

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce
**Ekologie populací jednoletého poloparazitického
druhu *Melampyrum pratense***

Monika Průšová

Školitel: Ing. Milan Štech, PhD.
Konzultant: RNDr. Jakub Těšitel

České Budějovice
2010

Diplomová práce v nezkrácené podobě.

Průšová M. (2010): Ekologie populací jednoletého poloparazitického druhu *Melampyrum pratense*. – [Population ecology of annual hemiparasitic species *Melampyrum pratense*, Mgr thesis, in Czech]. p. 47. – Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The thesis deals with the hemiparasitic species *Melampyrum pratense*. This species was monitored during the growing season 2009 and the relationship between morphological characteristics and reproductive success of plant individuals was assessed. The relationships between population density, the vegetative biomass and the investments in generative reproduction were investigated. Identity of the host species was determined using the *DNA barcoding* method.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách

V Českých Budějovicích 30. 4. 2010

.....
Monika Průšová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému konzultantu Jakobovi Těšitelovi za vedení při této práci, velkou pomoc nejen se statistikou, za ohromný optimizmus a trpělivost. Moc děkuji také svému školiteli Milanovi Štechovi za cenné rady a připomínky, Šárce Svobodové děkuji za zasvěcování do tajů molekulární biologie a velkou pomoc v laboratoři a Janu Š. Lepšovi za cenné rady a připomínky ke statistickému zpracování dat. Také děkuji všem dalším lidem, kteří mi jakkoliv pomohli. V neposlední řadě děkuji svému manželovi Davidovi a mým holčičkám Denisce a Terezce za to, že mě doprovázeli a dělali příjemnou společnost při všech, někdy nekonečných odběrech a počítání listů a strašně moc mě podporovali po všech stránkách po celou dobu studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Metodika.....	6
2.1	Charakteristika pokusných ploch	6
2.1.1	Experiment 1 – pokusná plocha Mokrý a Třebín	8
2.1.2	Experiment 2 – pokusná plocha Mokrý.....	9
2.2	Zjišťování identity hostitele	10
2.2.1	Izolace DNA.....	10
2.2.2	PCR, purifikace a příprava sekvenční směsi	11
2.2.3	Příprava vzorků pro SEM.....	12
2.3	Statistické zpracování dat.....	12
3	Výsledky.....	14
3.1	Experiment 1 – pokusná plocha Mokrý a Třebín	14
3.1.1	Odhad produkce vegetativní biomasy pomocí kalibračního datasetu	14
3.1.2	Průběh růstu rostlin	16
3.1.3	Investice do reprodukce	22
3.1.4	Závislosti ovlivňující investici rostlin do reprodukce	24
3.2	Experiment 2	26
3.2.1	Počet rostlin ve čtverci v průběhu vegetační sezóny.....	26
3.2.2	Produkce biomasy a morfologické charakteristiky	27
3.2.3	Vztahy mezi hmotností sušiny vegetativní a reprodukční biomasy	29
3.3	Zjišťování identity hostitele	33
4	Diskuze.....	35
4.1	Přežívání a vývoj jedinců druhu <i>Melampyrum pratense</i> v průběhu vegetační sezóny	35
4.2	Souvislost mezi morfologickými charakteristikami, produkcí biomasy a investicemi do generativní reprodukce	36
4.3	Vliv hustoty populace na přežívání, množství vyprodukované biomasy a investice do generativní reprodukce	37
4.4	Vnější faktory ovlivňující studovanou populaci	38
4.5	Identita hostitelských druhů	39
5	Závěr.....	40
6	Literatura	41
7	Fotografická příloha	44

1 ÚVOD

Melampyrum pratense (černýš luční) patří mezi poloparazitické rostliny z čeledi *Orobanchaceae* (zárázovité). V minulosti byl řazen do čeledi *Scrophulariaceae* (Wolfe et al. 2005, Benett & Matthews 2006).

Celý rod *Melampyrum* zahrnuje kořenové poloparazity, proto podobně jako řada jiných příbuzných taxonů (např. *Rhinanthus*, *Euphrasia*, *Odontites*, *Pedicularis*) vytváří na svých kořenech speciální útvary tzv. haustoria. Haustorii se rostliny napojují na xylém kořene hostitele (dřevní část cévního svazku) a touto cestou se zásobují dostatečným množstvím pro život potřebných minerálních látek a vody (Slavíková 1986, Dalrymple 2007, Irving & Cameron 2009). U řady poloparazitických druhů rostlin však byl také zjištěn přenos organických látek pocházejících od hostitele. (Govier et al. 1967, Press et al 1987, Irving & Cameron 2009, Těšitel et al. 2010). Tyto rostliny jsou však kromě zmíněného parazitizmu také zelené, tudíž mají zachovanou schopnost vlastní asimilace díky své fotosyntetické aktivitě. Listy jsou pro poloparazitické rostliny důležité nejen kvůli fotosyntéze, ale i kvůli transpiraci, která v mnoha případech umožňuje získávání živin od hostitele (Press 1989). Případná defoliace snižuje u poloparazitických rostlin reprodukci a růst (Lehtilä & Syrjänen 1995). Poloparazitické rostliny jsou víceméně závislé na připojení k hostiteli, a připojením na vhodného hostitele rapidně zrychlí svůj růst, jsou vitálnější, větší, s větším počtem listů a začínají i dříve kvést. Naopak rostliny, u kterých k úspěšnému připojení nedošlo, zůstávají menší, vytvářejí málo listů a většinou se nevětví. Často nemají žádné květy a tudíž ani plody (Cantlon et al. 1963, Svensson et al. 2001). Některé poloparazitické druhy, tzv. fakultativní poloparaziti, mezi něž patří i druhy rodu *Melampyrum*, jsou teoreticky schopné svůj životní cyklus ukončit i bez hostitele, avšak jejich vitalita je vždy snižena a generativní reprodukce velmi omezená (Atsatt & Strong 1970, Irving & Cameron 2009).

Soužití poloparazitické rostliny a hostitele je komplikované. Jedná se o kombinaci parazitismu a kompetice o světlo, kdy efekt hostitele na poloparazita nemusí být vždy pouze pozitivní (Atsatt & Strong 1970, Matthies 1995). Parazitické a kompetiční interakce mezi poloparazitem, hostitelem a okolní vegetací mohou nabývat různých intenzit v závislosti na druhové kombinaci hostitel-poloparazit (Cameron et al. 2006, Rümer et al. 2007), podmínkách prostředí (např. množství dostupných živin, Davies & Graves 2000, Cameron et al. 2009), ontogenetickém stadiu rostlin (semenáče vs. dospělé rostliny, Těšitel et al. 2010). Výsledkem těchto interakcí mohou být různé scénáře populační dynamiky poloparazitických rostlin od dominance poloparazita ve společenstvu, po jeho kompetiční vyloučení (Cameron

et al. 2009). S intenzitou kompetice souvisí i populační hustota hostitelského druhu. Vysoké populační hustoty hostitele dosahované obvykle na úživných stanovištích můžou například zapříčinit vyšší mortalitu semenáčků, na druhou stranu zbylé rostliny, které úspěšně přejdou do další fáze životního cyklu, mohou dosáhnout vyššího reprodukčního úspěchu (van Hulst et al. 1987, Mudrák & Lepš 2010).

Předpokládá se, že *Melampyrum pratense* parazituje širokou škálu bylin, dřevin a keřů, které se vyskytují na stanovišti společně s ním, jako jsou například zástupci rodů *Quercus*, *Betula*, *Corylus*, *Pinus*, *Vaccinium*, *Erica* atd. (Smith 1963, Hartl in Hegi 1974, Štech 2000). V terénu je však velice obtížné přesně určit skutečného hostitele. K tomu je nutná preparace kořenového systému za účelem nalezení napojených haustorií na kořen hostitele a následně se po kořenu dopátrat až k parazitovanému druhu. Přes značnou pracnost a komplikovanost této metody se takto podařilo identifikovat hostitele např. *Rhinanthus minor* (Gibson & Watkinson 1989). Tato studie však byla založena na odběru kořenového balu a následné preparaci *ex situ*, V případě *M. pratense* je tento metodický přístup prakticky neproveditelný vzhledem k tomu, že nejčastěji předpokládanými hostitelskými druhy jsou poměrně velké dřeviny (Smith 1963, Hartl in Hegi 1974, Štech 2000). Vyřešit tento problém by tak mohla metoda *DNA barcoding* (Jackson et al. 1999, Kress et al. 2005, Taberlet et al. 2007, Valentini et al. 2008), tj. identifikace hostitelů pomocí sekvenování DNA kořenů, na něž jsou haustoria napojena, čímž odpadne nutnost sledování hostitelského kořene k nadzemní části rostliny. Využití tohoto přístupu pro identifikaci hostitelů parazitických rostlin však zatím nebylo otestováno v praxi.

Melampyrum pratense se přirozeně vyskytuje v poměrně rozsáhlém areálu. Oblast jeho rozšíření se rozprostírá v Evropě kromě její nejjihnější části, v Asii, kde roste hlavně v západní a na střední Sibiři, k východu zasahuje až na Altaj a do oblasti Angary (Meusel et al. 1978). V České republice ho najdeme od planárního až do subalpínského stupně. Roste hojně až velmi hojně v oreofytiku a mezofytiku, v teplejších oblastech je spíše vzácnější (Štech 2000). Biotopy, na kterých se tento druh přirozeně vyskytuje, jsou i jinak velmi různorodé. Můžeme se s ním setkat na suchých i zamokřených stanovištích. Roste v lesích listnatých, jehličnatých i smíšených. Najdeme ho na pasekách, v lemech lesních cest, na ladech, okrajích luk v nižších polohách i na horských až subalpínských loukách. Nevyhýbá se ani vřesovištím a rašeliništím. Upřednostňuje kyselá stanoviště, ale vzácněji ho můžeme najít i na vápencových substrátech (Smith 1963, Eliáš 1986, Štech 2000).

Ekologická valence *M. pratense* je tedy velmi široká, a srovnatelná jen s nemnohými střeoevropskými neruderálními druhy rostlin.

Podobně jako mnoho jiných poloparazitů je *Melampyrum pratense* striktně jednoletá rostlina, která se nikdy nerozmnožuje vegetativně (Klimeš & Klimešová CLOPLA), tudíž je úplně závislá na reprodukci semen. V kombinaci s absencí dlouhověké semenné banky (sec. Heinken 2004) a architekturou rostliny, která znemožňuje regeneraci po jakémkoliv poškození pod úrovní poměrně vysoko položených děložních listů, se jedná o vcelku výjimečnou strategii mezi krytosemennými rostlinami. Populační dynamika *M. pratense* tak závisí čistě na reprodukční úspěšnosti rostlin měřené produkcí semen. Ta jsou produkována v tobolkách, které jsou uspořádány v úzkém jednostranném hroznu, který je dole řidší a směrem nahoru hustší. Toto plodenství vzniká z polytelického typu květenství, které se vyznačuje tím, že na hlavním stonku i na bočních větvích není ukončený terminálním květem (Slavíková 2002). Květy rozkvétají odspodu a stejně postupuje i dozrávání semen. Doba kvetení je červen až září (Štech 2000). Ačkoliv je tento údaj vztažený primárně k populacím, či souboru populací z ČR, může platit v některých případech i pro délku reprodukční sezóny jednotlivých rostlin. Vzhledem ke své hmotnosti, vypadávají semena ze zralých tobolek pouze do blízkosti mateřské rostliny a na větší vzdálenosti je rozšiřují mravenci (Heinken 2004). V jedné tobolce se nachází 1 až 4 semena.

Melampyrum pratense je morfologicky velmi variabilní druh (Smith 1963, Štech 1996, Štech 2000). Významnou součástí morfologické variability je tzv. sezónní variabilita, která je typickým jevem i u dalších poloparazitických zástupců čeledi *Orobanchaceae* (např. *Euphrasia*, *Rhinanthus*, *Odontites*) (Sterneck 1901, Karlsson 1974, Zopfi 1995, 1998). Principem sezónní variability je genetická determinace architektury prýtu, což má významný vliv na vzhled rostlin, dobu kvetení a tedy i na časový průběh generativní reprodukce. Přímo geneticky je pravděpodobně determinováno pořadí nodu, který může potenciálně nést první, tj. nejspodnější květ na hlavním stonku (Těšitel & Štech 2007). Jako důležité sezónní charakteristiky, kterými se takovéto rostliny liší a které jsou určovány právě pozicí nejspodnějšího květu, se uvádějí doba květu, počty vegetativních (internodia mezi děložními listy a nejvyšším párem větví) i interkalárních internodií (internodia mezi nejvyšším párem větví a nejspodnějšími květy), počet párů větví, počet párů kvetoucích větví a rozměry listů. S dobou květu souvisí částečně i přítomnost děloh v době kvetení. Tyto charakteristiky se u různých populací stejného druhu mohou velmi lišit. Můžeme proto rozlišit časné (aestivální) typy, pro které je typický nižší počet internodií a málo větví a pozdní (autumnální) typy, které jsou naopak bohatě rozvětvené a mají vyšší počty internodií (Štech 1996, Štech 1998, Štech 2000, Těšitel 2005).

Klíčový vliv na hodnoty sezónních znaků a tedy na architekturu celé rostliny má délka vegetační sezóny, která je v našich podmínkách určována především nadmořskou výškou a limituje maximální počet lodyžních článků a s ním spojený pozdní počátek kvetení (Štech 1998, Těšitel 2005). Architektura rostlin *M. pratense* je však do určité míry ovlivňována i dalšími vlastnostmi stanoviště, jako jsou např. typ substrátu, světelné podmínky, hostitelské rostliny, ale také okolní vegetace (Štech 1996). Výraznou odlišností celkového charakteru sezónní variability druhu *Melampyrum pratense* je její kompletně retikulární charakter. Na rozdíl od řady dalších poloparazitických druhů (např. *Rhinanthus glacialis*, *Melampyrum nemorosum*, *Euphrasia rostkoviana*) nejsou sezónní typy u druhu *M. pratense* příliš vyhraněné a vzájemně oddělené. Souvisí to zřejmě s biotopy, na kterých druh roste, a absencí následných selekčních tlaků typu managementu lučních porostů, které by původní diferenciaci v sezónních znacích zvýraznily a oddělily (Zopfi 1995, 1998, Štech 1998).

Vztahy mezi morfologií vegetativních částí rostlin *Melampyrum pratense* a investicemi do generativní reprodukce, které lze považovat za měřítko reprodukční úspěšnosti, představují klíčové informace pro poznání biologie druhu. Existuje řada prací na druzích rodu *Melampyrum*, které se zabývají vztahy morfologie rostlin, fenologie a podmínek prostředí. Tyto závislosti jsou často interpretovány hypotézami zahrnující reprodukční úspěšnost rostlin. Zásadní bod takových interpretací, kterým je právě pojitko mezi vegetativní morfologií a reprodukční úspěšností, však dosud takřka nebyl studován. Většina studií se navíc zabývá rozdíly mezi populacemi, vnitropopulační variabilita v morfologii a reprodukční úspěšnosti rostlin je zanedbávána. Není tak vůbec jasné, čím jsou způsobeny rozdíly ve velikostech rostlin pozorované v rámci populace (Štech 1998), zda se například uplatňují podobné faktory, jako jsou ty ovlivňující mezipopulační variabilitu, a jaký mají vliv na celkovou reprodukční úspěšnost. Provádění reprodukčně-ekologických srovnávacích studií komplikuje mj. i délka reprodukční sezóny, kontinuální charakter kvetení a produkce semen, což znemožňuje vyhodnotit reprodukční úspěšnost pomocí jediného pozorování. Tato práce má za cíl vyplnit mezery v poznání vztahů mezi vegetativním růstem a reprodukční úspěšností rostlin a popsat vnitropopulační variabilitu v těchto parametrech včetně identifikace jejích příčin. Prostředkem k dosažení těchto cílů je především detailní sledování dvou populací na úrovni individuí během celé vegetační sezóny.

Cíle práce

- Zachytit a popsat přežívání a vývoj jedinců druhu *Melampyrum pratense* v průběhu vegetační sezóny a tedy celého životního cyklu.
- Popsat souvislost mezi vegetativními charakteristikami a investicemi do generativní reprodukce na úrovni jednotlivých individuí v rámci populace.
- Zjistit, jaký je vztah mezi populační hustotou sledované populace, množstvím vyprodukované biomasy a investicemi do generativní reprodukce.
- Pokusit se identifikovat nejvýznamnější vnější faktory ovlivňující studovanou populaci.
- Zjistit, zda je možné určit identitu hostitelských druhů ze vzorků kořenů a pokusit se zjistit, zda reprodukční úspěšnost závisí na druhu hostitele.

2 METODIKA

Pro sledování průběhu růstu jedinců sloužil experiment 1. Vybrala jsem si dvě populace druhu *Melampyrum pratense* na dvou poměrně blízko sebe položených lokalitách. Na těchto jedincích jsem se snažila sledovat průběh jejich růstu, a to od stádia mladých rostlin až po dospělost, která vyvrcholila produkcí semen. Hmotnost jejich biomasy vytvářené v průběhu vegetační sezóny jsem hodnotila pomocí morfologických charakteristik a hmotnosti kalibračních rostlin v jednotlivých odběrech. S růstem rostlin souvisí alokace biomasy nejdříve do vegetativních částí, posléze také do reprodukčních částí rostlin, proto jsem se sledováním těchto morfologických charakteristik také snažila zjistit jejich vzájemný vztah v rámci jednotlivých individuí.

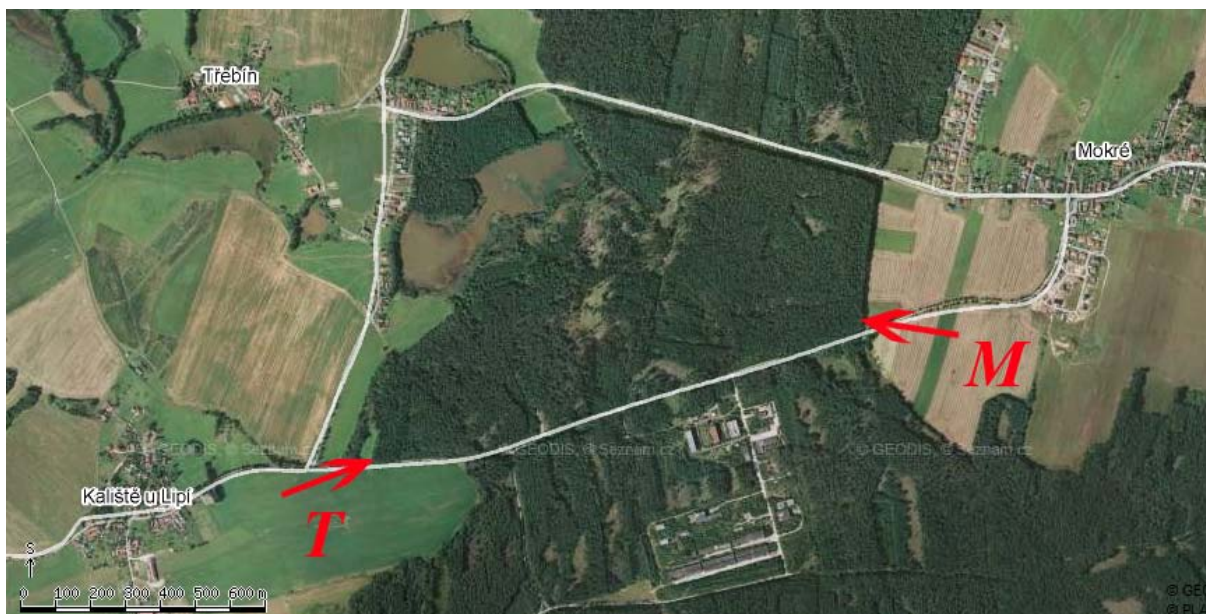
K sledování vztahů mezi rostlinami populace sloužil experiment 2, kde jsem se pomocí opakovaných odběrů snažila zjistit, jak souvisí hustota jedinců, množství vyprodukované biomasy a jejich reprodukční úspěšnost.

2.1 Charakteristika pokusných ploch

Pokusné plochy, na kterých jsem sledovala populaci druhu *Melampyrum pratense*, se nachází ZJZ od Českých Budějovic na okrajích lesa mezi obcemi Mokré a Třebín v nadmořské výšce cca 454 m n. m (obr. 2.1).

Pokusná plocha u Mokrého se nacházela na východním okraji lesa blíže k obci Mokré (GPS: 48°57'40,0" s. š., 014°24'29,1" v. d. , systém WGS 84). Druhá pokusná plocha se nacházela blíže k obci Třebín (GPS: 48°57'27,4", s. š., E 014°23'21,8" v. d., systém WGS 84). Rostlinné druhy (kromě mechového patra), které se vyskytovaly na studovaných plochách, jsou uvedeny v tabulce (tab. 1).

Průměrná teplota v této oblasti v roce 2009 (měřená na meteorologické stanici v Českých Budějovicích) byla 9,5 °C a průměrné srážky za rok 2009 byly 829,5 mm (podrobněji viz tab. 2; <http://www.chmi.cz/meteo/ok/okdat091.html>).



Obr. 2.1 Lokalizace pokusných ploch se studovanými populacemi *Melampyrum pratense*, M = Mokré (experiment 1 a 2) a T = Třebín (experiment 2) (zdroj: <http://www.mapy.cz/>)

Tab. 1 Seznam druhů vyskytujících se na sledovaných plochách společně s *Melampyrum pratense* (není zde uvedené mechové patro).

Mokré	Patro	Třebín	Patro
<i>Picea abies</i>	E 3	<i>Quercus robur</i>	E 3
<i>Pinus sylvestris</i>	E 3	<i>Pinus sylvestris</i>	E 3
<i>Quercus robur</i>	E 3	<i>Sorbus aucuparia</i>	E 2, E 1
<i>Frangula alnus</i>	E 2, E 1	<i>Acer platanoides</i>	E 1
<i>Anemone nemorosa</i>	E 1	<i>Acer pseudoplatanus</i>	E 1
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	E 1	<i>Avenella flexuosa</i>	E 1
<i>Avenella flexuosa</i>	E 1	<i>Betonica officinalis</i>	E 1
<i>Carex brizoides</i>	E 1	<i>Dactylis glomerata</i>	E 1
<i>Carex hirta</i>	E 1	<i>Festuca ovina</i>	E 1
<i>Deschampsia cespitosa</i>	E 1	<i>Fragaria vesca</i>	E 1
<i>Fragaria vesca</i>	E 1	<i>Frangula alnus</i>	E 1
<i>Hieracium murorum</i>	E 1	<i>Galium boreale</i>	E 1
<i>Holcus lanatus</i>	E 1	<i>Holcus lanatus</i>	E 1
<i>Juncus tenuis</i>	E 1	<i>Luzula pilosa</i>	E 1
<i>Luzula luzuloides</i>	E 1	<i>Poa pratensis</i>	E 1
<i>Luzula pilosa</i>	E 1	<i>Ranunculus auricomus</i>	E 1
<i>Poa anua</i>	E 1	<i>Rubus</i> sp.	E 1
<i>Poa nemoralis</i>	E 1	<i>Taraxacum</i> sect. <i>Ruderalia</i>	E 1
<i>Taraxacum</i> sect. <i>Ruderalia</i>	E 1	<i>Tilia cordata</i>	E 1
<i>Vaccinium myrtillus</i>	E 1	<i>Vaccinium myrtillus</i>	E 1
<i>Veronica chamaedrys</i>	E 1	<i>Veronica chamaedrys</i>	E 1
		<i>Viola riviniana</i>	E 1

Tab. 2 Průměrná měsíční teplota a srážky ve vegetační sezóně 2009, tučně jsou vyznačeny měsíce, kdy probíhalo odečítání experimentu.

Měsíc	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.
Průměrná teplota vzduchu (°C)	4,4	12,7	14,3	15,8	19,2	19,2	15,2
Úhrn srážek (mm)	56	24,3	111	205,8	128,2	93,2	35,4

2. 1. 1 Experiment 1 – pokusná plocha Mokré a Třebín

Na pokusné ploše Mokré a pokusné ploše Třebín (obr. 2.1) jsem si na jaře 2009 označila 50 mladých rostlin z populace studovaného druhu *Melampyrum pratense* (štítek s číslem jsem lepila na stonek pod děložní listy). Uskutečnila jsem celkem 5 návštěv v přibližně měsíčních intervalech od dubna do srpna 2009, a to: 23. dubna, 21. května, 26. června, 29. července a 29. srpna. U jednotlivých rostlin jsem při každé návštěvě zaznamenávala morfologické charakteristiky (viz níže). Tyto označené rostliny jsem nesbírala. Sebrala jsem je až při poslední návštěvě 29. srpna. V blízkosti vybraných ploch jsem náhodně sebrala při každé návštěvě 20 rostlin černýše (nadzemní části rostlin), které sloužily jako kalibrační rostliny při statistickém vyhodnocování dat.

U těchto rostlin jsem také zaznamenávala shodné morfologické charakteristiky a po usušení v sušárně (24 h při teplotě 80 °C) zvažila nadzemní biomasu, kterou jsem napřed rozdělila na biomasu z vegetativních orgánů rostliny a na biomasu z reprodukčních orgánů rostliny.

Na rostlinách jsem zaznamenávala tyto morfologické charakteristiky:

- počet vegetativních internodií (internodia mezi děložními listy a nejvyšším párem větví)
- počet interkalárních internodií (internodia mezi nejvyšším párem větví a nejspodnějšími květy)
- počet listů (i počet opadaných listů) na hlavním stonku
- počet listů na větvích
- počet větví (1. i 2. řádu) alespoň s 1 párem listů
- počet vyvinutých květů na hlavním stonku (včetně odkvetlých)
- počet vyvinutých květů na větvích (včetně odkvetlých)
- počet vyvinutých tobolek na hlavním stonku (včetně vysypaných)
- počet vyvinutých tobolek na větvích (včetně vysypaných)
- váhu sušiny z vegetativních orgánů (stonky + listy + listeny)

- váhu sušiny z reprodukčních orgánů (květy + nevysypané tobolky + prázdné vysypané tobolky + odhad váhy vysypaných semen). Váha vysypaných semen byla odhadnuta jako násobek počtu vysypaných tobolek a průměrné váhy semen na 1 tobolku. Tu jsem si stanovila tak, že jsem náhodně odebrala 50 tobolek černýše (ne ze studovaných rostlin) a všechna semena jsem zvažila. Z této váhy jsem pak spočítala průměrnou váhu semen na 1 tobolku.

Dále jsem zaznamenávala u rostlin okus zvěří a mortalitu. Za okus jsem považovala ukousnutí hlavního vegetačního vrcholu (někdy doprovázeném i okusem spolu s několika větvemi), na rostlině však musely zůstat alespoň nějaké větve. Při ztrátě všech větví a listů ať už vlivem okusu nebo odumřením v intervalu mezi odběry, jsem tuto skutečnost považovala za mortalitu. Mortalita znamenala také z jiných důvodů zjištěnou nepřítomnost označené rostliny na vybrané ploše. Usychající rostliny (hlavně při posledním odběru) jsem do analýzy zahrнула v případě, že na rostlině bylo patrné ukončení životního cyklu, tj. byly odkvetlé a měly na sobě zralé tobolky, a to vysypané či ještě nevysypané.

2. 1. 2 Experiment 2 – pokusná plocha Mokré

Na jaře 2009 jsem si na jiném místě na vybrané ploše (obr. 2.1) s výskytem studovaného druhu *M. pratense* vytyčila pomocí měřicího pásma trvalou plochu o rozměrech 8×10 m. Snažila jsem se, aby na vybrané ploše bylo bohaté zastoupení studovaného druhu. Plochu jsem si důkladně označila kovovými zátkami a hřebíky na okrajích kvůli snadnému opakovanému nalezení vytyčené plochy pro další odběry. Na počítači jsem si náhodně vygenerovala souřadnice, podle kterých jsem následně odebírala rostliny z vytyčené plochy. Ze souřadnic jsem vytvořila graf pro kontrolu, jestli se některé souřadnice nepřekrývají, abych se vyhnula opakovanému odběru ze stejné plošky. Pro každý odběr jsem měla vygenerováno i několik náhradních souřadnic pro případ, že by ve čtverci nebyly žádné rostliny. Na odběr rostlin jsem používala odběrový čtverec (dřevěný rámeček o velikosti 30×30 cm), který jsem umístila na vytyčenou plochu podle předem náhodně vygenerovaných souřadnic. Uskutečnila jsem tedy celkem 5 odběrů v přibližně měsíčních intervalech od dubna do srpna 2009, a to: 23. dubna, 21. května, 26. června, 29. července a 29. srpna. Při každém odběru jsem odebrala rostliny z 10 odběrových čtverců (v případě, že tam nic nerostlo, jsem použila náhradní souřadnice). Sbírala jsem nadzemní část všech rostlin, které jsem v odběrovém čtverci našla.

U každé odebrané rostliny jsem zaznamenala morfologické charakteristiky a rostliny jsem uschovala pro sušení a následné vážení biomasy z vegetativních orgánů i

z reprodukčních orgánů. Nadzemní biomasu jsem v sušárně sušila 24 hodin při teplotě 80 °C a následně zvažila na analytických vahách.

Na rostlinách jsem zaznamenávala stejné morfologické charakteristiky jako ve výše popsaném experimentu 1 a okus rostlin (charakterizován také v předchozím experimentu).

2.2 Zjišťování identity hostitele

Z populace druhu *M. pratense* na pokusné ploše Mokré (mimo studované plošky) bylo náhodně vybráno 10 různě velkých rostlin černýše k zjištění identity hostitele a jejich porovnání. Tyto rostliny byly opatrně vykopány i s kořenovým balem o velikosti asi 20×20 cm. Následně jsem pod binokulární lupou opatrně rozebírala kořenový bal každé odebrané rostliny za účelem nalezení haustorií, kterými jsou rostliny připojeny k svému hostiteli.

Z každé rostliny jsem odebrala několik vzorků z různých kořenů hostitele, na které bylo napojené haustorium černýše. Celkem jsem odebrala 48 vzorků z různých kořenů hostitelů, 4 až 6 vzorků z jedné rostliny o velikosti cca 1–2 mm. Odebrané vzorky jsem uchovala v nádobě se silikagelem v mrazícím boxu.

Následně jsem vzorky kořenů zpracovala pomocí metody *DNA barcoding*. Tato metoda slouží k identifikaci živočišných i rostlinných druhů. Pro identifikaci živočichů se využívá krátký úsek genu pro cytochrom C oxidázu I (Hebert et al. 2003). Pro rychlou identifikaci rostlin je však vhodnější použití jaderného ITS regionu DNA, nebo např. *trnH-psbA* regionu chloroplastové DNA. Různí autoři však mají různé názory ohledně vhodného úseku DNA. (Jackson et al. 1999, Kress et al. 2005, Taberlet et al. 2007, Valentini et al. 2008). Identifikace organismu je založena na srovnání získaných sekvencí se sekvencemi dostupnými v genové bance (*GenBank*).

V této práci jsem použila metodu s využitím ITS regionu DNA. Získané sekvence z DNA kořenů hostitelů jsem srovnávala s databází *GenBank* pomocí aplikace BLAST (*Nucleotide Blast*).

2.2.1 Izolace DNA

Z odebraných vzorků z kořenů jsem následně izolovala DNA pomocí komerčního kitu (Invitek Plant Extraction Kit, www.invitek.de). Postupovala jsem podle standardního protokolu doporučeného výrobcem, pouze se změnou u finálního vymývání, kdy jsem použila

místo elučního pufru 50 µl vody, která byla přehřátá na 65 °C. Izolovanou DNA jsem uschovala v mrazícím boxu pro další použití.

2. 2. 2 PCR, purifikace a příprava sekvenční směsi

Z izolované DNA jsem amplifikovala vybrané úseky DNA pomocí tzv. *nested* PCR (polymerase chain reaction) podle standardního protokolu. To znamená, že jsem nejdříve amplifikovala úsek s templátem z DNA a pokračovala jsem další PCR (*nested* reakce), kde jako templát sloužil produkt předcházející PCR. Nejdříve jsem provedla 1. PCR se směsí o objemu 25 µl pro každý vzorek. Směs obsahovala 1 µl izolované DNA vzorku, 8,5µl vody pro PCR, pár primerů (7,5 pmol každý) a 12,5µl PP Master mix (2 × konc.). Použila jsem primery: ITS 1P, který je specifický pro rostliny (5′-CTTTATCATTTAGAGGAAGGAAG-3′; Selosse et al. 2002), a ITS 4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′; White et al. 1990). Amplifikace probíhala v termocycleru BIOER XP CYCLER za podmínek uvedených v tabulce (tab. 3). Produkt 1. PCR jsem následně naředila 1:100 vodou pro PCR (1 µl produktu k 99 µl vody) a provedla jsem další PCR (*nested* reakce) s namíchanou směsí o objemu 25 µl, která obsahovala 1 µl ředěného produktu 1. PCR, 8,5µl vody pro PCR, dva primery (po 7,5 pmol) a 12,5 µl PP Master mix (2× konc.). Pro tuto reakci jsem použila primer ITS 1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′; White et al. 1990) a primer ITS 4 jako u předchozí reakce.

Tab. 3 PCR cykly pro úseky ITS (40 cyklů).

	Teplota (°C)	Čas (s)
počáteční denaturace	95	300
cykly denaturace	95	60
nasedání primerů	52	60
elongace	72	60
konečná elongace	72	600

Výsledek amplifikace jsem testovala elektroforézou na 1,5% agarosových gelech v TBE pufru.

Dalším krokem byla purifikace, kterou jsem provedla podle výrobcem doporučeného protokolu. K 5 µl PCR produktu jsem přidala 2 µl ExoSAP (USB Inc., USA). Poté jsem připravila vzorky na sekvenaci. K 1,5 µl amplifikované DNA jsem přidala 6 µl směsi složené z 0,5 µl ITS1/ITS4 primeru a 5,5 µl vody, jakožto základ sekvenační reakce. Vzorky byly

následně sekvenovány v Sekvenačním centru Jihočeské university na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems.

2. 2. 3 Příprava vzorků pro SEM

Některá neporušená připojení haustoria na kořen hostitele jsem uschovala k následnému pořízení dokumentačních snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Vzorky pro SEM jsem fixovala v 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH = 7.2) a uskladnila při 4 °C. Následně jsem je dehydratovala (nahrazení vody v preparátu organickým rozpouštědlem) řadou roztoků acetonu se zvyšující se koncentrací (od 30-100%) a vysušila metodou kritického bodu pomocí dryer CPD 2 (Pelco TM). Vzorky byly posléze pokryty vrstvou zlata ve vakuu pomocí SEM Coating Unit E5100 (Polaron Equipment Ltd.). Morfologické parametry jsem pozorovala na SEMJEOL 6300 vybaveným Sony CCD kamerou.

2. 3 Statistické zpracování dat

Kalibrace vztahu mezi morfologií rostlin a produkcí vegetativní biomasy jsem provedla pomocí mnohonásobné lineární regrese, v níž vystupovaly morfologické charakteristiky jako prediktory a logaritmovaná hmotnost sušiny biomasy (dekadický logaritmus hmotnosti v miligramech) jako vysvětlovaná proměnná. Při volbě optimálního modelu jsem použila metodu *backward selection* (tj. postupné odebírání prediktorů z modelu, který zahrnuje všechny testované prediktory) a jako kritérium volby optimálního modelu parametr AIC (Akaike Information Criterion). Některé kalibrační modely proto zahrnují i proměnné, jejichž efekt není statisticky průkazný na hladině významnosti 0,05. Nicméně, vzhledem k tomu, že účelem kalibrace byl pouze co nejpřesnější odhad vegetativní biomasy rostlin z kalibrovaného datasetu, nemělo by být zahrnutí těchto „nadbytečných“ prediktorů na škodu. Koeficienty determinace jednotlivých kalibračních modelů podávají informaci o přesnosti kalibračních rovnic a jejich robustnost byla dále testována krosvalidací regresních modelů. Krosvalidace spočívala v náhodném výběru 75% pozorování z příslušného vzorku, na jehož základě byl sestaven krosvalidační regresní model, kterým bylo následně fitováno zbylých 25% pozorování. Tato procedura byla opakována 500× a při každém opakování se zaznamenávala odchylka mezi fitovanými a pozorovanými hodnotami. Průměrná hodnota odchylek byla následně využita jako míra robustnosti kalibrace.

Proměnná relativní investice do generativní reprodukce sloužila jako míra reprodukční úspěšnosti jednotlivých rostlin v porovnání s ostatními pozorovanými rostlinami na dané lokalitě. Spočítala jsem jí jako podíl hmotnosti sušiny biomasy reprodukčních orgánů dané rostliny ku průměrné hmotnosti sušiny biomasy reprodukčních orgánů na lokalitě. Výpočet tedy probíhal obdobně jako výpočet relativní *fitness* v populační biologii (např. Neal 2004).

Závislost investice do reprodukce na vegetativních charakteristikách rostlin byla testována pomocí obecného lineárního modelu, v němž jako vysvětlovaná proměnná vystupovala biomasa generativních orgánů (dekadický logaritmus hmotnosti v miligramech). Vztahy mezi jednotlivými vegetativními charakteristikami a investicí do reprodukce byly popsány pomocí marginálních efektů jednotlivých prediktorů. Celkový model popisující závislost byl potom sestaven pomocí *forward selection*.

Prostorové rozmístění rostlin v experimentu 2 jsem hodnotila pomocí porovnávání variance a průměru počtu rostlin na odebraný čtverec spolu s výpočtem Loydova indexu shlukovitosti (Lepš 1996). Tyto výpočty poskytly nejen informaci o rozmístění jedinců, ale pomocí nich bylo možné usuzovat i na vliv a charakter působení vnitrodruhové kompetice v populaci (Lepš 1996, Begon et al. 1997), což dále doplňovaly korelační analýzy produkce biomasy a počtu rostlin odebraných ze čtverce.

Pro základní statistické analýzy (deskriptivní statistika, korelace) a sestrojování grafů byl využit program Statistica, verze 9 (StatSoft, 2009). Sestavení kalibračních modelů, jejich krosvalidace a analýza vztahů mezi investicí do reprodukce a vegetativními charakteristikami byly provedeny v programu R, verze 2.10.1 (R Core Development Team 2010).

3 VÝSLEDKY

3.1 Experiment 1 – pokusná plocha Mokré a Třebín

3.1.1 Odhad produkce vegetativní biomasy pomocí kalibračního datasetu

Odhad produkce vegetativní biomasy jedinců na základě kalibrace (vztahem morfologických charakteristik a hmotnosti sušiny biomasy v kalibračním datasetu) realisticky popsal průběh růstu zkoumaných rostlin (tab. 4). Množství vyprodukované vegetativní biomasy těsně souviselo s počtem listů na počátku vegetační sezóny, v průběhu reprodukční fáze bylo třeba použít pro odhad produkce biomasy několik prediktorů, z nichž největší vliv měl počet větví (tab. 4). Kalibrační model pracoval obzvláště dobře v červnu a v červenci, kdy se podařilo zachytit značné rozdíly mezi rostlinami a vysvětlit cca 76–85% variability v produkci biomasy. Průměrná odchylka od modelu zjištěná krosvalidací obecného lineárního modelu byla nízká, řádově nižší v porovnání se zjištěnou hmotností sušiny (tab. 4). Věrohodnost popisu růstu rostlin pomocí kalibračního modelu podporuje i shoda v rozdělení produkce biomasy rostlin v kalibračním a kalibrovaném datasetu (obr. 3.1 – obr. 3.4).

Tab. 4. Kalibrační tabulka pro výpočet hmotnosti sušiny vegetativních částí sledovaných rostlin pomocí lineárního modelu. Číslo u jednotlivých morfologických charakteristik udává sklon regresní přímky (+: $p = 0,05-0,11$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$), Df 1 = stupně volnosti modelu. Df2 reziduální stupně volnosti). Průměrná odchylka udává odchylku mezi fitovanými a pozorovanými hodnotami, odhadnutou pomocí krosvalidace.

Mokré	Větve 1.ř	Větve 2.ř	Počet listů	Počet listů hlavní stonek	Počet listů opad.listů hlavní stonek	Počet listů větve	Pevný člen (Intercept) determinace (Adjust.-r2)	F	Df 1	Df 2	p	Průměrná odchylka [g]
Duben			0,1313**				0,5295	17,34	1	18	0,00058	0,003
Květen			0,1214**				0,2459	19,33	1	18	0,00035	0,003
Červen	0,0949**	0,0381+		-0,0446*	-0,0735*		1,4722	29,03	4	15	<<0,001	0,002
Červenec	0,0448**			-0,0251*		0,0073**	1,5449	27,18	3	16	<<0,001	0,002

Třebín	Větve 1.ř	Větve 2.ř	Počet listů	Počet listů hlavní stonek	Počet listů opad.listů hlavní stonek	Počet listů větve	Pevný člen (Intercept) determinace (Adjust.-r2)	F	Df 1	Df 2	p	Průměrná odchylka [g]
Duben			0,1417**				0,5399	49,56	1	17	<<0,001	0,002
Květen			0,1268**				0,3402	44,83	1	18	<<0,001	0,004
Červen	0,0394**			-0,0598*	-0,0628*	0,008*	1,7327	15,88	4	15	<<0,001	0,003
Červenec	0,1233**	0,0433+		-0,1165*	-0,1124**	0,0042*	1,9151	17,98	5	14	<<0,001	0,003

3. 1. 2 Průběh růstu rostlin

Průběh růstu rostlin byl podobný na obou sledovaných plochách u Mokrého i u Třebína (obr. 3.5 - obr. 3.8) V dubnu, na začátku sezóny rostliny ještě neměly větve, byly vyvinuty dělohy a 0–2(–4) lodyžní listy. Tyto rozdíly v počtu listů zatím způsobovaly ještě velmi malou variabilitu v produkci vegetativní biomasy. V květnu již měla většina rostlin vyvinuty větve. Tyto větve často vyrůstaly i v nodu s děložními listy. V červnu měla již většina rostlin opadané děložní listy a opadané byly i některé listy na hlavním stonku. Hmotnost sušiny vegetativní biomasy i její variabilita mezi rostlinami dosáhly maxima v červenci. To bylo způsobeno různými velikostmi jedinců a různým počtem větví a tudíž i listů. Hmotnost sušiny vegetativní biomasy v srpnu poklesla kvůli opadávání listů a okusu zvěří. (obr. 3.2, obr. 3.4, obr. 3.5, obr. 3.7).

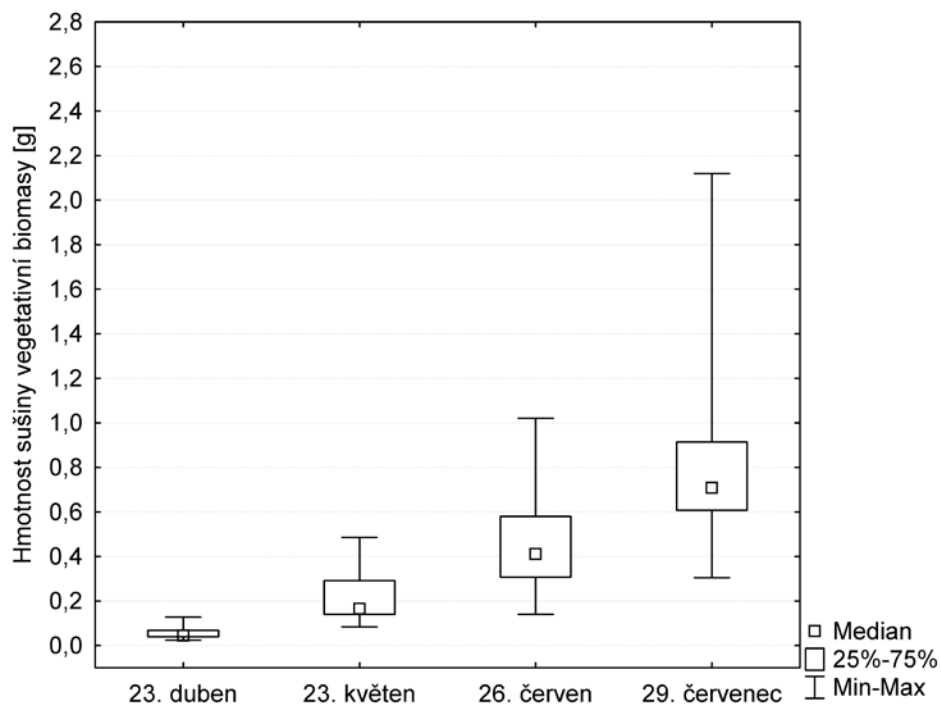
Na obou plochách přežívala nadpoloviční většina rostlin do konce srpna (56% na ploše v Mokrému a 70% na ploše Třebína). Největší mortalitu jsem zaznamenala u Třebína mezi květnovým a červnovým odběrem (9 rostlin) a u Mokrého mezi květnovým a červnovým odběrem (8 rostlin) a mezi červencovým a srpnovým odběrem (9 rostlin) (tab. 5). Jako významný faktor, který ovlivňoval hmotnost biomasy rostlin, se ukázal okus zvěří, nejčastěji okus hlavního vegetačního vrcholu, u některých rostlin zároveň s bočními větvemi. Většina rostlin ukousnutých v červnu přežívala až do srpna, kromě 5 rostlin, které byly zaznamenány naposledy v červenci. Nejvíce nově ukousnutých rostlin (10) jsem v Mokrému pozorovala mezi květnem a červnem a u Třebína mezi červencem a srpnem (tab. 5).

První květy na hlavním stonku jsem u rostlin na obou plochách pozorovala při červnové návštěvě, květy na větvích potom v červenci. V červenci rostliny stále kvetly, hlavně na větvích. Vyprodukovaly i první plody, a to jak na hlavním stonku, tak na větvích. Nejvyvinutější semena byla těsně před zralostí. V srpnu byly téměř všechny rostliny odkvetlé, až na 2 rostliny na ploše u Třebína. V té době jsem zaznamenala i největší počet plodů se zralými semeny, ze kterých již mnoho bylo vysypaných. Vysypané tobolky z rostlin neopadávaly, což umožnilo dobře stanovit celkovou produkci plodů. I na usychajících rostlinách vytrvávaly tobolky jak vysypané, tak nevysypané.

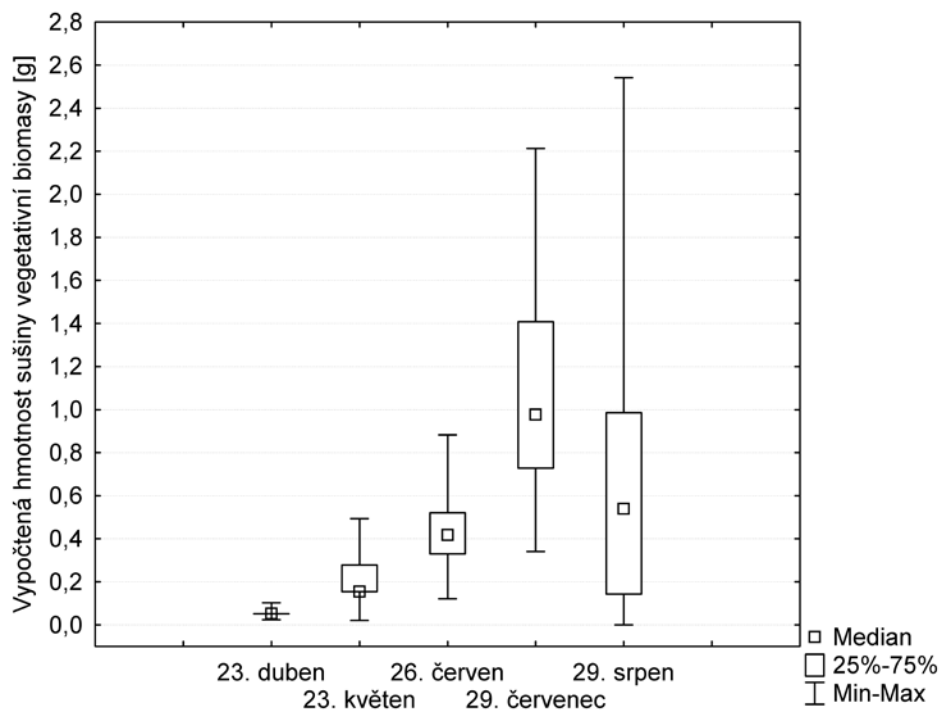
V 50 nevysypaných tobolkách jsem napočítala 121 semen. Průměrná váha semen na jednu tobolku byla 5,192 mg a 1 semeno vážilo v průměru 2,145 mg.

Tab. 5 Mortalita a četnost okusu zvěří u sledovaných rostlin v průběhu vegetační sezóny. Celkový počet rostlin na obou sledovaných plochách na začátku sezóny byl 50.

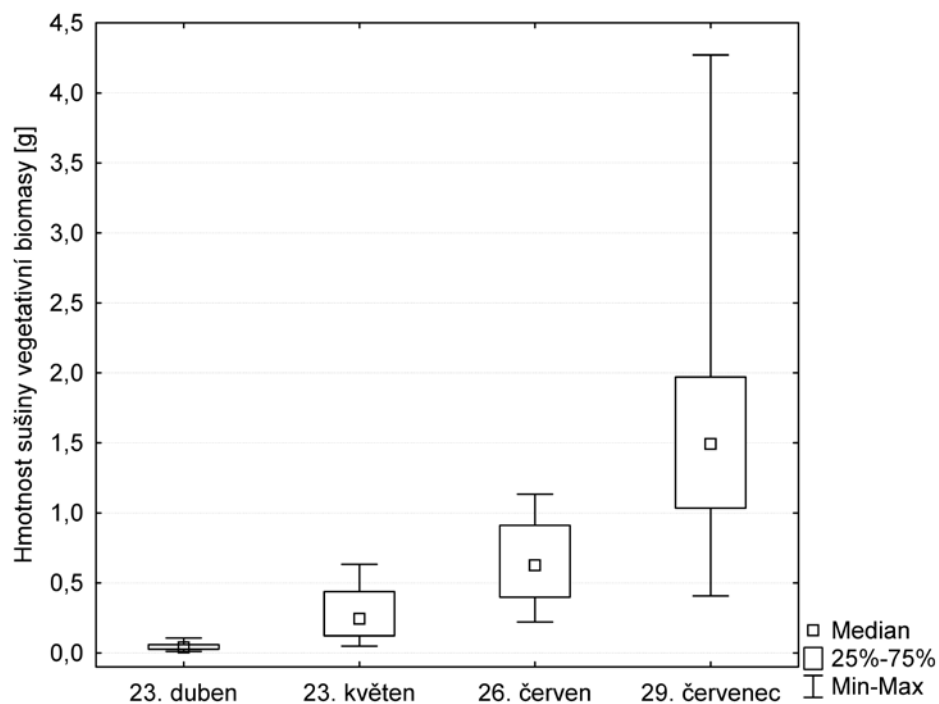
	květen	červen	červenec	srpen
Mokré Počet přežívajících rostlin	46	38	37	28
Počet uhynulých v daném měsíci	4	8	1	9
Počet nově ukousnutých	4	10	6	4
Počet ukousnutých (celkem)	4	14	20	19
Třebín Počet přežívajících rostlin	49	40	39	35
Počet uhynulých v daném měsíci	1	9	1	4
Počet nově ukousnutých	2	6	0	10
Počet ukousnutých (celkem)	2	8	8	17



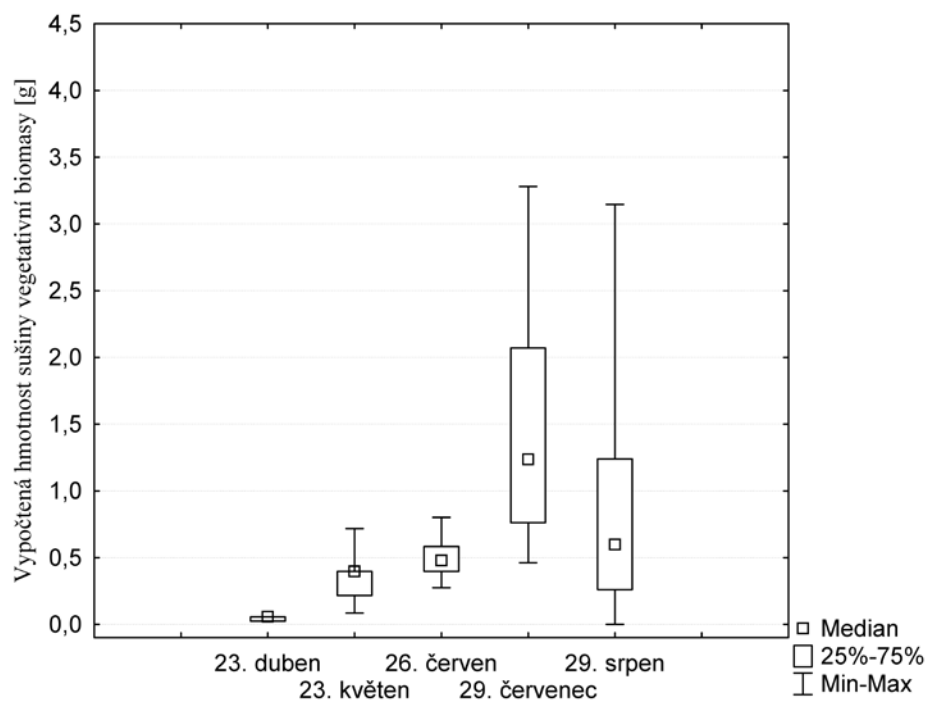
Obr. 3.1 Hmotnost sušiny vegetativních částí (bez květů a plodů) rostlin v kalibračním datasetu na ploše Mokré v průběhu vegetační sezóny.



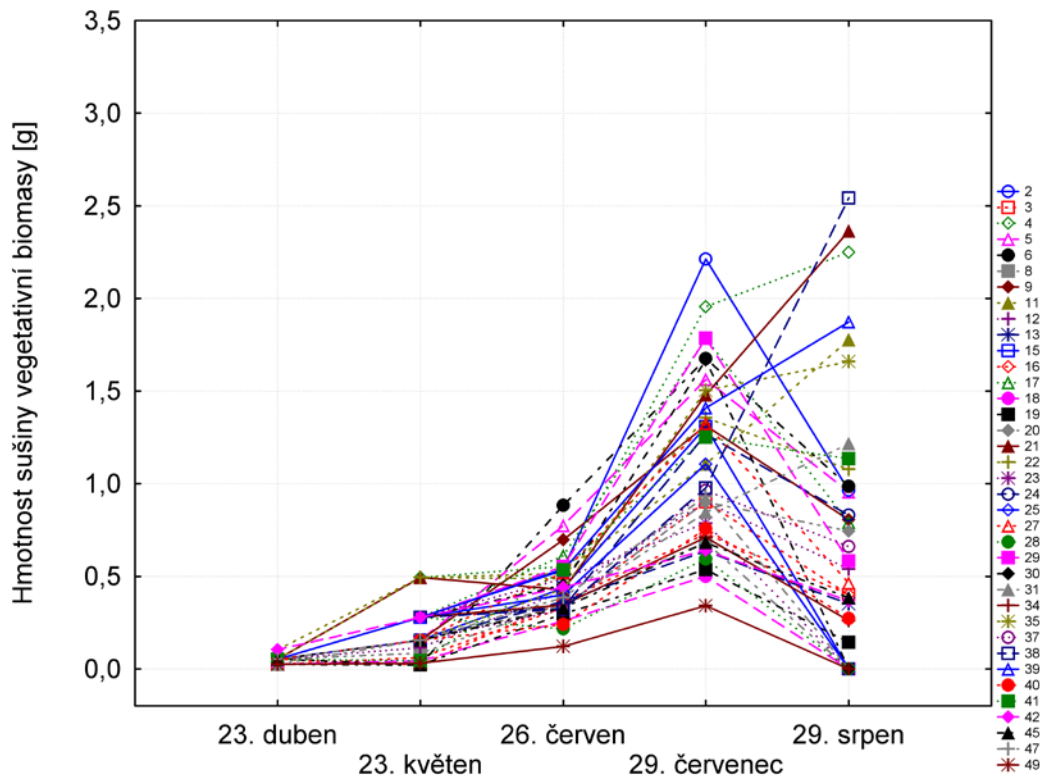
Obr. 3.2 Vypočtená (duben až červenec) a zvážená (srpen) hmotnost sušiny vegetativních částí (bez květů a plodů) sledovaných rostlin na ploše Mokré v průběhu vegetační sezóny.



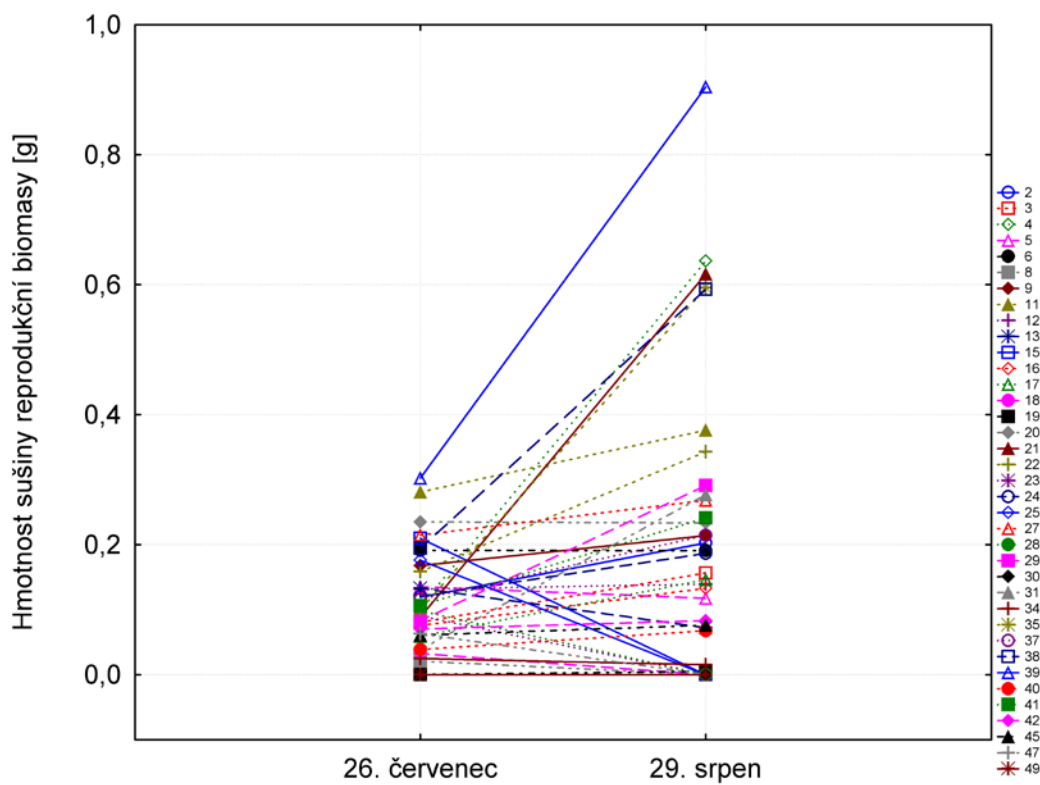
Obr. 3.3 Hmotnost sušiny vegetativních částí (bez květů a plodů) kalibračních rostlin na ploše Třebín v průběhu vegetační sezóny.



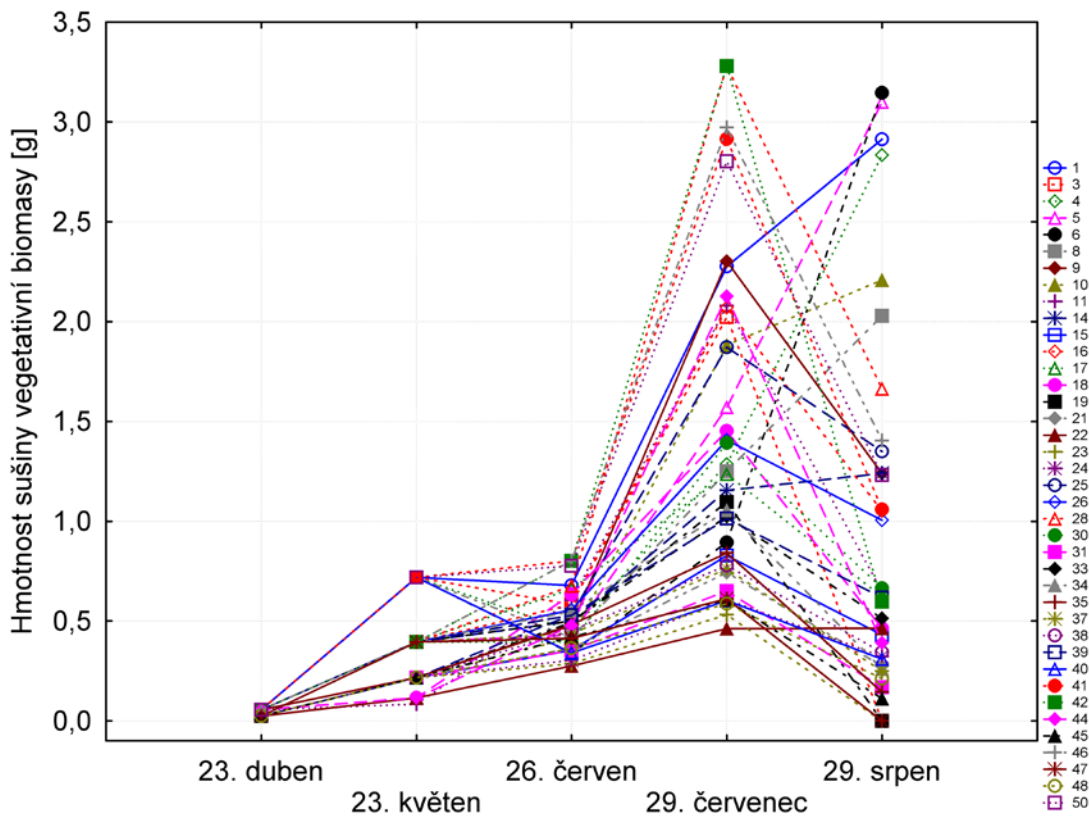
Obr. 3.4 Vypočtená (duben až červenec) a zvážená (srpen) hmotnost sušiny vegetativních částí (bez květů a plodů) sledovaných rostlin na ploše Třebín v průběhu vegetační sezóny.



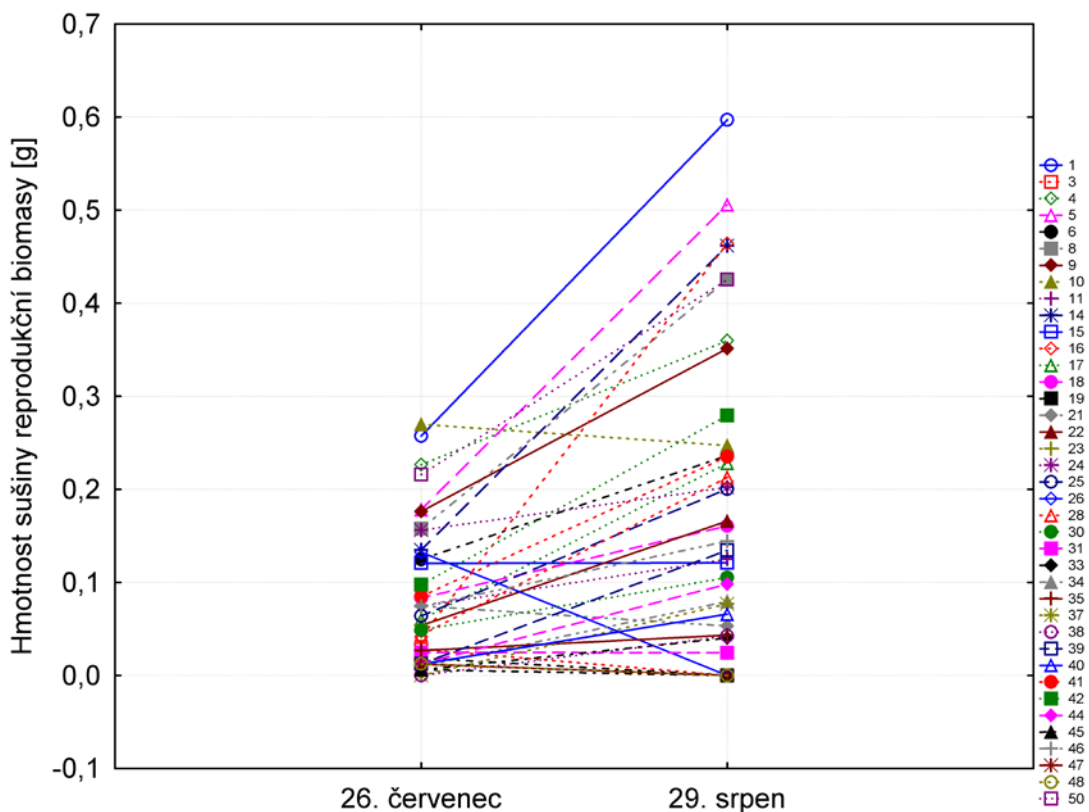
Obr. 3.5 Průběh vypočtené hodnoty hmotnosti sušiny vegetativní biomasy jednotlivých rostlin během vegetační sezóny na ploše Mokré.



Obr. 3.6 Hmotnost sušiny reprodukční biomasy jednotlivých rostlin v červenci a srpnu na ploše Mokré.



Obr. 3.7 Průběh vypočtené hodnoty hmotnosti sušiny vegetativní biomasy jednotlivých rostlin během vegetační sezóny na ploše Třebín.

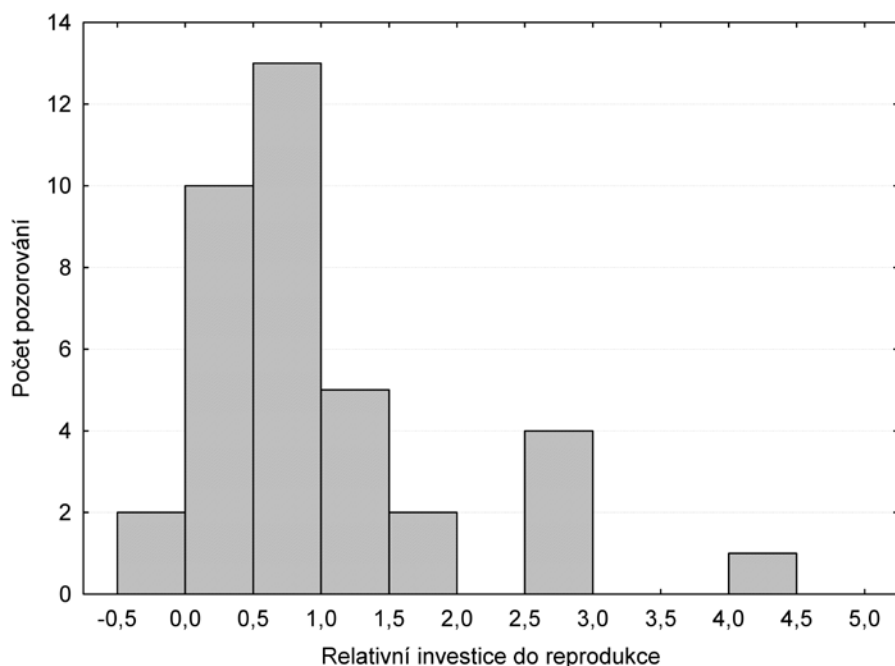


Obr. 3.8 Hmotnost sušiny reprodukční biomasy jednotlivých rostlin v červenci a srpnu na ploše Třebín.

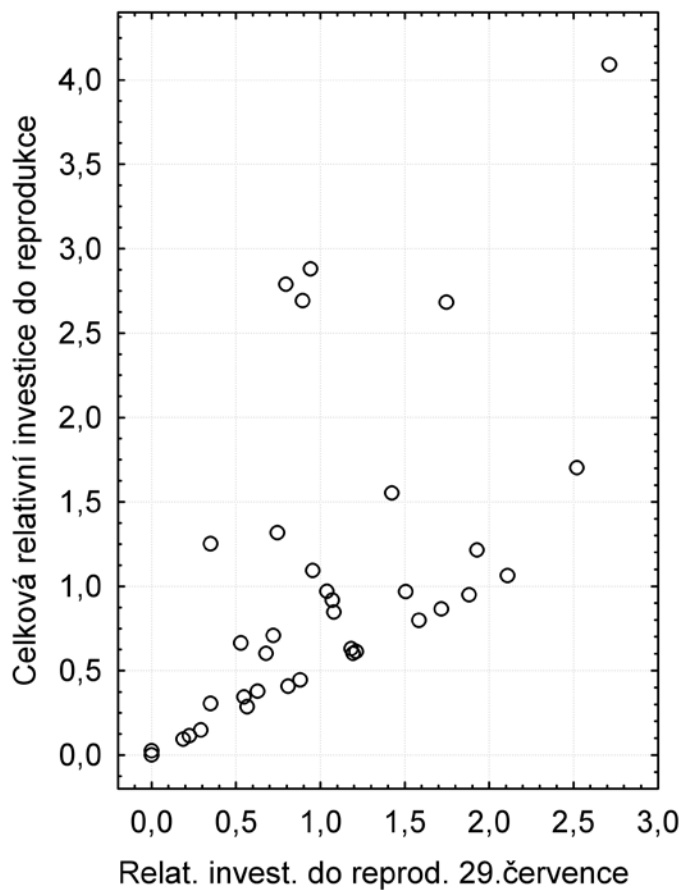
3. 1. 3 Investice do reprodukce

Jednotlivé rostliny se značně lišily v relativní investici do generativní reprodukce (tj. hmotnost biomasy alokované do reprodukčních orgánů rostliny škálovaná aritmetickým průměrem pro příslušný dataset). Na ploše u Mokrého bylo nejvíce rostlin s nízkou, či průměrnou relativní investicí do reprodukční biomasy, (ale zaznamenala jsem také několik reprodukčně výjimečně úspěšných rostlin ($>2,5$; obr. 3.9). Tyto celkově mimořádně úspěšné rostliny však při návštěvě 29. července patřily mezi rostliny se spíše průměrnou investicí do reprodukce, kromě jediného mimořádně úspěšného exempláře, který se velmi úspěšně reprodukoval již v červenci (obr. 3.10).

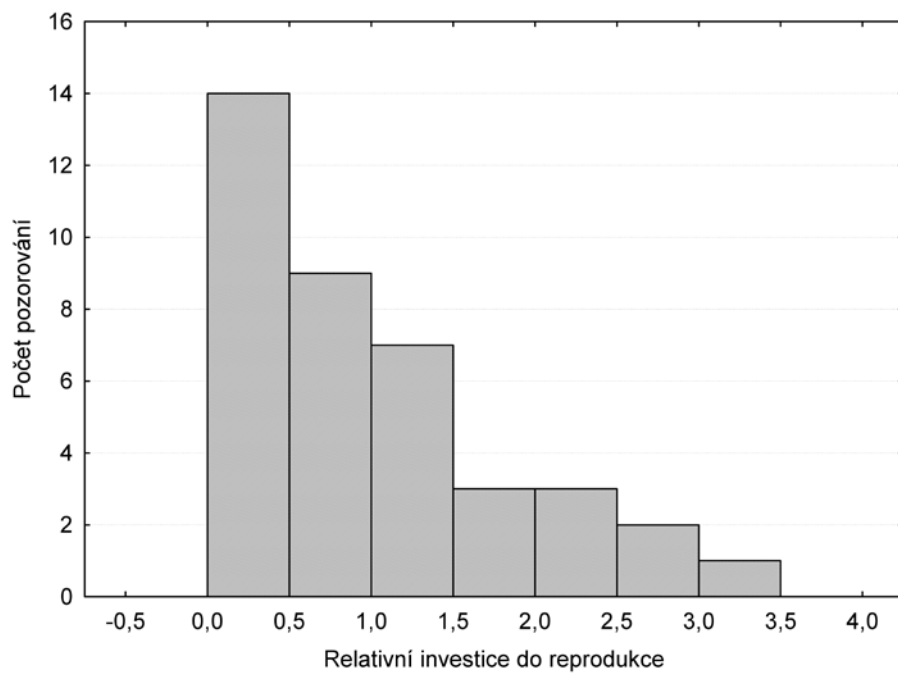
Obdobně v Třebíně bylo nejvíce rostlin se spíše nižší či průměrnou investicí do reprodukce, těch velmi úspěšných bylo podstatně méně. Rozložení relativní investice do reprodukce mělo pozitivně šikmý průběh, chyběly zde zcela mimořádně úspěšné rostliny pozorované na ploše u Mokrého (obr. 3.11). Rostliny, které se dobře generativně reprodukovaly již v červenci, byly reprodukčně úspěšné i celkově (obr. 3.12).



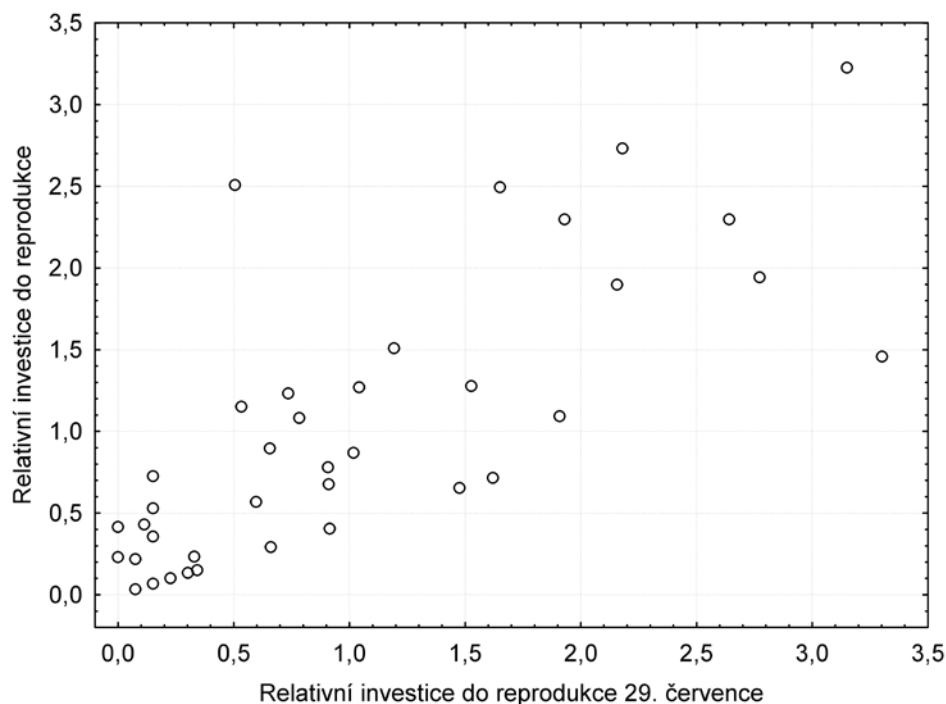
Obr. 3.9 Rozdělení hodnot relativní investice do reprodukce na ploše Mokré.



Obr. 3.10 Vztah celkové relativní investice do reprodukce sledovaných rostlin a relativní investice do reprodukce na konci července na ploše Mokré.



Obr. 3.11 Rozdělení hodnot relativní investice do reprodukce na ploše Třebín.



Obr. 3.12 Vztah celkové relativní investice do reprodukce a relativní investice sledovaných rostlin do reprodukce na konci července na ploše Třebín.

3. 1. 4 Závislosti ovlivňující investici rostlin do reprodukce

Jako míru celkové investice do reprodukce pro jednotlivé rostliny jsem použila vyšší z hodnot zaznamenaných v červenci a srpnu. Investice do generativní reprodukce (vyjádřená hmotností sušiny reprodukční biomasy přímo zváženou v srpnu nebo kalibrací odhadnutou v předchozích měsících) u sledovaných rostlin na ploše Mokré byla průkazně závislá hlavně na množství vegetativní biomasy. Je to patrné z výsledků testování marginálních efektů spojených s produkcí vegetativní biomasy, které jsou vždy průkazně pozitivní, s výjimkou dubnového odběru. Obdobná závislost ovlivňovala produkci reprodukční biomasy i na ploše u Třebína (tab. 6, tab. 8).

Zajímavé jsou výsledky celkových modelů popisujících množství biomasy alokované do generativní reprodukce (tab. 7, tab. 9). Po zahrnutí hmotnosti sušiny vegetativní biomasy v srpnu predikuje model průkazně negativní efekt pro skutečnost, zda rostlina v srpnu přežila. Toto je však vlastností modelu, který spojuje obě výše uvedené proměnné a nemá to žádnou další biologickou interpretaci. Pozitivně se naopak projevovala časnost kvetení. Pouze na ploše u Třebína byl též zaznamenán slabý negativní vliv okusu zvěří.

Tab. 6 Marginální efekty jednotlivých proměnných, pro něž byl testován vliv na maximální zaznamenanou hmotnost reprodukční biomasy (květy a plody) na ploše Mokré. (Veget. biomasa = hmotnost sušiny).

Vysvětlující proměnná	Df	Suma čtverců	Resid. suma čtverců	F	p	Efekt
Nulový model			15,952			
Vegetativní internodia	1	0,361	15,592	0,81	0,374	
Okus červen	1	0,163	15,790	0,36	0,552	
Okus červenec	1	0,914	15,039	2,13	0,154	
Okus srpen	1	0,306	15,647	0,68	0,414	
Veget. biomasa - duben	1	0,792	15,161	1,83	0,185	
Veget. biomasa - květen	1	2,593	13,359	6,79	0,013	+
Veget. biomasa - červen	1	3,859	12,094	11,17	0,002	+
Veget. biomasa - červenec	1	4,433	11,520	13,47	< 0,001	+
Veget. biomasa - srpen	1	6,166	9,787	22,05	< 0,001	+
Žije v srpnu	1	4,407	11,546	13,36	0,001	+
Max.zaznam. veget. biomasa	1	5,981	9,972	20,99	< 0,001	+
Kvete v červnu	1	0,357	15,595	0,80	0,377	

Tab. 7 Celkový model popisující závislost maximální zaznamenané hmotnosti reprodukční biomasy (květy a plody) na testovaných proměnných na ploše Mokré. (Veget. biomasa = hmotnost sušiny, korigovaný koef. determinace *Adjusted r*² = 0,545, *F*_(3; 33) = 15,38, *p* < 0,001).

Statisticky průkazné parciální efekty jednotlivých proměnných

Vysvětlující proměnná	Sklon regres. křivky	Resid. Df	Resid. suma čtverců	Df	Suma čtverců	F	p
(Intercept)	1,354	36	15,952				
Veget. biomasa - srpen	1,258	35	9,787	1	6,166	30,59	<0,001
Žije v srpnu	-2,785	34	7,493	1	2,294	11,38	0,002
Kvete v červnu	0,341	33	6,652	1	0,840	4,17	0,049

Tab. 8 Marginální efekty jednotlivých proměnných, pro něž byl testován vliv na maximální zaznamenanou hmotnost reprodukční biomasy (květy a plody) na ploše Třebín. (Veget. biomasa = hmotnost sušiny).

Vysvětlující proměnná	Df	Suma čtverců	Resid. suma čtverců	F	p	Efekt
Nulový model			8,986			
Vegetativní internodia	1	0,284	8,702	1,21	0,279	
Okus červen	1	0,410	8,575	1,77	0,191	
Okus červenec	0	0	8,986			
Okus srpen	1	1,491	7,495	7,36	0,01	-
Veget. biomasa - duben	1	2,346	6,639	13,08	<0,001	+
Veget. biomasa - květen	1	1,143	7,843	5,39	0,026	+
Veget. biomasa - červen	1	0,941	8,044	4,33	0,044	+
Veget. biomasa - červenec	1	2,901	6,085	17,64	<0,001	+
Veget. biomasa - srpen	1	4,597	4,389	38,75	<0,001	+
Žije v srpnu	1	1,953	7,033	10,27	0,003	+
Max.zaznam. veget. biomasa	1	4,017	4,969	29,91	<0,001	+
Kvete v červnu	1	0,456	8,529	1,98	0,168	

Tab. 9 Celkový model popisující závislost maximální zaznamenané hmotnosti reprodukční biomasy (květy a plody) na testovaných proměnných. na ploše Třebín (Veget. biomasa = hmotnost sušiny, korigovaný koef. determinace $Adjusted\ r^2 = 0,842$, $F_{(5;33)} = 41,64$, $p < 0,001$)

Statisticky průkazné parciální efekty jednotlivých proměnných

Vysvětlující proměnná	Sklon regres. křivky	Resid. Df	Resid. suma čtverců	Df	Suma čtverců	F	p
(Intercept)	2,055	38	9,0				
Veget. biom - srpen	2,238	37	4,4	1	4,597	123,4	<0,001
Žije v srpnu	-6,306	36	2,4	1	2,035	54,6	<0,001
Okus srpen	-0,266	35	1,8	1	0,554	14,9	0,0005
Veget. biom - srpen ^2	-3,748	34	1,5	1	0,310	8,3	0,0069
Kvete v červnu	0,196	33	1,2	1	0,261	7,0	0,0123

3. 2 Experiment 2

3. 2. 1 Počet rostlin ve čtverci v průběhu vegetační sezóny

Kromě dubnového odběru, byla ve všech čtvercích vždy zaznamenána alespoň jedna rostlina. V dubnu byly zaznamenány 3 prázdné čtverce, proto bylo hodnoceno celkem 13 čtverců, aby se zachoval jednotný počet 10 pozitivních vzorků. Průměrný počet rostlin na čtverec se nejprve zvýšil v období duben-květen a následně postupně klesal až do srpna (tab. 10).

Podobný průběh měla i variance počtu rostlin, u které je nápadný především výrazný pokles mezi květnem a červnem. Loydův index, vyjadřující míru shlukovitosti rozmístění rostlin v prostoru klesal v průběhu celé vegetační sezóny, kromě intervalu mezi odběry v červnu a červenci.

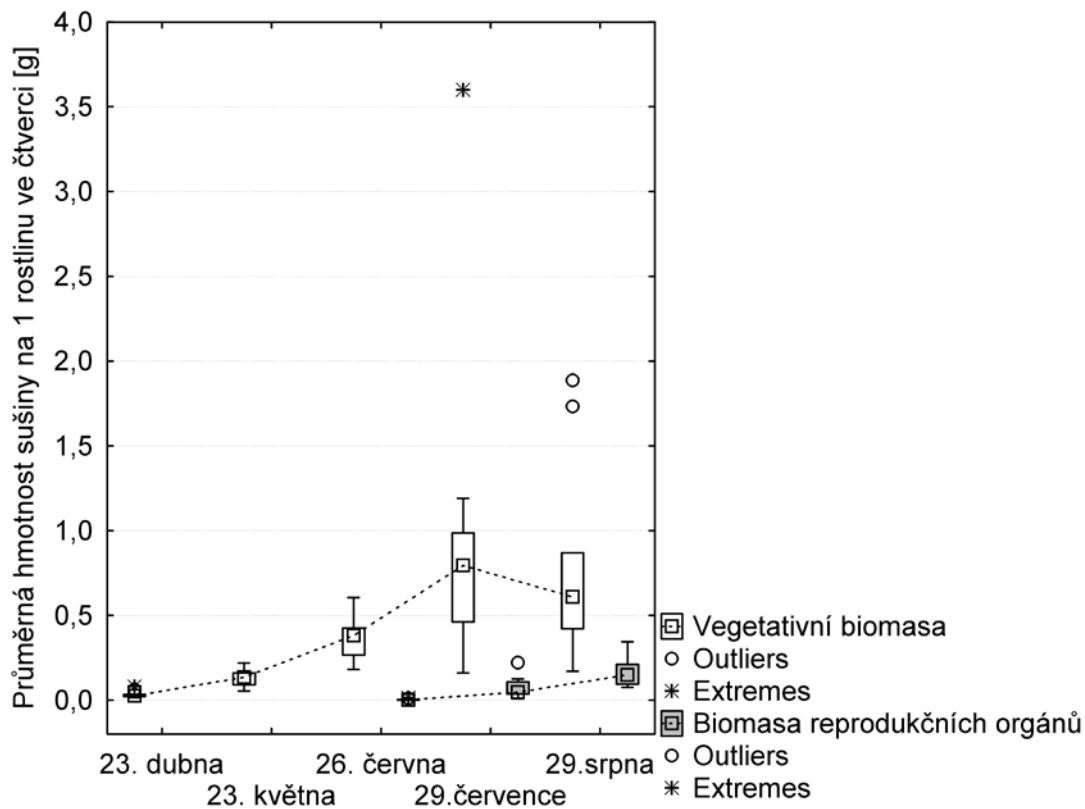
Tab. 10 Průměr a variance počtu rostlin na odebraný čtverec a hodnota Loydova indexu v průběhu vegetační sezóny.

Datum odběru	Průměrný počet rostlin ve čtverci	Variance	Loydův index
23. duben	1,8	2,808	1,282
23. květen	4,0	5,556	1,097
26. červen	3,4	1,156	0,806
29. červenec	2,3	1,789	0,903
29. srpen	1,4	0,489	0,535

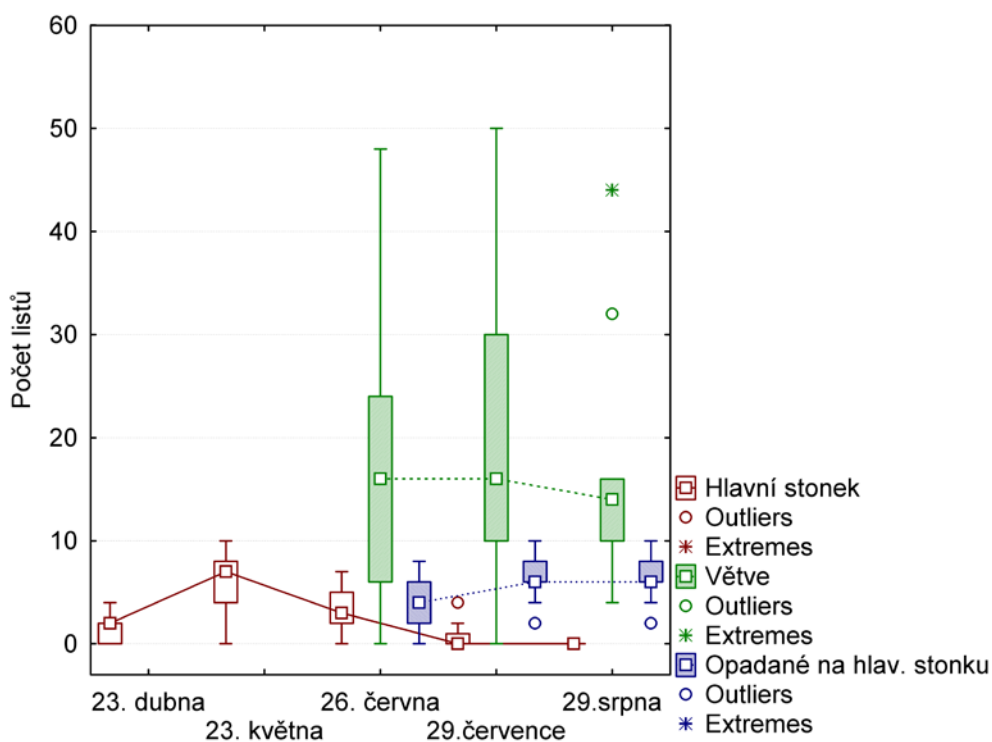
3. 2. 2 Produkce biomasy a morfologické charakteristiky

V dubnu, na začátku sezóny byly mezi sledovanými rostlinami malé rozdíly, rostliny měly vyvinuty pouze dělohy a 0–2(–4) lodyžní listy. V té době ještě neměly vyvinuté větve. Při odběru v květnu měly rostliny již vyvinuty postranní větve, které velikostí nepřesahovaly 5 cm. Lodyžní listy na rostlinách vytrvávaly do května a poté začaly postupně opadávat, zároveň začal vzrůstat počet listů na větvích. (obr. 3.14). S postupující vegetační sezónou se zvolna projevovaly rozdíly mezi rostlinami, hlavně v počtu větví a tudíž i počtu listů na větvích. Rozdíly dosáhly maxima ke konci července (obr. 3.13, obr. 3.14). Při odběru v červnu žádná rostlina neměla děložní listy. Děložní listy byly opadané i u rostlin, které ještě v té době nekvetly. Ukousnutých rostlin bylo v červnu 13% a v červenci 20% z odebraných rostlin. V srpnu již žádná z odebraných rostlin neměla lodyžní listy a téměř 79% z odebraných rostlin bylo ukousnutých, což mělo vliv na snížení vegetativní biomasy u tohoto odběru (obr. 3.13). Některé rostliny byly v srpnu již částečně uschlé.

Stejně jako ve výše popsaném experimentu 1, první rostliny začínaly vykvétat v červnu. Investice do reprodukčních částí rostlin dosáhla maxima při posledním odběru koncem srpna (obr. 3.13). Nevysypané, ale i vysypané tobolek vytrvávaly i na částečně uschlých rostlinách.



Obr. 3.13 Průměrná hmotnost sušiny vegetativních a reprodukčních částí přepočtena na jednu rostlinu v odběrovém čtverci (10 opakování) v průběhu sezóny. Hodnoceny byly pouze čtverce, ve kterých byla alespoň jedna rostlina.



Obr. 3.14 Počet listů na rostlinách v jednotlivých odběrech v průběhu sezóny.

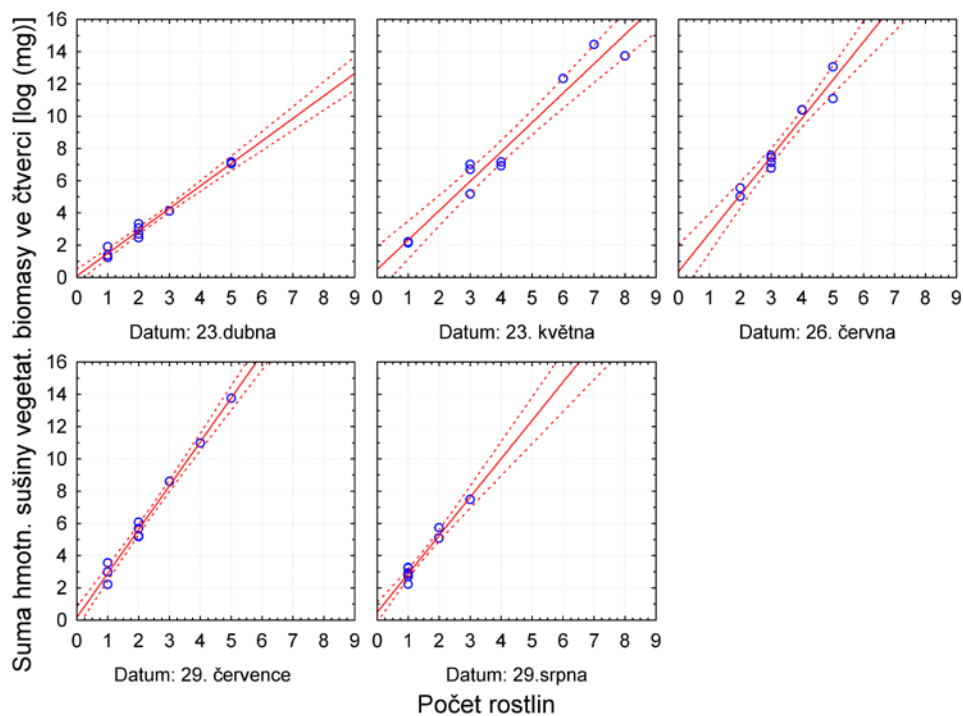
3. 2. 3 Vztahy mezi hmotností sušiny vegetativní a reprodukční biomasy

Celková hmotnost sušiny vegetativní biomasy ve čtverci průkazně stoupala s počtem rostlin ve čtverci v průběhu celé vegetační sezóny (tab. 11). Sledovaný jev měl charakter přímé úměrnosti tj. lineární závislosti procházející počátkem v dubnu, červnu i červenci (obr. 3.15).

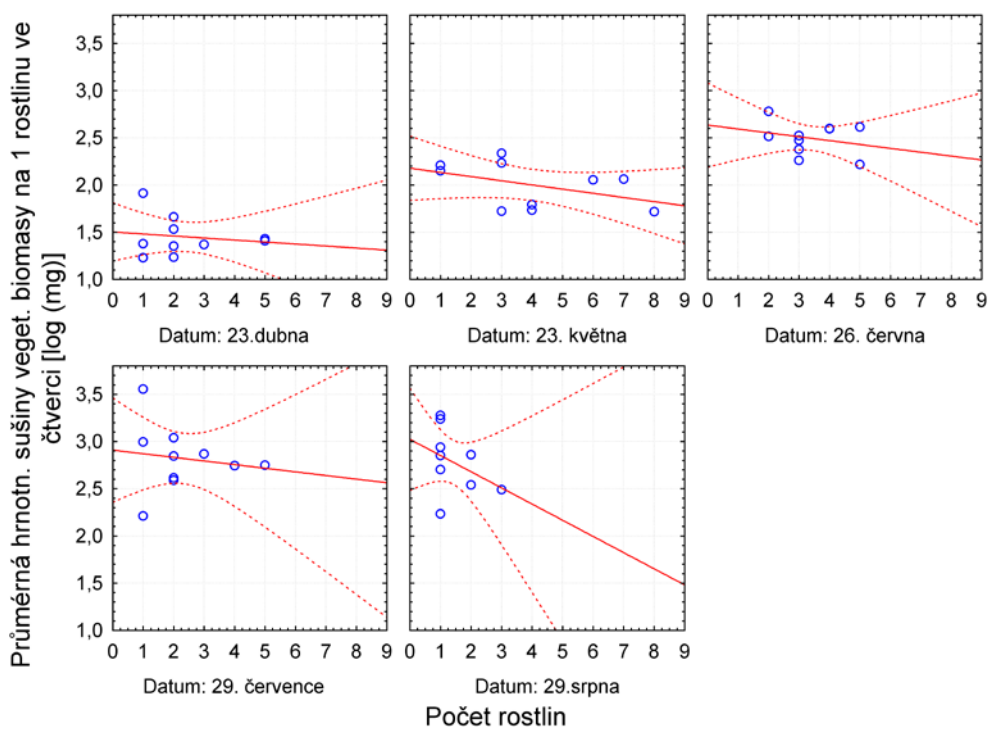
Závislost průměrné hmotnosti sušiny vegetativní biomasy na rostlinu v rámci odběrového čtverce na počtu rostlin vykazovala při všech odběrech tendenci ke klesajícímu průběhu, který ovšem nebyl ani v jednom případě statisticky průkazný (obr. 3.16, tab. 12).

Celková hmotnost sušiny reprodukční biomasy ve čtverci průkazně stoupala s počtem rostlin odebraných v červenci (tab. 13., obr. 3.17), kdy rostliny byly v optimu a zároveň již produkovaly i plody. Průkazně stoupala také v srpnu, kdy všechny rostliny dosahovaly maxima své produkce reprodukční biomasy. V červnu, kdy začínaly vykvétat první rostliny, byla tato závislost neprůkazná (tab. 13, obr. 3.17). Závislost průměrné hmotnosti sušiny reprodukční biomasy na rostlinu v rámci odběrového čtverce na počtu rostlin v průběhu sezóny byla neprůkazná (obr. 3.18, tab. 14).

Investice do reprodukční biomasy byla v průběhu celé sezóny průkazně závislá na množství vegetativní biomasy (obr. 3.19, tab. 15).



Obr. 3.15 Korelace celkové hmotnosti sušiny vegetativní biomasy ve čtverci a počtu rostlin v průběhu vegetační sezóny.



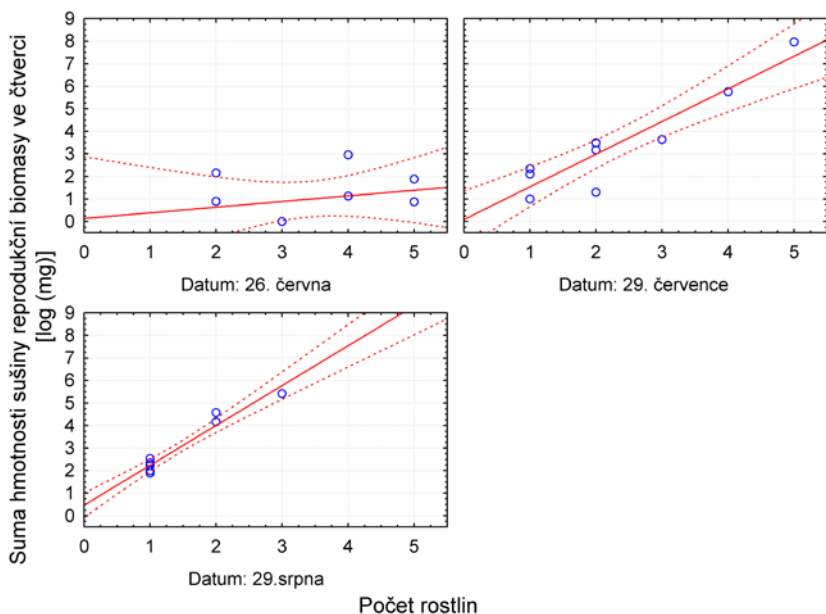
Obr. 3.16 Korelace průměrné hmotnosti sušiny vegetativní biomasy jedné rostliny ve čtverci a počtu rostlin v průběhu vegetační sezóny.

Tab. 11 Korelace celkové hmotnosti sušiny vegetativní biomasy ve čtverci a počtu rostlin.

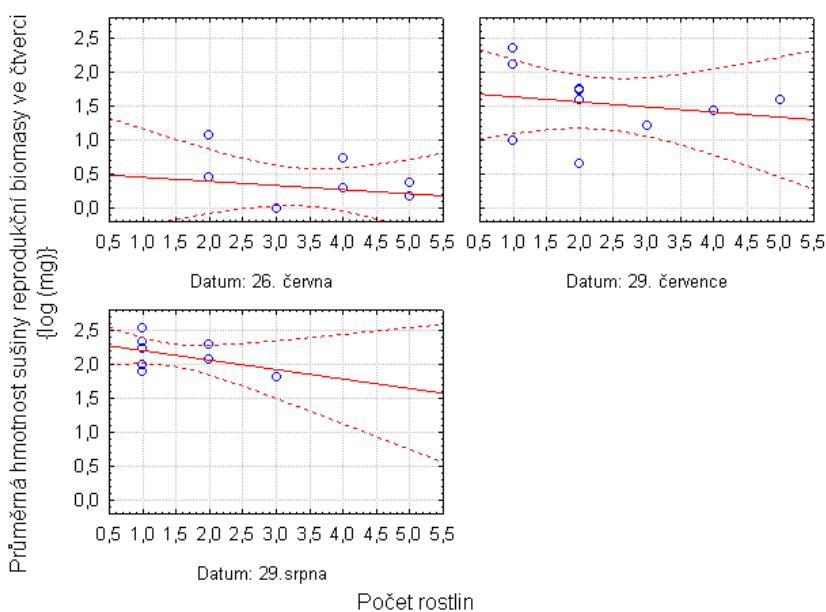
Datum	r	p
23. dubna	0,9910	<0,001
23. května	0,9783	<0,001
26. června	0,9722	<0,001
29. července	0,9936	<0,001
29. srpna	0,9797	<0,001

Tab. 12 Korelace průměrné hmotnosti sušiny vegetativní biomasy jedné rostliny ve čtverci a počtu rostlin.

Datum	r	p
23. dubna	-0,1552	0,6685
23. května	-0,4366	0,2071
26. června	-0,2577	0,4723
29. července	-0,1471	0,6850
29. srpna	-0,3702	0,2923



Obr. 3.17 Korelace celkové hmotnosti sušiny reprodukční biomasy ve čtverci a počtu rostlin v průběhu vegetační sezóny.



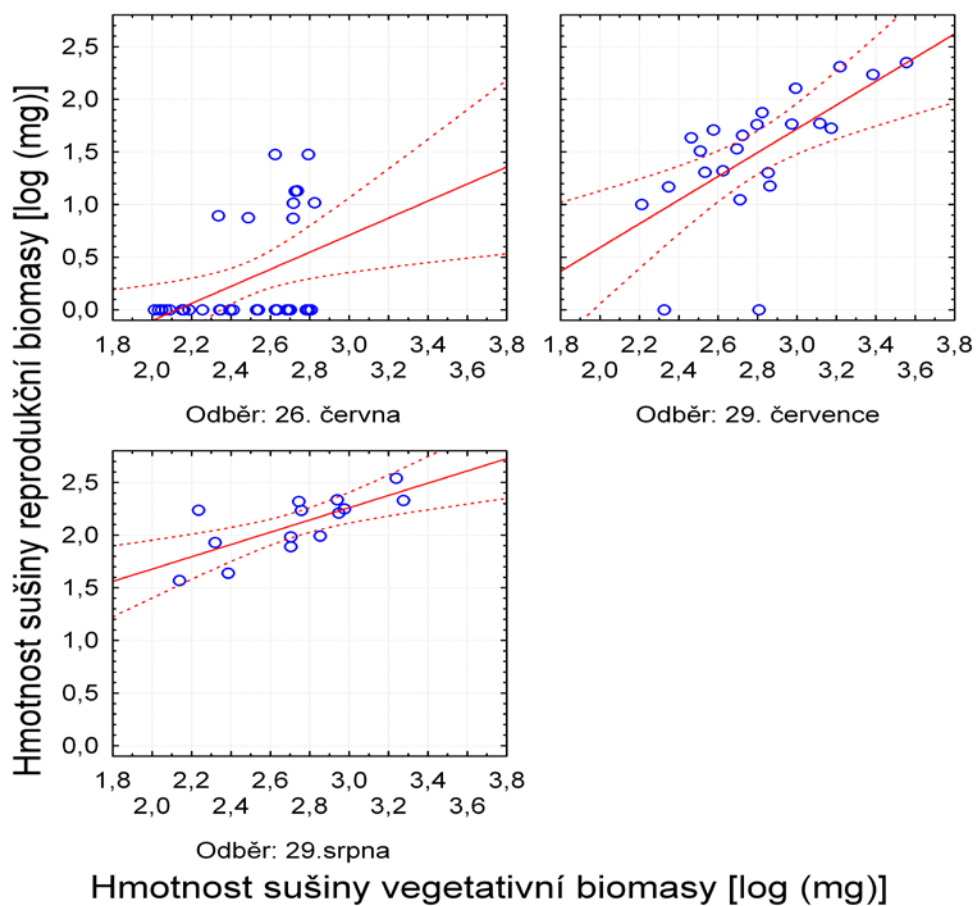
Obr. 3.18 Korelace průměrné hmotnosti sušiny reprodukční biomasy jedné rostliny ve čtverci a počtu rostlin v průběhu vegetační sezóny.

Tab. 13 Parametry korelace mezi celkovou hmotností sušiny reprodukční biomasy ve čtverci a počtem rostlin v průběhu vegetační sezóny.

Datum	r	p
26. června	0,256	0,4753
29. července	0,9252	0,0001
29. srpna	0,9713	<0,001

Tab. 14 Parametry korelace mezi průměrnou hmotností sušiny reprodukční biomasy jedné rostliny ve čtverci a počtem rostlin v průběhu vegetační sezóny.

Datum	r	p
26. června	-0,1800	0,6188
29. července	-0,2002	0,5793
29. srpna	-0,4186	0,2286



Obr. 3.19 Korelace hmotnosti sušiny reprodukčních částí rostlin (květy a plody) a hmotnosti sušiny vegetativních částí rostlin v průběhu vegetační sezóny.

Tab. 15 Parametry korelace mezi hmotností sušiny reprodukčních a vegetativních částí rostlin.

	r	p
26. června	0,4264	0,0119
29. července	0,6352	0,0011
29. srpna	0,7328	0,0029

3.3 Zjišťování identity hostitele

Ze 48 odebraných vzorků z kořenů hostitelů se mi podařilo úspěšně osekvenovat a následně identifikovat 9 vzorků (tab. 17). Kvalita sekvencí těchto vzorků však nebyla vysoká. Mnoho neúspěšných vzorků bylo znehodnoceno kontaminací, ke které došlo během izolace DNA. Druh, jehož DNA vzorky kontaminovala, se na zkoumaných plochách nevyskytoval, ale intenzivně se s ním pracovalo v laboratoři.

Jako hostitel se nejvíce objevoval *Quercus* sp. Ve vzorcích se objevoval jako hostitel i *Melampyrum* sp. (tab. 16). To může znamenat, že haustoria byla skutečně napojena na okolní rostliny černýše nebo na své vlastní kořeny, ale nelze vyloučit osekvenování nesprávného kořenu, tj. vlastního kořenu *M. pratense*, které vyprodukovalo haustorium.

Tab. 16 Výsledky srovnání osekvenovaných úseků DNA z kořenových izolátů s databází *GenBank*. V tabulce jsou uvedeny záznamy z *GenBank*, které jsou nejpodobnější sekvencím získaným vlastní sekvenací, a interpretace výsledku, která bere v potaz druhové složení vegetace na lokalitě.

Katalogové číslo <i>GenBank</i>	Popis sekvence	Max. podobnost	Překryv úseku	Délka úseku	Interpretace
EU646149.1	<i>Quercus environmental sample</i> clone RT_D_(F-26P) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,97	0,91	523	<i>Quercus robur</i>
FJ797592.1	<i>Melampyrum nemorosum</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,96	0,92	563	<i>Melampyrum pratense</i>
EU792414.1	<i>Poa stuckertii</i> voucher Soreng & Soreng 7132 US 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	0,98	476	<i>Poa</i> (pravděpod. <i>P. nemoralis</i>)
EF208968.1	<i>Quercus robur</i> clone ITS10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	0,99	0,93	454	<i>Quercus robur</i>
GU797144.1	<i>Alternaria alternata</i> strain SS-L6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,99	0,99	503	<i>Alternaria alternata</i> (povrchový houbový kontaminant)
EF208968.1	<i>Quercus robur</i> clone ITS10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	0,98	0,93	403	<i>Quercus robur</i>
EU646149.1	<i>Quercus environmental sample</i> clone RT_D_(F-26P) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,98	1	321	<i>Quercus robur</i>
FJ797592.1	<i>Melampyrum nemorosum</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,98	0,93	574	<i>Melampyrum pratense</i>
AM267278.1	<i>Anemone nemorosa</i> plastid partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 26S rRNA gene, isolate 1	0,83	0,64	497	<i>Anemone nemorosa</i>

4 DISKUZE

4.1 Přežívání a vývoj jedinců druhu *Melampyrum pratense* v průběhu vegetační sezóny

Sledované rostliny většinou úspěšně přeživaly v průběhu celé vegetační sezóny. Na konci pozorování v srpnu byla na obou plochách stále naživu nadpoloviční většina rostlin. Mortalita byla soustředěna především do dvou fází, z nichž první nastala před začátkem kvetení (tj. mezi květnovým a červnovým odběrem) a ke konci sezóny v srpnu. Vzhledem k pozorované vysoké produkci semen a v dlouhodobém hledisku předpokládané stabilní populační četnosti (s náhodnými výkyvy mezi jednotlivými sezónami), je pravděpodobné, že kritickým bodem životního cyklu *Melampyrum pratense* je klíčení, stadium semenáče a napojování na hostitele. Podrobné demografické studium rostlin v tomto stádiu je však velmi obtížné, vzhledem k tomu, že se nacházejí na povrchu půdy pod opadem a jejich nedestruktivní pozorování bylo velmi obtížné.

Průběh životního cyklu sledovaných rostlin byl na obou vybraných plochách víceméně podobný. Na začátku sezóny ještě nebyly zaznamenané výrazné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými rostlinami v populaci. Malé rozdíly by mohly souviset s rozdílnou dobou vyklíčení (tj. objevení se zelených děloh nad zemí). Rostliny jinak začínají klíčit již na podzim a zimní období přežívají ve stavu naklíčeného semene s vyvinutým kořenem (Smith 1963, Eliáš 1986). Rostliny, které vyklíčily byť i jen o několik dní dřív, mohly také stihnout vytvořit i víc listů, jak bylo zaznamenáno v dubnovém odběru. To však lze pouze předpokládat, protože v této práci jsem začátek objevování se semenáčků na plochách nezkoumala. Eliáš (1986), který tento druh sledoval, uvádí, že první semenáčky se začínají postupně objevovat na přelomu března a dubna.

Červencová maxima zaznamenané vegetativní biomasy odpovídají vrcholu vegetační sezóny. Zaznamenaná hmotnost vegetativní biomasy do konce srpna poklesla, u některých rostlin velmi výrazně. Tento pokles hmotnosti biomasy byl ovlivněný nejen přirozeným opadem listů, ale i okusem zvěří. Rostliny tedy po podzimním klíčení a přezimování ve stadiu bezprýtového semenáčku s vyvinutým kořenem procházejí nadzemní vegetativní fází dlouhou cca 2,5 měsíce (polovina dubna - konec června) po níž následuje fáze generativní reprodukce (červenec, srpen), zprvu ještě spojená s vegetativním růstem, který však v srpnu víceméně ustává.

S postupující sezónou a růstem rostlin se rozdíly v produkci vegetativní biomasy mezi jedinci výrazně zvětšovaly. Tato variabilita byla zaznamenána ve všech sledovaných

souborech rostlin a úzce souvisela s morfologií, především s počtem větví. Zásadní roli zřejmě hraje různá kvantita a kvalita napojení na hostitele, identita hostitelského druhu a s tím spojená schopnost získávat živiny, což jsou parametry, které mají zásadní vliv na růst poloparazitických rostlin (Keith et al. 2004, Cameron et al. 2006). Lze očekávat, že vzájemná parazitace mezi rostlinami *Melampyrum pratense* může též významně přispívat k rozdílům v růstu, podobně jako u druhu *Rhinanthus major* (Prati et al. 1997). Pravděpodobnou příčinou pozorovaných rozdílů v růstu rostlin může být nerovnoměrnost rozložení podmínek prostředí na stanovišti. Jistý vliv může mít např. i různá frekvence osvětlení rostlin světelnými skvrnami (Messier et al. 1998).

4.2 Souvislost mezi morfologickými charakteristikami, produkcí biomasy a investicemi do generativní reprodukce

Velikost rostliny během reprodukční sezóny (červenec-srpen), tj. množství vyprodukované biomasy závislé v té době především na počtu větví, bylo potvrzeno jako klíčová proměnná s největším vlivem na velikost investice rostlin do produkce květů a následně plodů. To demonstruje důležitost počáteční investice energie do tvorby biomasy vegetativních částí, hlavně větví. Čím více větví různých řádů totiž rostlina vytvoří, tím má nejen větší fotosynteticky aktivní plochu (díky většímu množství listů), ale také má k dispozici více nodů v květenství pro tvorbu květů a plodů.

Vztah mezi počtem větví a biomasou vyprodukovanou v druhé polovině vegetační sezóny dobře ilustruje mechanismus sezónní variability, která rostlinám umožňuje optimalizovat využití celé délky vegetační sezóny na dané lokalitě (Těšitel 2005, Štech 1998). Přirůstání větví zahájené koncem května se pozitivně projevuje na produkci biomasy v červnu a červenci a zprostředkovaně na investici do generativní biomasy teprve v červenci a srpnu.

Určitý vliv na maximální investici do reprodukce mělo to, když rostlina vykvetla co nejdříve, tedy v červnu. Ačkoliv byla takto hodnocená časnost kvetení sama o sobě neprůkazná, její vliv se projevil po odečtu vlivu biomasy vytvořené v srpnu a přežívání do konce srpna. Tento výsledek naznačuje existenci *trade-off* mezi časným kvetením a maximalizací reprodukční úspěšnosti i uvnitř populací. Rostliny s časným počátkem reprodukce produkují v průměru o něco málo větší generativní biomasu, ovšem u později vykvétajících rostlin byla zaznamenána větší variabilita v investici do generativní biomasy. Mimořádně úspěšné rostliny na lokalitě v Mokřém ukazují, že reprodukční úspěch později vykvetlých rostlin může až několikrát převýšit hodnoty pozorované u časně rozkvetlých rostlin (Obr 3.9). Těchto několik jedinců patřilo i v červenci k rostlinám s průměrnou investicí

do reprodukce a jejich úspěšnost je založená na produkci semen během srpna. Taková situace by tedy byla analogická rozdílům pozorovaným mezi populacemi a zapříčiněnými sezónní variabilitou (Těšitel & Štech 2007).

Všechny tyto mimořádně úspěšné rostliny však měly ukousnutý hlavní vegetační vrchol, z toho 2 celkově nejúspěšnější rostliny byly ukousnuté již v červnu, další dvě v červenci a poslední z úspěšných rostlin v srpnu. Nabízí se zde vysvětlení, že vzhledem k okusu hlavního vegetačního vrcholu došlo k potlačení jeho apikální dominance a následné reakci označované jako *overcompensation* (Agraval 2000). Tuto myšlenku by podporovalo i pozorované mohutnější větvení těchto rostlin do 2. řádu a tudíž větší prostor pro květy a následně plody. Tento závěr si však odporuje s výsledky manipulativního experimentu, ve kterém autoři (Lehtilä & Syrjänen 1995) srovnávali kompenzační odpověď na poškození hlavního vegetačního vrcholu u *Melampyrum pratense* a *M. sylvaticum*. Jejich výsledky ukázaly, že po takovémto poškození *M. pratense* produkuje na postranních větvích méně plodů než rostliny nepoškozené. *M. sylvaticum* reagovalo na takovéto poškození lépe, ale záviselo to na načasování poškození hlavního stonku.

4.3 Vliv hustoty populace na přežívání, množství vyprodukované biomasy a investice do generativní reprodukce

Průměrný počet odebraných rostlin na čtverec v experimentu 2 nejprve vzrostl mezi dubnovým a květnovým odběrem, což lze připsat vyklíčení nových semenáčů po provedení dubnového odběru. Počty rostlin následně klesaly v intervalu květen až srpen a Loydův index měl klesající tendenci víceméně v průběhu celé vegetační sezóny. Tyto výsledky ukazují, že v populaci docházelo k mortalitě a rozmístění jedinců v prostoru se s časem postupně měnilo od shlukovitěho k pravidelnému. Takový průběh lze připsat vlivu vnitrodruhové kompetice mezi rostlinami, která způsobuje nenáhodnou mortalitu v populacích (Lepš 1996, Begon et al. 1997). K samozreďování populace pak dochází během růstu bočních větví, při němž rostliny zatlačí méně úspěšné jedince, což pro ně má fatální následky. Podobný efekt může mít i vzájemná parazitace mezi rostlinami *M. pratense*. Tyto závěry podporuje i průběh mortality pozorovaný na úrovni individuí v experimentu 1, kde se nejvyšší zaznamenané počty nově uhynulých rostlin časově shodují s nejvýraznějšími poklesy Loydova indexu (interval květen-červen a červenec-srpen).

Hustota jedinců v populaci neměla průkazně negativní vliv na investici do produkce vegetativní biomasy ani investici do generativní reprodukce; s počtem jedinců ve čtverci rostla jak hmotnost vegetativní, tak reprodukční biomasy. Charakter závislosti odpovídající

přímé úměrnosti představuje indicii naznačující spíše omezený vliv hustoty populace na růst jednotlivých individuí rostlin.

Hustota populace ve studované populaci měla tedy vliv na mortalitu jedinců, nikoliv však na jejich růst. Obdobnou závislost pozorovali Mudrák & Lepš (2010) u poloparazitického druhu *Rhinanthus minor*. Naopak Winkler & Heineken (2007) pozorovali výraznou hustotní závislost v produkci semen *Melampyrum pratense*. Počty rostlin v ploše 25×25 cm na konci vegetační sezóny však dosahovaly v tomto experimentu běžně hodnot až 10 jedinců (max. > 30), což je zcela nesrovnatelné s populací, kterou jsem studovala já. Je zřetelné, že obě studované populace se musely výrazně lišit morfologicky a charakterem růstu rostlin. I přesto, že ze srovnání dvou populací nelze vyvozovat žádné definitivní závěry, zdá se pravděpodobné, že vnitrodruhová kompetice může působit velmi odlišným způsobem (zvýšení mortality vs. potlačení růstu/úspěšnosti generativní reprodukce) na různé populace *M. pratense* i jiných poloparazitických rostlin.

4.4 Vnější faktory ovlivňující studovanou populaci

Významným faktorem, který v nezanedbatelné míře ovlivňoval vegetativní i reprodukční biomasu studované populace, byl okus zvěří. Často jsem pozorovala spolu s vegetačním vrcholem okousané i celé větve rostlin. Zajímavá byla nepravidelnost okusu na mnou sledovaných plochách, tj. to, že herbivor si vybíral spíše jednotlivé rostliny ze skupinky, než že by při jedné návštěvě okousal najednou celou skupinku blízko u sebe rostoucích rostlin. Okus rostlin většinou neměl pro rostliny letální následky a na většině ukousnutých rostlin byly při posledním odběru vytvořeny alespoň nějaké plody.

Dalším faktorem ovlivňujícím populaci byla mortalita rostlin. Část této mortality by bylo možné vysvětlit okusem zvěří. Nelze tak asi vysvětlit veškerou mortalitu. Některé rostliny uhynuly, aniž by byly okousané. V tomto případě by se mohlo také jednat o mortalitu způsobenou například poškozením mladých rostlin při značení na začátku sledování. Nebo také hledat příčiny jinde, například v napadení houbovými parazity (Kaitera & Nuorteva 2003a, b). Pátrání po těchto dalších příčinách by však již bylo mimo rámec této práce.

Existují práce (např. Eliáš 1986, Heineken 2004), kde autoři popisují také výrazný vliv klimatických podmínek na populační hustotu druhu *M. pratense* rostoucího v sušších biotopech. Za velmi suchého a horkého léta se tento druh nedokázal vyrovnat se stávajícími stresovými podmínkami a výrazně se tím zredukovala jak populační hustota, tak produkce semen přeživších rostlin. To se ale netýká sledovaných populací v této práci, vzhledem

k vlhčímu biotopu a příznivým vlhkostním a teplotním podmínkám roku 2009 (tab. 2). Tento rok byl totiž celkově srážkově nadprůměrný. Jenom v měsíci červnu činil úhrn srážek přibližně dvojnásobek dlouhodobého průměru. Existuje tady ale možnost, že případné extrémní horko a sucho na těchto lokalitách by mohlo i tyto populace negativně ovlivnit.

4.5 Identita hostitelských druhů

I přesto, že jsem v této části práce bohužel nedospěla k očekávaným odpovědím ohledně vlivu hostitele na růst rostlin, podařilo se identifikovat několik hostitelských rostlin a částečně tak potvrdit všeobecně předpokládanou hostitelskou vazbu *M. pratense*. Většina rostlin byla napojena na *Quercus robur*, což je jeden z tradičně udávaných hostitelů (Smith 1963, Štech 2000). Zajímavé jsou potom výsledky naznačující parazitaci *M. pratense* na jedincích téhož druhu. V tomto případě se těžko zcela vylučuje možnost kontaminace, nicméně tento jev je u poloparazitických rostlin znám (Prati et al. 1997).

Použitý úsek ITS je sice výhodný z hlediska rozlišení rostlinných druhů a univerzálnosti použitých primerů specifických pro rostliny, avšak jeho amplifikace je problematická v případě degradace DNA. Vzhledem k tomu, že často nebylo možné získat dostatečně velký fragment kořene hostitele, byla koncentrace vyizolované DNA spíše nízká. Velké množství buněk v kořenech hostitelů bylo pravděpodobně již mrtvých a jejich DNA tak byla degradovaná. Tyto problémy by alespoň v případě některých vzorků mohlo pomoci vyřešit využití amplifikace chloroplastové DNA, např. intronu *trnL*, který se snadno amplifikuje i z částečně degradované DNA a je stále dostatečně variabilní, minimálně na rodové úrovni (Taberlet et al. 2007). Vzhledem k tomu, že na studované lokalitě se nevyskytují příbuzné druhy z jednoho druhu (tab. 2), nepředstavovala by nižší variabilita tohoto markeru oproti ITS velké omezení. Odhalování identity hostitele, na kterého je *Melampyrum*, ale i další poloparazitické rostliny napojeny pomocí metody *DNA barcoding* je jistě velice zajímavým i atraktivním poznáváním tajemného, před našimi zraky ukrytého, podzemního života rostlin.

5 ZÁVĚR

Podařilo se zdokumentovat vývoj sledovaných rostlin od juvenilního stádia až po reprodukční. Zvolený metodický přístup se ukázal jako velmi efektivní nástroj k realistickému popisu úspěšnosti generativní reprodukce *Melampyrum pratense* a jejích příčin, což je klíčový parametr populační dynamiky tohoto jednoletého druhu. Pro další plánované studium populací (ekofyziologie, vliv abiotických podmínek prostředí) je významný už i samotný úspěch sběru dat a tedy ověření, že na studovaných lokalitách lze provádět pokusy založené na trvalém značení rostlin a nehrozí příliš vysoké riziko zničení kolemjdoucími obyvateli okolních sídel.

Co se týče reprodukční úspěšnosti rostlin, byl potvrzen vztah mezi produkcí potomstva a architekturou jedinců. Architektura rostlin však určuje pouze reprodukční potenciál, který se ale v mnoha případech nepodaří naplnit. Na reprodukční úspěšnost působí architektura nepřímě přes množství vyprodukované vegetativní biomasy, která představuje nejlepší prediktor velikosti investice do reprodukce.

Podařilo se ukázat, že populace jsou ovlivněny hustotní závislostí, jejíž mechanismus spočívá ve zvýšení mortality, nikoliv redukcí růstu jednotlivých rostlin. Jako významný biotický faktor ovlivňující populace se jeví okus zvěří, který ale, jak se zdá, nemá pro rostliny fatální následky.

Identifikace hostitelů nebyla příliš úspěšná. Získané výsledky potvrdily očekávané asociace především s dřevinami. Ukázaly i možnost vnitrodruhové parazitace, kterou je však třeba dále ověřit a případně kvantifikovat. V případě úspěchu takového ověření by bylo velmi zajímavé blíže studovat roli vzájemné parazitace na vztahy mezi rostlinami v populacích poloparazitických druhů.

6 LITERATURA

- Agrawal A. A. (2000): Overcompensation of plants in response to herbivory and the by-product benefits of mutualism. – *Trend in Plant Science Perspectives* 5: 309–313.
- Atsatt P. R. & Strong D. R. (1970): The population biology of annual grassland hemiparasites. 1. The host environment. – *Evolution* 24: 278–291.
- Begon M., Harper J. L., & Townsend C. R. (1997): *Ekologie: jedinci, populace a společenstva*. – Vydavatelství university Palackého, Olomouc.
- Bennett J. R. & Mathews S. (2006): Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from phytochrome A. – *American Journal of Botany*. 93: 1039–1051.
- Cameron D. D., Coast A. M. & Seel W. E. (2006): Differential resistance among host and non-host species underlies the variable success of the hemi-parasitic plant *Rhinanthus minor*. – *Annals of Botany* 98: 1289–1299.
- Cameron D. D., White A. & Antonovics J. (2009): Parasite-grass-forb interactions and rock-paper-scissor dynamics: predicting the effects of the parasitic plant *Rhinanthus minor* on host plant communities. – *Journal of Ecology* 97: 1311–1319.
- Cantlon J. E., Curtis E. J. C. & Malcolm W. M. (1963): Studies of *Melampyrum lineare*. – *Ecology* 44: 466–474.
- Davies D. M. & Graves J. D. (2000). The impact of phosphorus on interactions of the hemiparasitic angiosperm *Rhinanthus minor* and its host *Lolium perenne*. – *Oecologia* 124: 100–106.
- Dalrymple S. E. (2007): Biological flora of the British Isles: *Melampyrum sylvaticum* L. – *Journal of Ecology* 95: 583–597.
- Eliáš P. (1986): Effects of drought on population dynamics of *Melampyrum pratense* L. – *Biológia* 41: 57–68.
- Gibson C. C. & Watkinson A. R. (1989): The host range and selectivity of a parasitic plant: *Rhinanthus minor* L. – *Oecologia* 78:401–06.
- Govier R. N., Nelson M. D. & Pate J. S. (1967): Hemiparasitic nutrition in angiosperms I. The transfer of organic compounds from host to *Odontites verna* (Bell.) Dum.(Scrophulariaceae). – *New Phytologist* 66:285–297.
- Hartl D. (1974): *Melampyrum* L. – In: Hartl D. & Wagenitz G. (eds), *Gustav Hegi Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Ed. 2, 6/1: 403–451, Carl Hanser, München.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. & deWaard J. R (2003): Biological identifications through DNA barcodes. – *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270: 313– 321.
- Heinken T. (2004): Migration of an annual myrmecochore: a four year experiment with *Melampyrum pratense* L. – *Plant ecology* 170: 55–72.
- Irving L. J. & Cameron D. D. (2009): You are what you eat. – *Advances in Botanical Research* 50: 88–138.
- Jackson R. B., Moore L. A., Hoffmann W. A., Pockman W. T. & Linder C. R. (1999): Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA. – *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 11387–11392.
- Kaitera J. & Nuorteva H. (2003a): *Cronartium flaccidum* produces uredinia and telia on *Melampyrum nemorosum* and on Finnish *Vincetoxicum hirundinaria*. – *Forest Pathology* 33: 205–213.
- Kaitera J. & Nuorteva H. (2003b): Relative Susceptibility of Four *Melampyrum* Species to *Cronartium flaccidum*. – *Scandinavian Journal of. Forest Research* 18: 499–504.
- Karlsson T. (1976): *Euphrasia* in Sweden: hybridization, parallelism and species concept. –

- Botaniska Notiser 129: 49–60.
- Keith A. M., Cameron D. D. & Seel W. E. (2004): Spatial interactions between the hemiparasitic angiosperm *Rhinanthus minor* and its host are species-specific. – *Functional Ecology* 18: 435–442.
- Klimešová J. & Klimeš L. Clo-Pla3 – database of clonal growth of plants from Central Europe. [URL: <http://clopla.butbn.cas.cz/>]
- Kress W. J., Wurdack K. J., Zimmer E. A., Weigt L. A. & Janzen D. H. (2005): Use of DNA barcodes to identify flowering plants. – *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 8369–8374.
- Lehtilä K., & Syrjänen K. (1995): Compensatory responses of two *Melampyrum* species after damage. – *Functional Ecology* 9: 511–517.
- Lepš J. (1996): Biostatistika. – Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Matthies D. (1995): Parasitic and competitive interactions between the hemiparasites *Rhinanthus serotinus* and *Odontites rubra* and their host *Medicago sativa*. – *Journal of Ecology* 83: 245–251.
- Messier C., Parent S. & Bergeron Y. (1998): Effects of overstory and understory vegetation on the understory light environment in mixed boreal forests. – *Journal of Vegetation Science* 9: 511–520.
- Meusel H., Jäger E., Rauschert S. & Weinert E. (1978): Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora, vol. 2. – Jena.
- Mudrák O. & Lepš J. (2010): Interactions of the hemiparasitic species *Rhinanthus minor* L. with its host plant community at two nutrient levels. – *Folia geobotanica*, *in press*.
- Neal D. (2004): Introduction to population biology. – Cambridge University Press, Cambridge
- Prati D., Matthies D. & Schmid B. (1997): Reciprocal parasitism in *Rhinanthus serotinus*: a model system of physiological interaction in clonal plants. – *Oikos* 78: 221–229.
- Press M. C. (1989): Autotrophy and heterotrophy in root hemiparasites. – *Trends in Ecology and Evolution* 4: 258–263.
- Press M. C., Shah N., Tuohy J. M. & Stewart G. R. (1987): Carbon isotope ratios demonstrate carbon flux from C₄ host to C₃ parasite. – *Plant Physiology* 85: 1143–1145.
- R Development Core Team (2009): R: A language and environment for statistical computing. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [URL: <http://www.r-project.org/>]
- Rümer S., Cameron D. D., Wacker R., Hartung W. & Jiang F. (2007). Anatomical study of the haustoria of *Rhinanthus minor* attached to roots of different hosts. – *Flora* 202: 194–200.
- Selosse M. A., Bauer R. & Moyersoen B. (2002): Basal hymenomycetes belonging to the *Sebacinaceae* are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. – *New Phytologist* 155: 183–195.
- Slavíková J. (1986): Ekologie rostlin. – SPN, Praha.
- Slavíková Z. (2002): Morfologie rostlin. – Karolinum, Praha.
- Smith D. (2000): The population dynamics and community ecology of root hemiparasitic plants. – *American Naturalist* 155: 13–23.
- Smith A. J. E. (1963): Variation in *Melampyrum pratense* L. – *Watsonia* 5: 336–337.
- Svensson B. M., Seel W. E., Nilsson, C. H. & Carlsson B. A. (2001): Roles played by timing of seedling development and host identity in determining fitness of an annual, subarctic, hemiparasitic plant. – *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 33: 299–305.
- StatSoft Inc. (2010): STATISTICA (data analysis software system), version 9.1. [URL: www.statsoft.com]

- Štech M. (1996): Variabilita sezónních znaků ve vybraných populacích *Melampyrum pratense*. – *Silva Gabreta* 1: 123–128.
- Štech M. (1998): Variabilita vybraných znaků druhů sekce *Laxiflora* (Wettstein) Soó 1927 a revize rodu *Melampyrum* L. v České republice. – 222 p., ms. [Disert. pr., Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice].
- Štech M. (2000): *Melampyrum* L. – In Slavík B. (ed.) : Květena ČR 6: 412–429, Academia, Praha.
- Štech M. (2000): Seasonal variation in *Melampyrum nemorosum*. – *Preslia* 72: 345–368.
- Sterneck J. v. (1901): Monographie der Gattung *Alectorophus*. – *Abh. Zool.-Bot. Ges. Wien*, 1(2): 1–150.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F. et al. (2007): Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. – *Nucleic Acids Research* 35: e14.
- Těšitel J. (2005): Variabilita *Melampyrum sylvaticum* agg. v části Střední Evropy. –49 p., Bc. práce, Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Těšitel J. & Štech M. (2007): Ecological and evolutionary aspects of the seasonal variation in *Melampyrum* (*Orobanchaceae*), – In: Abstract book, 11th Congress, 20.–25. August 2007, Uppsala, Sweden: pp. 96.
- Těšitel J., Plavcová L. & Cameron D. D. (2010): Heterotrophic carbon gain by the root hemiparasites, *Rhinanthus minor* and *Euphrasia rostkoviana* (*Orobanchaceae*). – *Planta* 231:1137–1144.
- Valentini A., Pompanon F. & Taberlet P. (2008): DNA barcoding for ecologists. – *Trends in ecology and evolution* 24:110–117.
- van Hulst R., Shipley B. & Trériault A. (1987): Why is *Rhinanthus minor* (*Scrophulariaceae*) such a good invader? – *Canadian Journal of Botany* 11: 2373–2379.
- White T., Burns T., Lee S. & Taylor J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J. (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*, p. 315–322, Academic Press, San Diego.
- Winkler E. & Heineken T. (2007): Spread of an ant-dispersed annual herb: An individual-based simulation study on population development of *Melampyrum pratense* L. – *Ecological modelling* 203: 424–438.
- Wolfe A., Randle C. P., Liu L. & Steiner K. E. (2005): Phylogeny and biogeography of *Orobanchaceae*. – *Folia Geobotanica* 40: 115–134.
- Zopfi H. J. (1995): Life history, variation and infraspecific heterochrony in *Rhinanthus glacialis* (*Scrophulariaceae*). – *Plant Systematics and Evolution* 198: 209–233.
- Zopfi H. J. (1998): Life-history variation among populations of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (*Scrophulariaceae*) in relation to grassland management. – *Biological Journal of the Linnean Society* 64: 179–205.

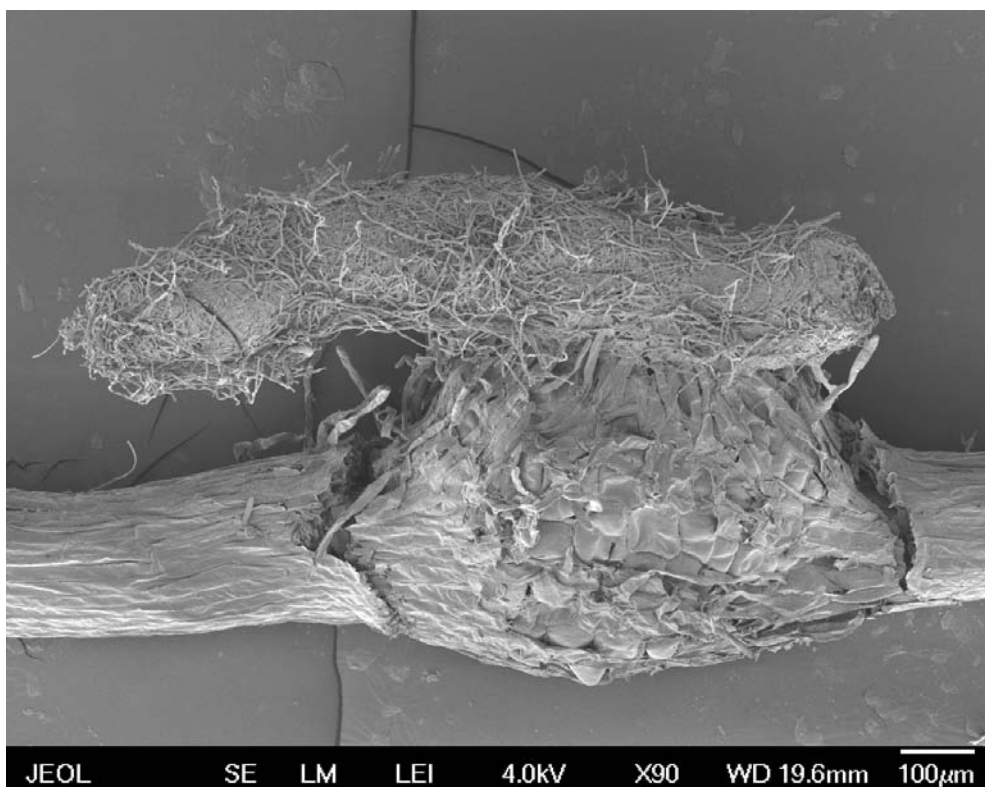
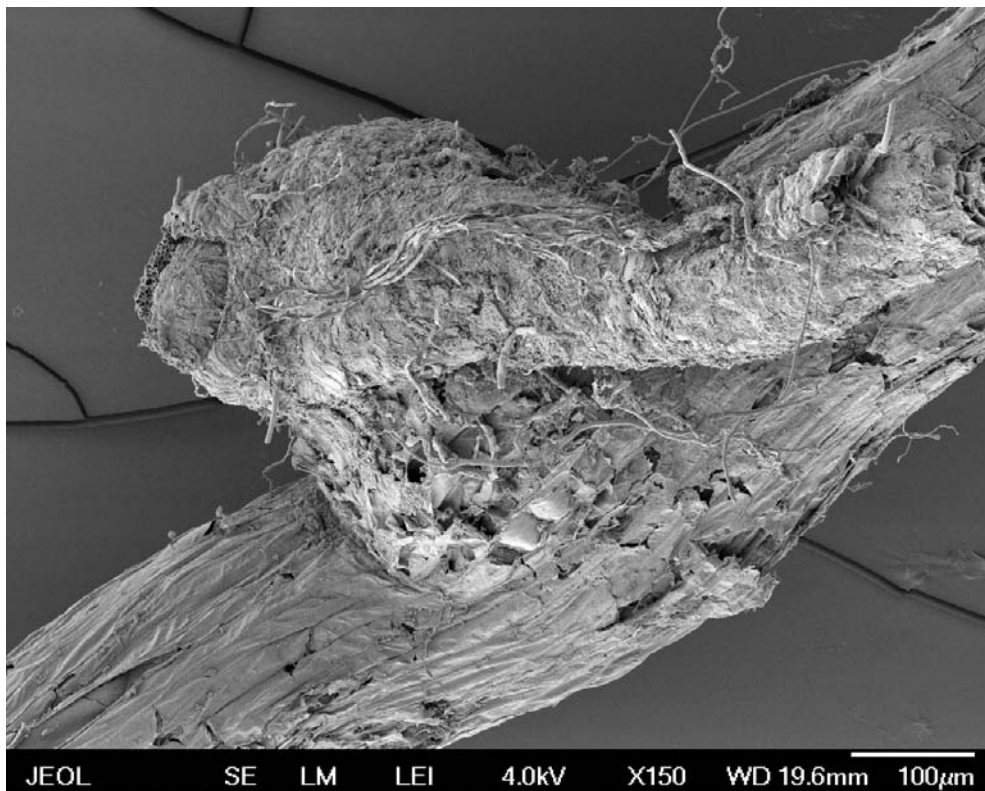
7 FOTOGRAFICKÁ PŘÍLOHA



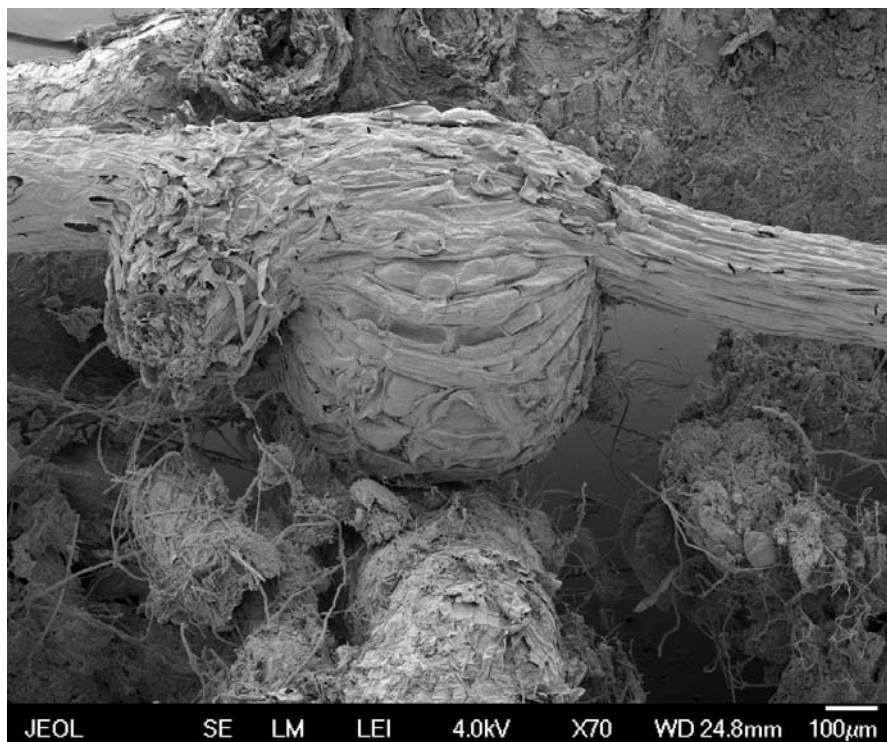
Značení sledovaných rostlin a značení plošek v experimentu 1 (23. dubna a 29. července 2009).



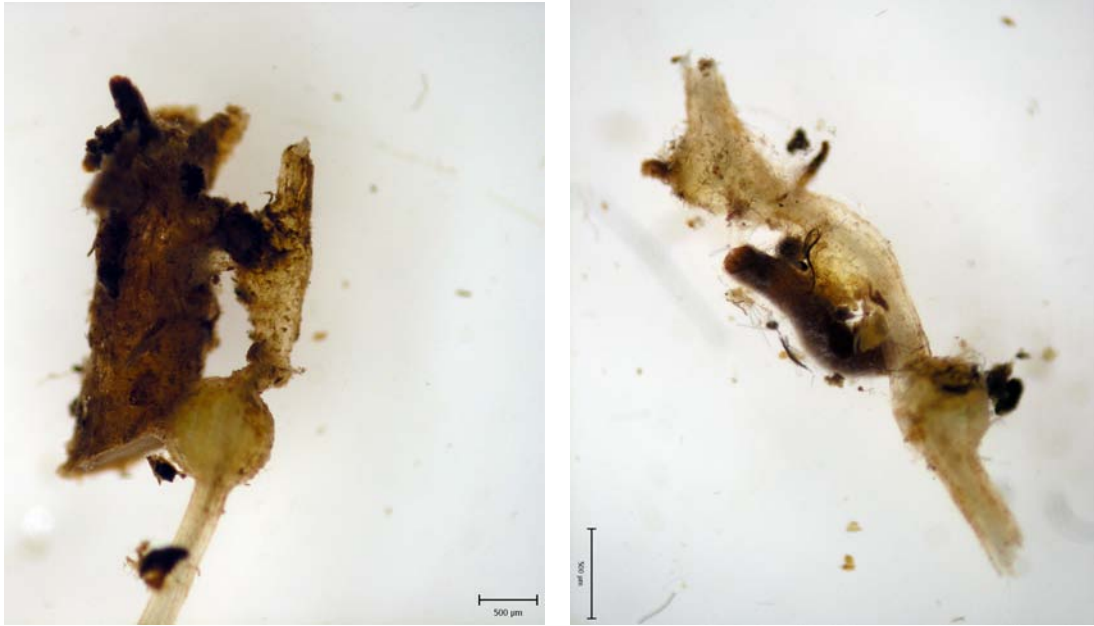
Experiment 2, souřadnicová síť pro odběry rostlin za použití odběrových čtverců 30×30 cm (29. července 2009).



Detaily haustorií druhu *Melampyrum pratense*, snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu.



Detaily haustorií druhu *Melampyrum pratense*, snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu.



Detaily připojení druhu *Melampyrum pratense* na hostitele, snímek z binokulárního mikroskopu