolo vidieť koreláciu s množstvom pridanej sacharózy do kultivačného média u žiadneho experimentu. Jedine u experimentu s glycínom stúpol obsah škrobu s rastúcim iniciálnym prídavkom rozpustného sacharidu, a to vo variante s 10 mM sacharózou v zmesi s 10 mM aminokyselinou. U experimentov s kyselinou glutámovou a alanínom bol s rastúcim prídavkom sacharózy v zmesi s aminokyselinou pozorovaný naopak klesajúci obsah škrobu v protokormoch.

V grafoch obsahu škrobu v protokormoch s prídavkom kyseliny glutámovej (Graf 10) a alanínu (Graf 12) sú viditeľné rovnaké trendy. Prídavok zvyšujúcich sa koncentrácií alanínu k 10 mM sacharóze postupne znižoval obsah škrobu v protokormoch *D. majalis*. Vyššie koncentrácie kyseliny glutámovej v prídavku k 10 mM sacharóze taktiež spôsobili klesajúci efekt, no variant s 0.1 mM aminokyselinou spôsobil oproti čistej sacharóze vyšší obsah škrobu v pletivách. Vyššie koncentrácie pridaných aminokyselín k 10 mM sacharóze spôsobujú menšie množstvo zásob škrobu v protokormoch, a teda tieto varianty nie sú tak efektívnym zdrojom energie. Preukazne najväčší obsah škrobu bol v oboch experimentoch nameraný pri koncentrácii 1 mM samotnej aminokyseliny. U kyseliny glutámovej je oproti tomuto variantu najvýznamnejší rozdiel u 1 mM samotnej sacharózy a v prípade 10 mM kyseliny glutámovej, a to bez závislosti na prídavku sacharózy. Čo sa týka množstva škrobu v protokormoch kultivovaných na médiách s alanínom, 1 mM prídavok aminokyseliny je porovnateľný výlučne s variantom o čistom prídavku 10 mM sacharózy.

U experimentu s glycínom (Graf 11) neboli pomocou štatistickej metódy ANOVA zistené preukazné rozdiely medzi jednotlivými variantmi, avšak viditeľný je najvyšší obsah škrobu u zmesi 10 mM sacharózy s 10 mM aminokyselinou a hneď druhý najvyšší obsah pri 10 mM samotného glycínu. Zmes 10 mM glycínu s 10 mM sacharózou dosahovala najvyššieho množstva škrobu v pletivách oproti rovnakým koncentráciám u zvyšných experimentov. Celkovo bol teda nameraný vyšší obsah endogénnych sacharidov a škrobu v experimente s kyselinou glutámovou, ako bolo namerané u rovnakých variantov ostatných experimentov.

4.3 Prenos uhlíka v orchideoidnej mykorhíze

Klíčiace semená orchideí vyžadujú pre správny ďalší rast a vývoj exogénny zdroj uhlíka a energie. Pre svoj charakteristický spôsob vývoja sú všetky orchidey v raných fázach života odkázané na príjem uhlíka od orchideoidne mykorhíznych húb (Stöckel *et al.*, 2014; Dearnaley a Cameron, 2017). Nedostatočný príjem uhlíkatých látok môže viesť k spomaleniu rastu protokormov (Leake, 1994). Rovnaké výsledky boli pozorované aj v tejto práci u experimentálnych variantov s nižším obsahom sacharózy v kultivačnom médiu. Na základe mojich výsledkov (Graf 2 až Graf 6) je ale tiež zrejmé, že príliš vysoké koncentrácie sacharózy v kultivačnom médiu (30 mM) už nespôsobujú väčšiu veľkosť protokormov, než koncentrácia 10 mM, ktorá sa javila ako najoptimálnejšia koncentrácia. Nedá sa však predpokladať, že by sacharóza bola poskytovaná z OMF orchideám.

Napriek tomu, že v OM vzťahu je dôležitá špecifita oboch organizmov, je tiež možné, že pre meniace sa nároky na živiny medzi rôznymi vývojovými štádiami niektorých orchideí sa mení aj druhové zastúpenie mykorhíznych húb v symbióze (Fuji *et al.*, 2020). Podľa niektorých autorov (Gebauer a Meyer, 2003; Hynson *et al.*, 2013) orchidey prijímajú od húb podstatne viac dusíka, než uhlíka, čo bolo zistené meraním značených izotopov týchto prvkov v pletivách orchideí. Príjem dusíka hubového pôvodu ale často súvisí aj s príjmom uhlíka, keďže organické formy dusíkatých zlúčenín obsahujú práve uhlíkové kostry (Stöckel *et al.*, 2014). Nepomer medzi nameraným množstvom prijatého značeného uhlíka a dusíka a nižší obsah uhlíka v nadzemných častiach by však mohol byť vysvetlený spotrebou ^{13}C pri respiračnej aktivite orchideí (Näsholm *et al.*, 2000; Cameron *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2009; Bougoure *et al.*, 2010).

Na danú tému však ale nebol vykonaný dostatok experimentov, ktoré by tieto závery mohli jednoznačne potvrdiť alebo vyvrátiť. Okrem toho, experimenty s aminokyselinami sú mnohokrát vedené na iných čeľadiach rastlín, napríklad na plodinách (Ge *et al.*, 2009; Mohammadipour a Souri, 2019; Alfosea-Simón *et al.*, 2021; Sowmya *et al.*, 2023), ktoré sú okrem toho v rozličných životných štádiách. Tieto experimenty majú často za cieľ zlepšiť výnos, alebo odolnosť rastlín pred abiotickými faktormi stresu, takže sa nedá dostatočne presne porovnať efekt pridaných exogénnych aminokyselín na rast danej úžitkovej rastliny a orchidey *D. majalis* použitej v tejto diplomovej práci. Omnoho viac autorov sa venuje transportu dusíka, alebo skúma ako možný zdroj energie rôzne sacharidy, ako bolo popísané v kapitole o uhlíkatých látkach. Najnovšie štúdie napríklad ukazujú, že ako najvhodnejší zdroj

uhlíka by pre orchidey mohla byť glukóza pochádzajúca z hydrolýzy trehalózy hubového pôvodu (Zhao *et al.*, 2024). Nie je však vylúčené, že by aminokyseliny húb naozaj mohli slúžiť orchideám ako dostatočný zdroj uhlíka (Zhao *et al.*, 2024).

Stále teda nie je celkom jasné, aké látky sú v OM prenášané z húb do protokormov orchideí a ktoré látky dokážu slúžiť ako zdroj uhlíka a dusíka. Existujú o tom rôzne diskusie, pričom autori sa častokrát nevedia zhodnúť na jednotnom výsledku. Niektoré štúdie popisujú, že by mohli byť ako zdroj uhlíka využívané rozpustné sacharidy (Smith, 1967; Ernst, 1971; Ernst *et al.*, 1971; Purves a Hadley, 1976; Ponert a Lipavská, 2017; Ponert *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2024), iné zase preferujú účinnosť aminokyselín (Persson a Näsholm, 2001; Dearnaley a Cameron, 2017; Fochi *et al.*, 2017b; Suetsugu *et al.*, 2017; Lallemand *et al.*, 2019). Je však taktiež možné, že sú do protokormov orchideí prenášané nielen rozpustné sacharidy, ale aj aminokyseliny, a rovnako tak môžu byť využívané oboje. Moje experimenty porovnávali efekt vybraných látok na rast protokormov a obsah endogénnych sacharidov a škrobu. Podľa výsledkov experimentov k diplomovej práci bola z vybraných aminokyselín a pyruvátu v raste protokormov *D. majalis* najviac efektívna kyselina glutámová, ktorá prekonala účinok ostatných látok pri rovnakých koncentráciách aspoň dvojnásobne. Okrem toho mala ako jediná z vybraných látok pri prídavku v koncentrácii 10 mM väčší efekt na rast protokormov, ako samotná sacharóza o rovnakej koncentrácii. Pozoruhodným výsledkom je, že kyselina glutámová, ako jediná zo skúmaných látok, dokázala protokormom *D. majalis* pri koncentrácii 10 mM nahradiť sacharózu. O čosi menší, ale stále preukazný efekt na rast protokormov mali aj zvyšujúce sa koncentrácie kyseliny asparágovej a pyruvátu. Kyselina glutámová a v menšej miere aj kyselina asparágová a pyruvát, môžu vyvíjajúcim sa protokormom *D. majalis* slúžiť ako dostatočný zdroj uhlíka a energie. Dôvodom významných výsledkov u prvých dvoch látok by mohla byť ich chemická štruktúra dikarboxylovej kyseliny.

Naopak, prídavok samotného alanínu a glycínu dosahoval podobných výsledkov, ako kontrola, pričom vysoká koncentrácia alanínu (10 mM) pôsobila na protokormy negatívne. Avšak, efekt glycínu v koncentrácii 0.1 mM bol o trochu vyšší, než kontrola. To platilo aj v zmesi s 10 mM sacharózou, no so zvyšujúcou sa koncentráciou glycínu sa efekt zase znižoval. S výnimkou glycínu sa tak u všetkých experimentov s rastúcou koncentráciou pridanej látky v kombinácii so sacharózou zvyšoval aj efekt na rast protokormov. Z porovnania výsledkov účinku sacharózy a vybraných látok je zrejmé, že glycín, ani alanín nedokážu protokormu dodať dostatočné množstvo uhlíka. Protokorm preto pre svoj vývoj potrebuje prijať exogénny rozpustný sacharid, ako už bolo zhrnuté v niekoľkých ďalších

štúdiách (Smith, 1966; Ernst *et al.*, 1971; Dostálová, 2016; Ponert a Lipavská, 2017; Ponert *et al.*, 2021). Napriek tomu, že protokormy prijali vo forme pridaných aminokyselín aj uhlík, u väčšiny variantov so samotnými aminokyselinami neboli vytvorené dostatočné zásoby endogénnych sacharidov pre vyvíjajúce sa protokormy. To naznačuje, že tieto látky neboli dostatočným zdrojom uhlíka pre celý metabolizmus protokormov. Je naopak pravdepodobné, že skúmané aminokyseliny slúžia protokormom ako významný zdroj dusíka. S ohľadom na výrazný pozitívny efekt kyseliny glutámovej je relevantné spomenúť, že v štúdií na orchidei *Aerides maculosum* bola v degradujúcich pelotónoch zaznamenaná vysoká aktivita glutamátdehydrogenázy (Senthilkumar *et al.*, 2000). Je teda možné, že prenos glutamátu z OMF do orchideí by mohol byť spojený s fázou degradácie pelotónov. Každopádne ale príjem a využitie látok hubového pôvodu záleží aj na konkrétnom mykorhíznom partnerovi, či jedincovi, alebo napríklad aj na zložení okolitého prostredia (Novotná *et al.*, 2023).

Pre lepšie pochopenie toku uhlíka v orchideoidnej mykorhíze je nutný detailnejší výskum zahrňujúci rôzne druhy orchideí a ďalšie aminokyseliny, prípadne ich rôzne kombinácie. Zároveň aj výsledky z extrakcie rozpustných sacharidov a škrobu z variantov obsahujúcich prídavok kyseliny asparágovej a pyruvátu mohli ukázať zaujímavé trendy. Tie sa však nepodarilo získať vzhľadom k ich neúmyselnému zničeniu. Taktiež nebolo možné tieto experimenty zopakovať, a to kvôli dĺžke ich trvania, keďže semená *D. majalis* sa kultivujú až 4 mesiace.

Záver

Diplomová práca bola zameraná na výskum vplyvu vybraných aminokyselín a pyruvátu na rast a vývoj protokormov orchidey *Dactylorhiza majalis*. Cieľom práce bolo zistiť, aká je schopnosť orchideí využívať tieto látky ako zdroj živín a energie.

Experimenty vedené k tejto diplomovej práci ukázali, že enzymatický hydrolyzát kazeínu môže slúžiť ako čiastočný zdroj uhlíka pre protokormy. Jeho zmes so sacharózou podporovala rast protokormov najviac, pričom samotný hydrolyzát kazeínu napomáhal rastu viac, než samotná sacharóza. To poukazuje na schopnosť orchideí efektívne využívať voľné aminokyseliny. Kyselina glutámová môže slúžiť ako významný zdroj uhlíka pre vyvíjajúci sa protokorm. Z aminokyselín testovaných v tejto práci podporovala rast protokormov najviac, a aj bez prídavku sacharózy dosahovala lepších výsledkov, ako pyruvát alebo samotná sacharóza. Kyselina asparágová môže pravdepodobne tiež slúžiť ako zdroj uhlíka pre protokormy, aj keď rast podporuje menej ako kyselina glutámová a nedokáže plne nahradiť sacharózu. V prítomnosti sacharózy môže rast protokormov výrazne zlepšiť. Glycín a alanín zrejme nie sú príliš významným zdrojom uhlíka. Rast protokormov podporovali menej ako sacharóza alebo kyselina glutámová a k výraznejšej podpore rastu protokormov došlo len v prítomnosti sacharózy. Pyruvát pravdepodobne môže slúžiť ako zdroj uhlíka. Rast síce nepodporuje tak výrazne ako kyselina glutámová, ale pri nižších koncentráciách môže nahradiť sacharózu. Výsledky teda ukazujú, že nie všetky aminokyseliny sú pre rast orchideí rovnako účinné, a že ich efektivita môže byť ovplyvnená aj ich koncentráciou v kultivačnom médiu. Niektoré aminokyseliny však môžu nahradiť exogénnu sacharózu a slúžiť ako dobrý zdroj uhlíka pre protokormy *D. majalis*. Z testovaných látok je najefektívnejšia kyselina glutámová.

Hlbšie porozumenie tejto problematike môže prispieť k lepšiemu rastu a vývoju orchideí v kultivačných podmienkach, čo je dôležité aj pre hlbšie porozumenie metabolických potrieb orchideí a mechanizmu prenosu uhlíka z mykorhíznych húb do orchideí. Na základe dostupných dát sa môžeme domnievať, že dochádza k prenosu rozpustných sacharidov aj aminokyselín.

Použitá literatura

ABDELKADER, Mostafa; VORONINA, Luidmila; PUCHKOV, Mikhail; SHCHERBAKOVA, Natalya; PAKINA, Elena; ZARGAR, Meisam; LYASHKO, Marina. Seed priming with exogenous amino acids improves germination rates and enhances photosynthetic pigments of onion seedlings (*Allium cepa* L.). *Horticulturae*. Online. 2023, roč. 9, č. 1, s. 80. ISSN 2311-7524. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010080>. [cit. 2024-07-31].

AI, Yan-yu; LIU, Qiang; HU, Hai-xia; SHEN, Ting; MO, Yu-xuan; WU, Xun-Feng; LI, Jin-Long; DOSSA, Gdabamassi G.O. a SONG, Liang. Terrestrial and epiphytic orchids exhibit different diversity and distribution patterns along an elevation gradient of Mt. Victoria, Myanmar. *Global ecology and conservation*. Online. 2023, roč. 42, s. e02408. ISSN 2351-9894. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02408>. [cit. 2024-07-14].

ALEXANDER, Clare; ALEXANDER, Iain J. a HADLEY, Gilbert. Phosphate uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *The New Phytologist*. Online. 1984, roč. 97, č. 3, s. 401-411. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb03606.x>. [cit. 2024-05-28].

ALEXANDER, Clare, a HADLEY, Gilbert. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* br. *The New Phytologist*. Online. 1984, roč. 101, č. 4, s. 657–665. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/2432899>. [cit. 2024-05-28].

ALFOSEA-SIMÓN, Marina; SIMÓN-GRAO, Silvia; ZAVALA-GONZALEZ, Ernesto Alejandro; CÁMARA-ZAPATA, Jose Maria; SIMÓN, Inmaculada; MARTÍNEZ-NICOLÁS, Juan J.; LIDÓN, Vicente a GARCÍA-SÁNCHEZ, Francisco. Physiological, nutritional and metabolomic responses of tomato plants after the foliar application of amino acids aspartic acid, glutamic acid and alanine. *Frontiers in plant science*. Online. 2021, roč. 11, s. 581234. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581234>. [cit. 2024-07-13].

ALGHAMDI, Sameera A. Biological role of mycorrhizal fungi on the assimilation and transportation of carbon and nitrogen to *Anacamptis palustris* and *Anacamptis laxiflor*. *Saudi journal of biological sciences*. Online. 2019, roč. 27, č. 1, s. 465-473. ISSN 1319-562X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.010>. [cit. 2024-05-28].

ARDITTI, Joseph. Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*. Online. 1967, roč. 33, č. 1, s. 1-97. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/4353735>. [cit. 2024-04-16].

ARDITTI, Joseph a GHANI, Abdul K.A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *The New phytologist*. Online. 2000, roč. 145, č. 3, s. 367-421. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>. [cit. 2024-04-17].

AVIGAD, Gad, LOEWUS, Frank A. a TANNER, Widmar. Sucrose and Other Disaccharides. In: *Plant Carbohydrates I*. Online. New York: *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 1982, s. 217–347. ISBN 978-3-642-68275-9. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-68275-9_7. [cit. 2024-07-14].

BARMAN, Debasis a NAIK, Soumendra K. Effect of substrate, nutrition and growth regulator on productivity and mineral composition of leaf and pseudobulb of *Cymbidium* hybrid "Baltic Glacier Mint Ice.". *Journal of plant nutrition*. Online. 2017, roč. 40, č. 6, s. 784-794. ISSN 0190-4167. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1201496>. [cit. 2024-07-14].

BARTHLOTT, Wilhelm a CAPESIUS, Ingrid. Mikromorphologische und funktionelle Untersuchungen am Velamen radicum der Orchideen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. Online. 1975, roč. 88, č. 3, s. 379-390. ISSN 0365-9631. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1975.tb02473.x>. [cit. 2024-07-14].

*¹BERNARD, Noël. Sur la germination du *Neottia nidus-avis*. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci*. Online. 1899, roč. 128, s. 1253–1255. [cit. 2024-06-22].

¹ * je označený sekundárny zdroj.

BISWAS, Siddhartha S; SINGH, Dilip R; DE, Lakshman C; KALAIIVANAN, Nagarajan. S.; PAL, Ram a JANAKIRAM, Tolety. A comprehensive scenario of orchid nutrition - a review. *Journal of plant nutrition*. Online. 2021, roč. 44, č. 6, s. 905-917. ISSN 0190-4167. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1871758>. [cit. 2024-05-22].

BORSTLAP, Adrianus C. Kinetics of the uptake of some neutral amino acids by *Spirodela polyrhiza*. *Acta botanica neerlandica*. Online. 1977, roč. 26, č. 2, s. 115–128. ISSN 0044-5983. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1977.tb01105.x>. [cit. 2024-07-31].

BOUGOURE, Jeremy J.; BRUNDRETT, Mark C. a GRIERSON, Pauline F. Carbon and nitrogen supply to the underground orchid, *Rhizanthella gardneri*. *The New Phytologist*. Online. 2010, roč. 186, č. 4, s. 947-956. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03246.x>. [cit. 2024-07-03].

BRINK, Royal A. a COOPER, Daniel C. The Endosperm in Seed Development (Concluded). *The Botanical review*. Online. 1947, roč. 13, č. 9, s. 479-541. ISSN 0006-8101. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02861549>. [cit. 2024-04-20].

BROECKLING, Corey D.; HUHMANN, David V.; FARAG, Mohamed A.; SMITH, Joel T.; MAY, Gregory D.; MENDES, Pedro; DIXON, Richard A.; SUMNER, Lloyd W. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of experimental botany*. Online. 2005, roč. 56, č. 410, s. 323-336. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/eri058>. [cit. 2024-07-31].

CAMERON, Duncan D.; LEAKE, Jonathan R. a READ, David J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: Evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *The New phytologist*. Online. 2006, roč. 171, č. 2, s. 405-416. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01767.x>. [cit. 2024-05-10].

CAMERON, Duncan D.; JOHNSON, Irene; LEAKE, Jonathan R. a READ, David J. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*. Online. 2007, roč. 99, č. 5, s. 831-834. ISSN 0305-7364. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm018>. [cit. 2024-05-28].

CAMERON, Duncan D.; JOHNSON, Irene; READ, David J. a LEAKE, Jonathan R. Giving and receiving: Measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *The New Phytologist*. Online. 2008, roč. 180, č. 1, s. 176-184. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02533.x>. [cit. 2024-05-13].

CHASE, Mark W.; CAMERON, Kenneth M.; FREUDENSTEIN, John V.; PRIDGEON, Alec M.; SALAZAR, Gerado; BERG, Cássio van den a SCHUITEMAN, André. Updated classification of Orchidaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*. Online. 2015, roč. 177, č. 2, s. 151-174. ISSN 0024-4074. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/boj.12234>. [cit. 2024-07-13].

CHOMICKI, Guillaume; BIDEL, Luc P.R. a JAY-ALLEMAND, Christian. Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylax lindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. *Flora. Morphologie, Geobotanik, Oekophysiologie*. Online. 2014, roč. 209, č. 2, s. 88-94. ISSN 0367-2530. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.01.001>. [cit. 2024-07-13].

CHOMICKI, Guillaume; BIDEL, Luc P.R.; MING, Feng; COIRO, Mario; ZHANG, Xuan; WANG, Yaofeng; BAISSAC, Yves; JAY-ALLEMAND, Christian a RENNER, Susanne S. Velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *The New phytologist*. Online. 2015, roč. 205, č. 3, s. 1330-1341. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.13106>. [cit. 2024-05-21].

CHRISTENHUSZ, Maarten J.M. a BYNG, James W. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. Online. 2016, roč. 261, č. 3, s. 201-217. ISSN 1179-3163. Dostupné z: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>. [cit. 2024-05-02].

COATES, Fiona; LUNT, Ian D. a TREMBLAY, Raymond L. Effects of disturbance on population dynamics of the threatened orchid *Prasophyllum correctum* D.L. Jones and implications for grassland management in south-eastern Australia. *Biological Conservation*. Online. 2006, roč. 129, č. 1, s. 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.06.037>. [cit. 2024-07-13].

DEARNALEY, John; PEROTTO, Silvia a SELOSSE, Marc-André. Structure and development of orchid mycorrhizas. In: *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Online. Hoboken, NJ: *John Wiley & Sons*, 2016, s. 63-86. ISBN 9781118951446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch5>. [cit. 2024-05-28].

DEARNALEY, John D.W. a CAMERON, Duncan D. Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis – further evidence for a mutualistic association. *The New Phytologist*. Online. 2017, roč. 213, č. 1, s. 10-12. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.14357>. [cit. 2024-07-09].

DOSTÁLOVÁ, Magdalena. Utilizace vybraných sacharidů houbového původu orchidejemi a jejich možný přenos v mykorhize. Diplomová práce. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin, 2016. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/73772>. [cit. 2024-02-27].

ERIKSSON, Ove a KAINULAINEN, Kent. The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. Online. 2011, roč. 13, č. 2, s. 73-87. ISSN 1433-8319. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.02.002>. [cit. 2024-04-17].

ERNST, Robert. Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis*. *American Orchid Society Bulletin*. Online. 1967, roč. 36, s. 1068-1073. [cit. 2024-07-09].

ERNST, Robert., ARDITTI, Joseph a HEALEY, Patrick L. Carbohydrate physiology of orchid seedlings. II. Hydrolysis and effects of oligosaccharides. *Botanical Society of America*. Online. 1971, roč. 58, s. 827–835. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1971.tb10036.x>. [cit. 2024-05-07].

ERNST, Robert a ARDITTI, Joseph. Carbohydrate Physiology of Orchid Seedlings. III. Hydrolysis of Maltooligosaccharides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) Seedlings. *American journal of botany*. Online. 1990, roč. 77, č. 2, s. 188-195. ISSN 0002-9122. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb13545.x>. [cit. 2024-05-22].

ESNAULT, Anne-Laure; MASUHARA, Gaku a MCGEE, Peter A. Involvement of exodermal passage cells in mycorrhizal infection of some orchids. *Mycological research*. Online. 1994, roč. 98, č. 6, s. 672-676. ISSN 0953-7562. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80415-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80415-2). [cit. 2024-05-21].

FOCHI, Valeria; FALLA, Nicole; GIRLANDA, Mariangela; PEROTTO, Silvia a BALESTRINI, Raffaella. Cell-specific expression of plant nutrient transporter genes in orchid mycorrhizae. *Plant science (Limerick)*. Online. 2017a, roč. 263, s. 39-45. ISSN 0168-9452. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.06.015>. [cit. 2024-05-28].

FOCHI, Valeria; CHITARRA, Walter; KOHLER, Annegret; VOYRON, Samuele; SINGAN, Vasanth R.; LINDQUIST, Erika A.; BARRY, Kerrie W.; GIRLANDA, Mariangela; GRIGORIEV, Igor V.; MARTIN, Francis a BALESTRINI, Raffaella. Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*–*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *The New Phytologist*. Online. 2017b, roč. 213, č. 1, s. 365-379. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.14279>. [cit. 2024-05-28].

FUJI, Masako, MIURA, Chihiro, YAMAMOTO, Tatsuki; KOMIYAMA, Shintaro; SUETSUGU, Kenji; YAGAME, Takahiro; YAMATO, Masahide a KAMINAKA, Hironori. Relative effectiveness of *Tulasnella* fungal strains in orchid mycorrhizal symbioses between germination and subsequent seedling growth. *Symbiosis*. Online. 2020, roč. 81, s. 53–63. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00681-0> [cit. 2024-07-16].

GE, Tida; SONG, Shiwei; ROBERTS, Paula; JONES, Davey L.; HUANG, Danfeng a IWASAKI, Kozo. Amino acids as a nitrogen source for tomato seedlings: The use of dual-labeled (¹³C, ¹⁵N) glycine to test for direct uptake by tomato seedlings. *Environmental and experimental botany*. Online. 2009, roč. 66, č. 3, s. 357-361. ISSN 0098-8472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.004>. [cit. 2024-07-10].

GEBAUER, Gerhard a MEYER, Mikhail. N and C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *The New Phytologist*. Online. 2003, roč. 160, č. 1, s. 209-223. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00872.x>. [cit. 2024-05-28].

GIRLANDA, Mariangela; SELOSSE, Marc-André; CAFASSO, Donato; BRILLI, Federico; DELFINE, Stephane; FABBIAN, Robert; GHIGNONE, Paolo; PINELLI, Paolo; SEGRETO, Riccardo; LORETO, Francesco; COZZOLINO, Salvatore a PEROTTO, Silvia. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology*. Online. 2006, roč. 15, č. 2, s. 491-504. ISSN 0962-1083. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02770.x>. [cit. 2024-07-16].

GIVNISH, Thomas J.; SPALINK, Daniel; AMES, Mercedes; LYON, Stephanie P.; HUNTER, Steven J.; ZULUAGA, Alejandro; ILES, William J.D.; CLEMENTS, Mark A.; ARROYO, Mary T.K.; LEEBENS-MACK, James; ENDARA, Lorena; KRIEBEL, Ricardo; NEUBIG, Kurt M.; WHITTEN, Mark W.; WILLIAMS, Norris H. a CAMERON, Kenneth M. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences*. Online. 2015, roč. 282, č. 1814, s. 20151553-20151553. ISSN 0962-8452. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1553>. [cit. 2024-04-21].

HADLEY, Gilbert. Uptake of [¹⁴C] glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorm. *The New Phytologist*. Online. 1984, roč. 96, s. 263-273. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1984.tb03563.x>. [cit. 2024-05-13].

HADLEY, Gilbert a WILLIAMSON, Brendan. Analysis of the Post-Infection Growth Stimulus in Orchid Mycorrhiza. *The New Phytologist*. Online. 1971, roč. 70, č. 3, s. 445-455. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1971.tb02546.x>. [cit. 2024-05-27].

HADLEY, Gilbert a PURVES, Stephen. Movement of carbon from host to fungus in orchid mycorrhiza. *The New Phytologist*. Online. 1974, roč. 73, č. 3, s. 475-482. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1974.tb02126.x>. [cit. 2024-05-22].

HARRISON, Maria J. a BUUREN, Marianne L. van. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature (London)*. Online. 1995, roč. 378, č. 6557, s. 626-629. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/378626a0>. [cit. 2024-05-22].

HARRISON, Anthony F.; SCHULZE, Ernst-Detlef.; GEBAUER, Gerhard a BRUCKNER, Gerhard. Canopy uptake and utilization of atmospheric pollutant nitrogen. In: Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems. Online. Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*, 2000, s. 171-188. ISBN 9783540672395. ISSN 0070-8356. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-57219-7_8. [cit. 2024-07-14].

HARVAIS, Gerhard a HADLEY, Gilbert. The development of orchis *Purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *The New Phytologist*. Online. 1967, roč. 66, č. 2, s. 217-230. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1967.tb06000.x>. [cit. 2024-05-13].

HE, Xinhua; DUAN, Yinghua; CHEN, Yinglong a XU, Minggang. A 60-year journey of mycorrhizal research in China: Past, present and future directions. *Science China. Life sciences*. Online. 2010, roč. 53, č. 12, s. 1374-1398. ISSN 1674-7305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11427-010-4096-z>. [cit. 2024-05-08].

HEIJDEN, Marcel G. A Van der; MARTIN, Francis M; SELOSSE, Marc-André a SANDERS, Ian R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *The New Phytologist*. Online. 2015, roč. 205, č. 4, s. 1406-1423. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.13288>. [cit. 2024-05-10].

HO, Kwok-ki; YEOH, Hock-Hin a HEW, Choy-Sin. The presence of photosynthetic machinery in aerial roots of leafy orchids. *Plant & Cell Physiology*. Online. 1983, roč. 24. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076648>. [cit. 2024-05-21].

HOSSAIN, Mohammad Musharof. Orchid mycorrhiza: Isolation, culture, characterization and application. *South African journal of botany*. Online. 2022, roč. 151, s. 365-384. ISSN 0254-6299. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.003>. [cit. 2024-05-03].

HYNSON, Nicole A.; MADSEN, Thomas P.; SELOSSE, Marc-André; ADAM, Iris K.U.; OGURA-TSUJITA, Yuki; ROY, Melanie a GEBAUER, Gerhard. The Physiological Ecology of Mycoheterotrophy. In: Mycoheterotrophy. Online. New York, NY: *Springer New York*, 2013, s. 297-342. ISBN 9781461452089. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5209-6_8. [cit. 2024-05-11].

JAROSCH, Klaus A.; KANDELER, Ellen; FROSSARD, Emmanuel a BÜNEMANN, Else K. Is the enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus compounds limited by enzyme or substrate availability? *Soil biology & biochemistry*. Online. 2019, roč. 139, s. 107628. ISSN 0038-0717. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107628>. [cit. 2024-07-14].

JIANG, Yan; HU, Xiaodi; YUAN, Yuan; GUO, Xuelian; CHASE, Mark W.; GE, Song; LI, Jianwu; FU, Jinlong; HAO, Meng; WANG, Yiming; JIAO, Yuannian; JIANG, Wenkai a JIN, Xiaohua. The *Gastrodia menghaiensis* (Orchidaceae) genome provides new insights of orchid mycorrhizal interactions. *BMC plant biology*. Online. 2022, roč. 22, č. 1, s. 179-179. ISSN 1471-2229. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03573-1>. [cit. 2024-05-28].

JOHNSON, Timothy R a KANE, Michael E. Differential germination and developmental responses of *Bletia purpurea* (orchidaceae) to mannitol and sorbitol in the presence of sucrose and fructose. *Journal of plant nutrition*. Online. 2013, roč. 36, č. 5, s. 702-716. ISSN 1532-4087. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.748798>. [cit. 2024-06-30].

JORGE, João A; POLIZELI, Maria de Lourdes T.M; THEVELEIN, Johan M a TERENCEI, Héctor F. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiology Letters*. Online. 1997, roč. 154, č. 2, s. 165-171. ISSN 0378-1097. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00332-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00332-7). [cit. 2024-05-13].

KAUR Saranjeet a BHUTANI, Kamlesh K. Organic growth supplement stimulants for in vitro multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Horticultural science* (Praha). Online. 2012, roč. 39, č. 1, s. 47-52. ISSN 0862-867X. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/52/2011-HORTSCI>. [cit. 2024-07-21].

KOHLMEIER, Martin. Amino acids and nitrogen compounds. In: Nutrient Metabolism. Second Edition. *Elsevier*. Online. 2015, s. 265-477. ISBN 0123877849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387784-0.00008-0>. [cit. 2024-07-31].

KUGA, Yukari; SAKAMOTO, Naoya a YURIMOTO, Hisayoshi. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *The New Phytologist*. Online. 2014, roč. 202, č. 2, s. 594-605. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.12700>. [cit. 2024-05-30].

LALLEMAND, Félix; FIGURA, Tomáš; DAMESIN, Claire; FRESNEAU, Chantal; GRIVEAU, Chantal; FONTAINE, Ninon; ZELLER, Bernd a SELOSSE, Marc-André. Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs. *The New Phytologist*. Online. 2019, roč. 221, č. 1, s. 12-17. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.15443>. [cit. 2024-05-10].

LEAKE, Jonathan R. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *The New Phytologist*. Online. 1994, roč. 127, č. 2, s. 171-216. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04272.x>. [cit. 2024-04-17].

LEAKE, Jonathan R. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. *Mycologist*. Online. 2005, roč. 19, č. 3, s. 113-122. ISSN 0269-915X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(05\)00304-6](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(05)00304-6). [cit. 2024-05-10].

LEWIS, David H. a HARLEY, John L. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. III. Movement of Sugars Between Host and Fungus. *The New Phytologist*. Online. 1965, roč. 64, č. 2, s. 256-269. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1965.tb05395.x>. [cit. 2024-05-13].

LUNN, John E.; DELORGE, Ines; FIGUEROA, Carlos M.; VAN DIJCK, Patrick a STITT, Mark. Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*. Online. 2014, roč. 79, č. 4, s. 544-567. ISSN 0960-7412. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/tpj.12509>. [cit. 2024-05-13].

MANNING, John C. a STADEN, Jan Van. The Development and Mobilisation of Seed Reserves in Some African Orchids. *Australian journal of botany*. Online. 1987, roč. 35, č. 3, s. 343-353. ISSN 0067-1924. Dostupné z: <https://doi.org/10.1071/BT9870343>. [cit. 2024-07-14].

MARTIN, Francis a BOTTON, Bruce. Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. *Adv. Plant Pathol.* 1993, roč. 9, s. 83-102. [cit. 2024-07-14].

MAYOR, Jordan R; SCHUUR, Edward A.G a HENKEL, Terry W. Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes. *Ecology Letters*. Online. 2009, roč. 12, č. 2, s. 171-

183. ISSN 1461-023X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01265.x>. [cit. 2024-05-11].

MOHAMMADIPOUR, Nikta a SOURI, Mohammad K. Beneficial effects of glycine on growth and leaf nutrient concentrations of coriander (*Coriandrum sativum*) plants. *Journal of plant nutrition*. Online. 2019, roč. 42, č. 14, s. 1637-1644. ISSN 0190-4167. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1628985>. [cit. 2024-07-10].

“Mycotrophic.” Merriam-Webster.com Dictionary, Merriam-Webster. Online. Dostupné z: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/mycotrophic>. [cit. 2024-05-20].

NÄSHOLM, Torgny; HUSS-DANELL, Kerstin a HOGBERG, Peter. Uptake of organic nitrogen in the field by four agriculturally important plant species. *Ecology*. Online. 2000, roč. 81, č. 4, s. 1155-1161. ISSN 0012-9658. Dostupné z: [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[1155:UOONIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[1155:UOONIT]2.0.CO;2). [cit. 2024-07-09].

NÄSHOLM, Torgny; KIELLAND, Knut a GANETEG, Ulrika. Uptake of organic nitrogen by plants. *The New Phytologist*. Online. 2009, roč. 182, č. 1, s. 31-48. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x>. [cit. 2024-07-31].

NOVOTNÁ, Alžběta; MENNICKEN, Sophie; DE PAULA, Caio C.Pires; VOGT-SCHILB, Hélène; KOTILÍNEK, Milan; TĚŠITELOVÁ, Tamara; ŠMILAUER, Petr a JERSÁKOVÁ, Jana. variability in nutrient use by orchid mycorrhizal fungi in two medium types. *Journal of fungi (Basel)*. Online. 2023, roč. 9, č. 1, s. 88. ISSN 2309-608X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jof9010088>. [cit. 2024-06-02].

PARTHASARATHY Anuthaman; SAVKA, Francisco C; HUDSON, André O. The gene annotated by the locus tag At3g08860 encodes a β -alanine/L-alanine aminotransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Direct*. Online. 2019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/576041>. [cit. 2024-07-31].

PERSSON, Jörgen a NÄSHOLM, Torgny. Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants. *Ecology Letters*. Online. 2001, roč. 4, č. 5, s. 434-438. ISSN 1461-023X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00260.x>. [cit. 2024-05-27].

PETERSON, Larry R. a CURRAH, Randy S. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. *Canadian Journal of Botany*. Online. 1990, roč. 68, č. 5, s. 1117–1125. ISSN 0008-4026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1139/b90-141>. [cit. 2024-05-07].

PETERSON, Larry R. a FARQUHAR, Melissa L. Mycorrhizas: integrated development between roots and fungi. *Mycologia*. Online. 1994, roč. 86, č. 3, s. 311-326. ISSN 0027-5514. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026415>. [cit. 2024-05-07].

PONERT, Jan. Rané fáze vývoje semenáček terestrických orchidejí: vliv sacharidů a fytohormonů. Rigorózní práce. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin, 2010.

PONERT, Jan; VOSOLSOBĚ, Stanislav; KMECOVÁ, Kateřina a LIPAJSKÁ, Helena. European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences*. Online. 2011, roč. 1, č. 2, s. 95-107. ISSN 1805-0174. Dostupné z: <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.52>. [cit. 2024-07-03].

PONERT, Jan a LIPAJSKÁ, Helena. Utilization of exogenous saccharides by protocorms of two terrestrial orchids. *Plant, soil and environment*. Online. 2017, roč. 63, č. 4, s. 152-158. ISSN 1214-1178. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/71/2017-PSE>. [cit. 2024-05-14].

PONERT, Jan; ŠOCH, Jan; VOSOLSOBĚ, Stanislav; ČIHÁKOVÁ, Klára a LIPAJSKÁ, Helena. Integrative study supports the role of trehalose in carbon transfer from fungi to mycotrophic orchid. *Frontiers in plant science*. Online. 2021, roč. 12, s. 793876-793876. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.793876>. [cit. 2024-02-27].

PURVES, Stephen a HADLEY, Gilbert. The physiology of symbiosis in *Goodyera repens*. *New Phytologist*. Online. 1976, roč. 77, č. 3, s. 689-696. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1976.tb04662.x>. [cit. 2024-02-27].

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Online. R Foundation for Statistical Computing. 2022. [cit. 2024-07-18].

RASMUSSEN, Hanne N. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro. *The New Phytologist*. Online. 1990, roč. 116, č. 1, s. 137-147. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00519.x>. [cit. 2024-02-27].

RASMUSSEN, Hanne N. a WHIGHAM, Dennis F. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American journal of botany*. Online. 1993, roč. 80, č. 12, s. 1374. ISSN 0002-9122. Dostupné z: <https://doi.org/10.2307/2445665>. [cit. 2024-04-17].

RASMUSSEN, Hanne N. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1995. ISBN 0-521-04881-8. [cit. 2024-07-14].

RASMUSSEN, Hanne N. a WHIGHAM, Dennis F. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *The New Phytologist*. Online. 2002, roč. 154, č. 3, s. 797-807. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00422.x>. [cit. 2024-05-10].

SATHIYADASH, Kullaiyan; MUTHUKUMAR, Thangavelu; UMA, Eswaranpillai a PANDEY, Radha R. Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions*. Online. 2012, roč. 7, č. 3, s. 238–247. ISSN 1742-9145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.699105>. [cit. 2024-07-18].

SELOSSE, Marc-André a MARTOS, Florent. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in plant science*. Online. 2014, roč. 19, č. 11, s. 683-685. ISSN 1360-1385. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.005>. [cit. 2024-05-10].

SELOSSE, Marc-André; MINASIEWICZ, Julita a BOULLARD, Bernard. An annotated translation of Noël Bernard's 1899 article 'On the germination of *Neottia nidus-avis*. *Mycorrhiza*. Online. 2017, roč. 27, č. 6, s. 611-618. ISSN 0940-6360. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0774-z>. [cit. 2024-04-22].

SEMIARTI, Endang; SETIARI, Nintya; ASTUTININGRUM, Wahyu D.; NURLIANA, Steffanie a MOSE, Windi. The effect of peptone on embryo development of orchid during in vitro culture. In: Proceeding of the 1st international conference on tropical agriculture. Online. Cham: *Springer International Publishing*, 2017, s. 85-93. ISBN 3319603620. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-60363-6_8. [cit. 2024-07-22].

SENTHILKUMAR, Shanmugam; BRITTO, John S.; KRISHNAMURTHY, Kulithalai V. a HARIHARAN Chandrasekar. Biochemical analysis of mycorrhizal roots of *Aerides maculosum*. *Phytomorphology*. Online. 2000, roč. 50, s. 273–279. Dostupné z: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20013010937>. [cit. 2024-08-01].

SILVERA, Katia; SANTIAGO, Louis S.; CUSHMAN, John C. a WINTER, Klaus. Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant physiology (Bethesda)*. Online. 2009, roč. 149, č. 4, s. 1838-1847. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <https://doi.org/10.1104/pp.108.132555>. [cit. 2024-05-21].

SINHA, Pinaki a ROY, Shyamal K. Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (roxb.) Lindl. through in vitro culture. *Agricultural and Food Sciences, Environmental Science*. Online. 2004. Dostupné z: https://baptcb.org/public/article/ptc14_1_07.pdf. [cit. 2024-07-21].

SMITH, Sally E. a READ, David J. Mycorrhizal Symbiosis. Online. 3. vyd. Amsterdam: Elsevier/Acad. Press, 2008. ISBN 978-0-12-370526-6. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=230784&site=ehost-live>. [cit. 2024-07-14].

SMITH, Sarah E. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *The New Phytologist*. Online. 1966, roč. 65, č. 4, s. 488-499. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1966.tb05972.x>. [cit. 2024-05-13].

SMITH, Sarah E. Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*. Online. 1967, roč. 66, č. 3, s. 371-378. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1967.tb06016.x>. [cit. 2024-05-13].

SOURI, Mohammad K. Aminochelate fertilizers: the new approach to the old problem; a review. *Open agriculture*. Online. 2016, roč. 1, č. 1, s. 118-123. ISSN 2391-9531. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/opag-2016-0016>. [cit. 2024-07-10].

SOWMYA, Rayagopal S.; WARKE, Vishal G.; MAHAJAN, Girish B. a ANNAPURE, Uday S. Effect of amino acids on growth, elemental content, functional groups, and essential oils composition on hydroponically cultivated coriander under different conditions. *Industrial crops and products*. Online. 2023, roč. 197, s. 116577. ISSN 0926-6690. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116577>. [cit. 2024-07-13].

SPOERL, Edward. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *American journal of botany*. Online. 1948, roč. 35, č. 2, s. 88-95. ISSN 0002-9122. Dostupné z: <https://doi.org/10.2307/2437891>. [cit. 2024-07-22].

STÖCKEL, Marcus; TĚŠITELOVÁ, Tamara; JERSÁKOVÁ, Jana; BIDARTONDO, Martin I a GEBAUER, Gerhard. Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *The New Phytologist*. Online. 2014, roč. 202, č. 2, s. 606-615. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.12688>. [cit. 2024-07-13].

SUETSUGU, Kenji; YAMATO, Masahide; MIURA, Chihiro; YAMAGUCHI, Katsushi; TAKAHASHI, Kazuya; IDA, Yoshiko; SHIGENOBU, Shuji a KAMINAKA, Hironori. Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. *Molecular ecology*. Online. 2017, roč. 26, č. 6, s. 1652-1669. ISSN 0962-1083. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/mec.14021>. [cit. 2024-07-13].

SWARTS, Nigel D. a DIXON, Kingsley W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*. Online. 2009, roč. 104, č. 3, s. 543–556. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/aob/mcp025>. [cit. 2024-05-03].

TALAAT, Iman M.; KHATTAB, Hemmat I. a AHMED, Aisha M. Changes in growth, hormones levels and essential oil content of *Ammi visnaga* L. plants treated with some bioregulators. *Saudi journal of biological sciences*. Online. 2014, roč. 21, č. 4, s. 355-365. ISSN 1319-562X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.10.008>. [cit. 2024-07-13].

TANDON, Puja; JIN, Qiang; HUANG, Limin; SONG, Rui; SHAN, Aidang. Effects of tryptophan along with sodium pyruvate and sodium thiosulfate on *Chlorella vulgaris* growth. *Waste and Biomass Valorization*. Online. 2020, roč. 11, s. 967–982. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12649-018-00577-7>. [cit.2024-07-22].

TATRY, Marie-Violaine; EL KASSIS, Elie; LAMBILLIOTTE, Raphaël; CORRATGÉ, Claire; VAN AARLE, Ingrid; AMENC, Laurie K.; ALARY, Rémi; ZIMMERMANN, Sabine; SENTENAC, Hervé a PLASSARD, Claude. Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster* *The Plant journal: for cell and molecular biology*. Online. 2009, roč. 57, č. 6, s. 1092-1102. ISSN 0960-7412. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03749.x>. [cit. 2024-07-14].

TAYLOR, Alan F.S.; GEBAUER, Gerhard a READ, David J. Uptake of nitrogen and carbon from double-labelled (¹⁵N and ¹³C) glycine by mycorrhizal pine seedlings. *The New Phytologist*. Online. 2004, roč. 164, č. 2, s. 383-388. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01164.x>. [cit. 2024-07-13].

TEDERSOO, Leho; BAHRAM, Mohammad a ZOBEL, Martin. How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*. Online. 2020, roč. 367, č. 6480, s. 867-874. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.aba1223>. [cit. 2024-04-21].

UETAKE, Yukari; FARQUHAR, Melissa L. a PETERSON, Larry R. Changes in microtubule arrays in symbiotic orchid protocorms during fungal colonization and senescence. *The New Phytologist*. Online. 1997, roč. 135, č. 4, s. 701–709. ISSN 1469-8137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00686.x>. [cit. 2024-07-14].

WALKER, Mark C. a DONK, Wilfred A. Van Der. Many roles of glutamate in metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Online. 2016, roč. 43, č. 2-3, s. 419-430. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1665-y>. [cit. 2024-07-22].

WALLER, Lauren P.; FELTEN, Judith; HIIESALU, Inga a VOGT-SCHILB, Hélène. Sharing resources for mutual benefit: crosstalk between disciplines deepens the understanding of

mycorrhizal symbioses across scales. *The New Phytologist*. Online. 2018, roč. 217, č. 1, s. 29-32. ISSN 0028-646X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nph.14912>. [cit. 2024-05-14].

WEZEL, Gilles P. van; KRABBEN, Preben; TRAAG, Bjørn A.; KEIJSER, Bart J.F.; KERSTE, Rob; VIJGENBOOM, Erik; HEIJNEN, Josef J. a KRAAL, Barend. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and Environmental Microbiology*. Online. 2006, roč. 72, č. 8, s. 5283-5288. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.00808-06>. [cit. 2024-07-22].

WINTER, Karl; WALLACE, Brendan J; STOCKER, Gerald C. a ROKSANDIC, Zlatko. Crassulacean acid metabolism in Australian vascular epiphytes and some related species. *Oecologia*. Online. 1983, roč. 57, č. 1/2, s. 129-141. ISSN 0029-8549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/bf00379570>. [cit. 2024-05-21].

YEH, Chuan M.; CHUNG, Kwi M.; LIANG, Chieh K. a TSAI, Wen C. New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Applied sciences*. Online. 2019, roč. 9, č. 3, s. 585. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app9030585>. [cit. 2024-05-08].

YEUNG, Edward C. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*. Online. 2017, roč. 58, č. 1, s. 33-33. ISSN 1817-406X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>. [cit. 2024-04-20].

ZELMER, Carla D., CUTHBERTSON, Lisa a CURRAH, Randy S. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*. Online. 1996, roč. 37, s.439–448. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02461001>. [cit. 2024-07-14].

ZHAO, Da-Ke; SELOSSE, Marc-André; WU, Limin; LUO, Yan; SHAO, Shi-Cheng a RUAN, Yong-Ling. Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi derived from protocorms or seedlings. *Frontiers in plant science*. Online. 2021, roč. 12. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701152>. [cit. 2024-05-10].

ZHAO, Da-ke; MOU, Zong-Min a RUAN, Yong-Ling. Orchids acquire fungal carbon for seed germination: pathways and players. *Trends in plant science*. Online. 2024, roč. 29, č. 7, s.

733-741. ISSN 1360-1385. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.02.001>. [cit. 2024-07-22].

ZOTZ, Gerhard. The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update: vascular epiphytes. *Botanical journal of the Linnean Society*. Online. 2013, roč. 171, č. 3, s. 453-481. ISSN 0024-4074. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/boj.12010>. [cit. 2024-05-21].

ZOTZ, Gerhard a WINKLER, Uwe. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*. Online. 2013, roč. 171, č. 3, s. 733-741. ISSN 0029-8549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2575-6>. [cit. 2024-05-21].