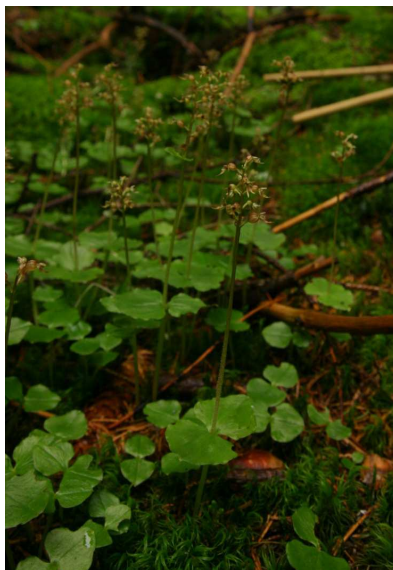


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Průběh klíčení a mykorrhizní asociace dvou
druhů rodu *Neottia***

Diplomová práce



Bc. Milan Kotlínek

Školitel: RNDr. Jana Jersáková, PhD.

Konzultant: RNDr. Tamara Těšitelová

České Budějovice 2012

Kotlínek, M., 2012. Průběh klíčení a mykorhizní asociace dvou druhů rodu *Neottia*. [Germination course and mycorrhizal association of two *Neottia* species. Mgr. Thesis, in Czech]. – 30p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Germination course and mycorrhizal partners during germination and adulthood were studied in *Neottia ovata* and *N. cordata*. *Neottia ovata* was studied in two different biotops: meadows and forests. Research was conducted in *in situ* conditions in the Šumava and the Smrčiny mountains.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu 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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14.12.2012

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří mi pomáhali při studiu mykorhizy a bez jejichž pomoci by tato práce nikdy nevznikla. V první řadě děkuji své školitelce Janě Jersákové, která mi umožnila studium orchidejí, za její úžasný přístup a za rady, které mi usnadnily bádání. Konzultantce Tamaře Těšitelové děkuji za pomoc s řešením všech možných i nemožných problémů a bezmeznou trpělivost během spolupráce v terénu i v laboratoři. Tamaře také patří velký dík za pomoc se statickým vyhodnocením v programu R. Oběma také musím poděkovat za pomoc při sepisování této práce, kdy byly ochotné číst mé výplody a opravovat opakující se gramatické chyby.

Také bych chtěl poděkovat Jítě a Babce za korekci pravopisu, množství rad a jejich poťouchlé nápady, kterými mě vždycky pobaví. Také děkuji svojí mamince za podporu a neustálé zásobování chutnými pokrmy.

Dále bych chtěl poděkovat Davidu Půbalovi z CHKO Šumava a Ivě Bufkové z NP Šumava za pomoc při vyhledávání vhodných lokalit pro výzkum, Báře a Françoisovi za pomoc při zpracování vzorků v laboratoři a Jirkovi za dobré rady a ochotu vždy pomoci.

Nesmím také zapomenout na naši Škodou 1203 WRC s pohonem na plyn, jež mě vždy dovezla na lokality i zpět. A to i přes své stáří a občasný nedostatek pochopení pracovníků NP Šumava pro ‚veterány‘.

V neposlední řadě také děkuji NP a CHKO Šumava za umožnění výzkumu na jejich území a za ubytování na správě NP v Kašperských Horách a GA AV ČR č.IAA600870802 za financování projektu, jehož součástí je i má diplomová práce.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1.	Orchideoidní mykorhiza.....	1
1.2.	Houboví partneři.....	3
1.3.	Ekologie klíčení orchidejí.....	4
1.4.	Vliv biotopu a genotypu na orchideoidní mykorhizu.....	6
1.5.	Ekologie a mykorhizní asociace studovaných druhů.....	6
1.6.	Cíle práce.....	8
2.	Metodika.....	8
2.1.	Popis modelových druhů.....	8
2.2.	Popis lokalit.....	8
2.3.	Vysévací pokus.....	8
2.4.	Analýza symbiotických hub v protokormech.....	10
2.5.	Analýza symbiotických hub v kořenech dospělců.....	10
2.6.	Metody molekulární identifikace.....	11
2.7.	Statistická analýza dat.....	12
2.8.	Fylogenetická analýza dat.....	13
2.9.	TEM.....	14
3.	Výsledky.....	15
3.1.	Průběh klíčení.....	15
3.2.	Symbiotické houby v protokormech a kořenech dospělců.....	18
3.3.	TEM.....	24
4.	Diskuse.....	25
5.	Závěr.....	30
6.	Literatura.....	31
7.	Přílohy.....	39
8.	Fotopříloha.....	44

1. Úvod

Mykorhizní symbióza je důležitou součástí terestrických ekosystémů. Udává se, že více než 80 % druhů rostlin je schopno tvořit mykorhizu s půdními houbami (Wang a Qiu, 2006). V současnosti je rozlišováno několik typů mykorhizy na základě způsobu kontaktu mezi kořeny a houbou.

Pro ektomykorhizní symbiózu (ECM) je charakteristický hyfový plášť obalující špičky kořenů a tzv. Hartigova síť tvořená houbovými vlákny v mezibuněčných prostorech; hyfy však nepronikají do buněk. Pokud vlákna pronikají do buněk hostitelské rostliny, mluvíme již o endomykorhizní symbióze. Tu můžeme dále rozdělit na arbuskulární mykorhizu, erikoidní mykorhizu a orchideoidní mykorhizu (OM). Pro úplnost je třeba ještě vzpomenout ektendomykorhizu. Ta kombinuje znaky obou předchozích a můžeme ji dále rozdělit na mykorhizu arbutoidní, monotropoidní a pyroloidní (Gryndler a kol., 2004). Ze všech výše vyjmenovaných typů mykorhizy se dále budu zabývat převážně jen orchideoidní mykorhizou.

Běžnou mykorhizu můžeme popsat jako mutualistický vztah houby s autotrofní rostlinou, kdy rostlina od houby získává minerální látky a vodu a houbě předává část uhlíku získaného během fotosyntézy. Existují však výjimky. U přibližně 450 druhů rostlin náležejících do různých čeledí (Merckx a Freudenstein, 2010) bylo zjištěno, že od houby získávají i uhlík a stávají se tak parazity. Tento způsob výživy se nazývá mykoheterotrofie (MH) (Leake, 1994).

1.1. Orchideoidní mykorhiza

Tento typ mykorhizy je typický pro všechny druhy z čeledi Orchidaceae, u žádné další čeledi pozorován nebyl (Gryndler a kol., 2004). Čeleď Orchidaceae, s odhadovaným počtem druhů 20 000 až 35 000 (Dressler, 1993 a 2004; Malberley, 1997; Cribb a kol., 2003); je v současné době považována za největší čeleď vůbec (Cribb a kol., 2003; WCSP, 2012). Vývojově se jedná o izolovanou větev řádu Asparagales, která se oddělila před 76 až 84 mil. let (Ramírez a kol., 2007). Orchideje mají centrum rozšíření v tropech, ale můžeme je nalézt po celé zeměkouli až po boreální pásmo. Můžeme najít jak terestrické, tak i epifytické a litofytické růstové formy. Navzdory této rozmanitosti spojuje všechny orchideje jejich závislost na mykorhizních houbách během klíčení, kdy semena nejsou schopna klíčit bez přítomnosti vhodné symbiotické houby (např. Rasmussen, 1995; Gryndler a kol., 2004; Smith a Read, 2008). Další věcí, unikátní pro všechny orchideje, je útvar nazývaný protokorm. Jedná se o specifický klíčící útvar orchidejí a odpovídá hypokotylu a kořenovému základu u ostatních rostlin. Vzniká z embrya a později se diferencuje v jednotlivá pletiva.

Orchideoidní mykorrhiza byla poprvé popsána na počátku 20. století Bernardem (1909) a Burgeffem (1909). Jimi popsaná forma je nazývána tolypofágní. Později pak byla ještě popsána daleko vzácnější ptyofágní forma (Burgeff, 1932 a 1936), jež je zatím známa jen u několika nezelených tropických druhů orchidejí (Gryndler a kol., 2004). Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma typy je ve způsobu růstu hyf. Zatímco u ptyofágní formy prorůstají jednotlivé hyfy buňkami kořene, u tolypofágní formy hyfy uvnitř buněk kořene vytvářejí smotky či klubíčka zvané pelotony (Gryndler a kol., 2004).

Pelotony můžeme nalézt u všech vývojových stádií orchidejí, od začátku klíčení až do dospělosti. Slouží k přenosu živin mezi houbou a rostlinou. Po určité době pak dochází k lýzi pelotonů, která je považována za obranou reakci rostliny (Smith a Read, 2008). Předpokládá se, že tato lýze hraje roli ve výživě rostliny (Rasmussen a Whigham, 2002). Dosud však nebyla prokázána enzymatická aktivita rostlinných buněk během lýze hyf, takže je možná i autolýza hyf samotných (Gryndler a kol., 2004). Již velmi dlouho je známa přítomnost látek s fungicidními účinky v podzemních i nadzemních orgánech orchidejí (Bernard, 1911). Tyto látky ze skupiny fytoalexinů (např. orchinol a hircinol) slouží patrně k regulaci růstu houbových vláken v rostlinných buňkách (Rasmussen, 1995).

V průběhu růstu se může diametrálně měnit vztah orchidejí s jejich houbovými symbionty. Jelikož všechny orchideje mají miniaturní semena takřka bez zásobních látek, jsou při klíčení na mykorrhize zcela závislé – získávají od houby kromě minerálních látek i uhlík a dá se říci, že na houbě parazitují. Tento způsob výživy bývá někdy označován termínem počáteční mykoheterotrofie (initial MH). Závislost semenáčku na přísunu uhlíku od houby pak většinou končí po vyvinutí vlastního asimilačního aparátu a v dospělosti získávají orchideje od houby převážně minerální látky. U dospělých autotrofních rostlin se předpokládá i zpětný přenos uhlíkatých látek do houby (Cameron a kol., 2006 a 2008; Látalová a Baláz, 2010) a dá se tak již mluvit o klasické symbióze. Mezi orchidejemi však najdeme i druhy s absencí chlorofylu, jež řadíme k výše popsaným MH rostlinám (Leake, 1994). Z celkem 450 druhů vyšších rostlin, u nichž byla dosud popsána plná MH, jich 210 patří mezi orchideje a dá se mezi nimi vystopovat minimálně 30 na sobě nezávislých přechodů od autotrofie (AO) k MH (Merckx a Freudenstein, 2010).

Před několika lety byl u čeledí Orchidaceae a Pyrolaceae popsán i mezistupeň mezi AO a MH nazývaný mixotrofie (MX), nebo také částečná mykoheterotrofie (partial mycoheterotrophy; Gebauer a Meyer, 2003; Bidartodo a kol., 2004; Selosse a kol., 2004). Tyto rostliny, ačkoli jsou zelené a fotosynteticky aktivní, získávají část uhlíku od svého mykorrhizního symbionta i v dospělosti. Většinou se jedná o rostliny s nedostatkem chlorofylu

či rostoucí na stanovištích s nedostatkem světla. Množství získaných živin pak nepřímo koreluje s množstvím chlorofylu v listech (Stöckel a kol., 2011). U MX rostlin náležejících do čeledi Ericaceae (tribus Pyroleae) byla dále zjištěna nepřímá korelace mezi množstvím dopadajícího slunečního záření a množstvím živin získaných od mykorrhizního partnera (Hynson a kol., 2012; Matsuda a kol., 2012). Tento vztah se tak dá předpokládat i u MX rostlin z čeledi Orchidaceae.

Velká část MX a MH rostlin je vázána na ECM houby, které jim předávají uhlíkaté sloučeniny získané z okolních stromů (Bruns, 1995; McKendrick a kol., 2000a; Bidartondo, 2005; Selosse a Roy, 2009; Kennedy a kol., 2011; Liebel a Gebauer, 2011). Tento vztah se někdy nazývá epiparazitismus (Björkman, 1960). Vazba na ECM houby však není podmínkou, zvláště u tropických či australských druhů MH a MX orchidejí bývá častá vazba na saprotrofické druhy hub (Martos a kol., 2009; Ogura-Tsujita a kol., 2009; Dearnaley a Bougoure, 2010; Girlanda a kol., 2011; Sommer a kol., 2012).

1.2. Houboví partneři

Většina AO a některé MH orchideje se pojí s druhy hub z polyfyletické skupiny ‚rhizoctonia‘ patřící mezi Basidiomycota. Tato skupina byla popsána na základě anamorfních stádií, která byla kultivována a umožnila rozdělit skupinu do několika rodů. Z nich se s orchidejemi pojí rody *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* a *Moniliopsis* (Rasmussen, 1995; Gryndler a kol., 2004; McCormick a kol., 2004). Po vyvinutí nového způsobu kultivace se podařilo vyprovokovat tvorbu teleomorfních stádií, která byla nově pojmenována jako *Tulasnella* (anamorfa *Epulorhiza*), *Sebacina* (anamorfa *Epulorhiza*), *Ceratobasidium* (anamorfa *Ceratorhiza*), *Thanatephorus* (anamorfa *Moniliopsis*) a *Waitea* (anamorfa *Moniliopsis*) (Gryndler a kol., 2004; McCormick a kol., 2004). V současné době se pro identifikaci symbiotických hub používají převážně molekulární metody. Ty umožnily zjistit fylogenetickou pozici výše popsaných rodů uvnitř oddělení Basidiomycota a ukázaly polyfylii skupiny ‚rhizoctonia‘, přičemž rody *Ceratobasidium*, *Waitea* a *Thanatephorus* (čeleď Ceratobasidiaceae) a *Tulasnella* (Tulasnellaceae) se řadí do řádu Cantharellales, kdežto rod *Sebacina* (Sebacinaceae) se řadí do řádu Sebaciniales (Taylor a kol., 2002).

Do čeledí Tulasnellaceae a Ceratobasidiaceae řadíme převážně saprotrofní druhy hub, které jen vzácně tvoří ECM (Bidartondo a kol., 2003; Bougoure a kol., 2009). Druhy náležící do těchto čeledí patří mezi nejhojnější symbionty orchidejí (Dearnaley, 2007; Otero a kol., 2007) a pojí se s nimi převážně epifytické druhy orchidejí a terestrické druhy z lučních biotopů.

Čeď Sebacinaceae je ekologicky rozmanitější. Na základě molekulárních analýz se dělí na dvě základní skupiny A a B, navzájem se lišící ekologií (Weiss a kol., 2004). Skupina A byla izolována jak z MH (McKendrick a kol., 2002; Selosse a kol., 2002; Taylor a kol., 2003; Okayama a kol., 2012) a MX druhů orchidejí (Selosse a kol., 2004; Julou a kol., 2005), tak i z ECM špiček různých dřevin (Selosse a kol., 2002; Urban a kol., 2002; Avis a kol., 2003; Moyersoen, 2006; Tedersoo a kol., 2006). Skupina B je pak tvořena saprotrofními druhy hub vytvářejícími OM s autotrofními druhy orchidejí (Weiss a kol., 2004; Bougoure a kol., 2005; Girlanda a kol., 2011), erikoidní mykorhizu (Selosse a kol., 2007) či mykorhizu s některými druhy jatrovek (Kottke a kol., 2003). Obě dvě skupiny pak obsahují druhy známé jako kořenoví endofyti různých rostlin (Peškan-Berghöfe a kol., 2004; Selosse a kol., 2009). Kořenoví endofyti jsou považováni za plesiomorfni stav v řádu Sebacinales, z něhož se pak vyvinuly jednotlivé mykorhizní druhy (Selosse a kol., 2009).

Další častou skupinou orchideoidních hub jsou druhy tvořící ECM se stromy. Tyto houby jsou typické pro temperátní druhy MH a MX orchidejí, pro něž jsou jakýmsi prostředníkem při epiparazitismu na okolních stromech (Gardes, 2002). Z ECM druhů hub se OM účastní jak zástupci oddělení Basidiomycota (např. *Cortinarius* [Selosse a kol., 2004; Bidartondo a kol., 2004; Julou a kol., 2005], *Russula* [Girlanda a kol., 2006; Okayama a kol., 2012; Těšitelová a kol., 2012], *Lactarius* [Okayama a kol., 2012], *Tomentella* [Barrett a kol., 2010], *Inocybe* [Bidartondo a kol., 2004; Liebel a Gebauer, 2010; Těšitelová a kol., 2012], *Tremella*, [Bidartondo a kol., 2004], *Hebeloma* [Liebel a Gebauer, 2010], *Hymenogaster* [Bidartondo a kol., 2004; Těšitelová a kol., 2012]), tak i oddělení Ascomycota (např. *Tuber* [Selosse a kol., 2004; Bidartondo a kol., 2004; Těšitelová a kol., 2012], *Wilcoxina* [Ogura-Tsujita a Yukawa, 2008; Těšitelová a kol., 2012]).

U tropických druhů orchidejí bylo v současné době objeveno mnoho výjimek oproti relativně dobře prozkoumaným temperátním druhům orchidejí. U některých tropických asijských a afrických MH druhů orchidejí byla například potvrzena symbióza se saprotrofními druhy z čeledí Mycenaceae (Martos a kol., 2009; Ogura-Tsujita a kol., 2009), Meruliaceae (Martos a kol., 2009), Marasmiaceae (Dearnaley a Bougoure, 2010) a Physalacriaceae (Xu a kol., 1998). Některé jihoamerické epifytické druhy orchidejí se zase pojí s houbami z řádu Atractiellomycetes (Kottke a kol., 2010).

1.3. Ekologie klíčení orchidejí

Už Darwin (1862) se podívoval nad malým počtem semenáčků orchidejí vzhledem k obrovskému počtu semen produkovaných orchidejemi. Velké množství anemochorních

semen je vykoupeno jejich minimálními energetickými zásobami způsobujícími závislost klíčení na přítomnosti vhodné symbiotické houby a ukazuje se, že do dospělé rostliny se vyvine méně než 1% semen (Batty a kol., 2001). O rozšíření orchidejí v krajině tak nerozhodují jen ekologické nároky jednotlivých druhů, ale i nároky symbiotických hub, na něž jsou vázány. Zároveň však o těchto vztazích máme velmi omezené znalosti založené jen na několika málo pokusech, jež byly dělány na velmi malém počtu druhů.

Z celkové produkce semen se necelých 10% dostane na vhodné stanoviště a unikne predaci (Batty a kol., 2001). Následné klíčení má několik fází. U lučních druhů semeno nejprve prochází asymbiotickou fází, kdy absorbuje vodu a bobtná, po které může dojít ke kolonizaci semene symbiotickou houbou a k následnému růstu semenáčku (Smith a Read, 2008). U druhu *Corallorhiza trifida* však bylo zjištěno opačné pořadí, kdy pro inicializaci klíčení musí být embryo nejprve infikováno symbiotickou houbou (McKendrick a kol., 2000b). Na klíčení semene má kromě přítomnosti symbiotické houby vliv i mnoho dalších faktorů. Velký vliv má pH a složení půdy. U zatím zkoumaných druhů klíčivost pozitivně koreluje s obsahem organické hmoty a draslíku v půdě a negativně koreluje s pH (Batty a kol., 2001; Diez a kol., 2007). Na klíčení lesních druhů může mít vliv také sukcesní stádium lesa a složení a stáří opadu (McCormick a kol., 2012).

Dalším faktorem ovlivňujícím klíčení semen je rozšíření symbiotických hub v krajině, o němž máme jen velmi omezené znalosti. Saprotrofické houby bývají považovány za všudypřítomné, ve skutečnosti je však jejich rozšíření na lokalitách velmi nerovnoměrné (Diez, 2007). Největší koncentrace vhodných symbiotických hub se dá předpokládat v nejbližším okolí dospělých rostlin přibližně do vzdálenosti 1 m (Batty a kol., 2001; McKendrick a kol., 2002; Diez a kol., 2007), kam také velká část semen dopadá a jen minimum jich je přeneseno na velké vzdálenosti (Jersáková a Malinová, 2007). Oproti tomu ECM houby jsou vázány na vhodná lesní stanoviště, na něž jsou tak vázány i orchideje s těmito houbami asociované. U těchto druhů orchidejí přítomnost dospělého jedince orchideje jen málo ovlivňuje klíčivost, a tak se pokládá za důležitou přítomnost ECM kořenových špiček kolonizovaných houbou vhodnou zároveň pro OM (McKendrick a kol., 2000b).

Ale ani po nalezení vhodné houby nemusí mít mladá rostlina vyhráno. Bidartondo a Read (2008) při pokusu na dvou druzích rodu *Cephalanthera* zjistili, že jen část druhů hub, které inicializovaly klíčení, umožnily další vývoj semenáče. Spektrum hub v dospělých pak bylo srovnatelné se spektrem hub ve velmi malých semenáčích. Specializace na úzké spektrum hub v určitém ontogenetickém stádiu se však nepotvrdila u dalšího jimi

zkoumaného druhu *Epipactis atrorubens* a nebyla pozorována ani v dalších studiích na druzích z rodu *Epipactis* (Těšitelová a kol., 2012).

1.4. Vliv biotopu a genotypu na orchideoidní mykorhizu

Jedním z dalších faktorů, jež může mít vliv na mykorhizní asociace, je biotop, v němž rostlina roste. Ogura-Tsujita a Yukawa (2008) při analýze symbiotických hub u široce rozšířeného druhu *Epipactis helleborine* zjistili, že se druhy mykorhizních hub lišily mezi populacemi pocházejícími z různých oblastí a různých typů lesa, autoři však nezjistili rozdíl v genotypech rostlin (na základě chloroplastového úseku trnL-intron) z jednotlivých oblastí. Naopak Taylor a Bruns (1999) zjistili při analýze mykorhizních asociací dvou druhů rodu *Corallorhiza* kromě vlivu biotopu i vliv genotypu – dvě různé variety stejného druhu rostoucí na jedné lokalitě se pojily s různými symbiotickými houbami a jejich druhová spektra se vzájemně nepřekrývala (Taylor a Bruns, 1999).

Je obtížné odlišit vliv biotopu a genotypu, protože tyto dva vlivy se vzájemně prolínají (Taylor a Bruns, 1999). U orchidejí se širším spektrem symbiotických hub se dá předpokládat hlavně vliv biotopu, kdy se rostlina váže se symbiotickými houbami vyskytujícími se v daném biotopu (Ogura-Tsujita a Yukawa, 2008). Naopak u rostlin s úzkým spektrem houbových symbiontů převládá pravděpodobně vliv genotypu – rostlina se bez rozdílu biotopu váže se svou typickou symbiotickou houbou (Taylor a Bruns, 1999). Pro odlišení vlivu genotypu a biotopu na mykorhizní asociace u druhů se širokou ekologickou valencí se hodí pokus s vyséváním semen pocházejících z různých biotopů na lokalitách mateřských a sesterských (Ogura-Tsujita a Yukawa, 2008; Těšitelová a kol., 2012). Porovnáním mykorhizních partnerů blízké příbuzných druhů s rozdílnou ekologickou valencí a rozdílnými nároky na stanoviště pak můžeme od sebe odlišit vliv dalších biotických a abiotických faktorů.

1.5. Ekologie a mykorhizní asociace studovaných druhů

Pro zjištění vlivu biotopu na mykorhizní asociace jsem si vybral druhy *Neottia ovata* a *N. cordata*. Tyto příbuzné druhy se liší ve svých ekologických nárocích a nikdy se nevyskytují spolu. Zatímco druh *N. cordata* je ve střední Evropě striktně vázán na horské klimaxové smrčiny, *N. ovata* je druh s širokou ekologickou valencí vyskytující se jak na lučních, tak v lesních biotopech. Díky tomu se tyto druhy zdají být velmi vhodné pro výzkum mykorhizních partnerů a odlišení vlivu biotopu a genotypu.

Rod *Neottia* patří do tribu Neottieae a podčeledi Epidendroideae. Do tohoto rodu je v současné době řazeno několik desítek druhů, z nichž tři se vyskytují v Evropě: *Neottia cordata*, *N. nidus-avis* a *N. ovata*.

Z celého rodu *Neottia* máme ucelenější poznatky o mykorhizních asociacích jen u nezeleného MH druhu *N. nidus-avis*. Tento druh je vázán na ECM druhy hub náležející do čeledi Sebacinaceae skupina A (Selosse a kol., 2002), jejichž prostřednictvím získává uhlík od okolních stromů. Do tribu Neottieae pak patří několik druhů orchidejí, u nichž byla zjištěna mixotrofie (MX) a závislost na ECM houbách (rody *Cephalanthera* a *Epipactis*; Selosse a kol., 2004; Julou a kol., 2005; Abadie a kol., 2006). Vzhledem k tomu, že je MX považována za evoluční předstupeň MH (Selosse a Roy, 2009), mohla by se předpokládat existence MX druhů uvnitř rodu *Neottia*, podobně jako se to potvrdilo např. u rodu *Cymbidium* (Motomura a kol., 2010).

Ze zbylých dvou evropských druhů rodu *Neottia* máme znalosti o mykorhizních asociacích převážně u druhu *N. ovata*. U tohoto druhu, jenž roste jak na lučních, tak na lesních stanovištích, byly pomocí metody kultivace zjištěny houby náležející do skupiny ‚rhizoctonia‘ (Downie, 1959; Rasmussen a kol., 1991) a pomocí molekulární identifikace pak byly v obou druzích potvrzeny saprotrofní druhy hub skupiny B čeledi Sebacinaceae (Kotlínek, 2010). U druhu *N. ovata* byla navíc provedena izotopová analýza, která neukázala průkazné obohacení o uhlík pocházející ze symbiotických hub a tento druh tak lze s největší pravděpodobností považovat za AO (Gebauer a Mayer, 2003; Tedersoo a kol., 2007; Kotlínek, 2010). Podobné výsledky byly zjištěny i pro druh *N. cordata*, u něhož vzhledem k výskytu na zastíněných lesních stanovištích a malé listové ploše, byla MX považována za velice pravděpodobnou (Kotlínek, 2010).

Analýza mykorhizních hub byla provedena pouze v dospělých a jen na malém počtu lokalit, zároveň také nemáme žádné poznatky o druzích hub, na něž jsou tyto druhy vázány během klíčení. Spektrum symbiotických hub se také může během ontogeneze měnit (Bidartondo a Read, 2008). Známe není ani průběh klíčení. U široce rozšířeného druhu *N. ovata* se také neví nic o vlivu biotopu na mykorhizní asociace. Přestože u tohoto druhu nebyla prokázána MX, je možné, že na lesních lokalitách bude tento druh častěji vázán s ECM druhy hub. Zároveň u populací dlouhodobě rostoucích v lese mohlo dojít k přizpůsobení se tomuto biotopu. Pro odlišení případného vlivu genotypu na mykorhizní asociace druhu *N. ovata*, byla zvlášť sazena semena pocházející z lesních a lučních populací.

1.6. Cíle práce

V této práci bych se chtěl pokusit odpovědět na následující otázky pomocí vysévacího pokusu na dvou druzích z rodu *Neottia* lišících se ve svých stanovištních nárocích:

- 1) Je klíčení obou druhů ovlivněno stanovištěm a původem rostlin (u druhu *N. ovata*)?
- 2) Se kterými houbami se oba druhy pojí? Liší se spektrum houbových partnerů dle typu stanoviště?
- 3) Mění se spektrum symbiotických hub během vývoje rostliny?

2. Metodika

2.1. Popis modelových druhů

Neottia ovata (L.) R. Br. – je jeden z nejběžněji se vyskytujících druhů orchidejí v České republice. Má rozsáhlý euroasijský areál rozšíření, můžeme ho najít v celé Evropě s výjimkou severní Skandinávie. *N. ovata* má širokou ekologickou valenci a v České republice se vyskytuje od nížin po podhorské oblasti na loukách i v různých typech světlých lesů. Nikdy neroste v silně zastíněném podrostu (Procházka, 1980).

Neottia cordata (L.) R. Br. – jedná se o vzácný druh, který je ve střední Evropě striktně vázaný na horské klimaxové smrčiny. Druh má cirkumpolární rozšíření a můžeme ho najít v horských oblastech celé Evropy. Ve Skandinávii se vykytuje i v nižších polohách nejen v rašelinných smrčínách, ale i na okrajích blatkových borů (Procházka, 1980).

2.2. Popis lokalit

Pro pokus byly vytipovány vhodné lokality ležící na Šumavě a ve Smrčínách. Původně bylo vybráno 6 lesních a 6 lučních lokalit druhu *N. ovata* a 6 lokalit druhu *N. cordata*. V průběhu pokusu (po vložení všech rámečků do půdy) však byla těžbou zničena lokalita druhu *N. cordata* u Jezerní slatě. Tato lokalita tak byla z dalších analýz vyloučena. Bližší popis lokalit je v příloze (Příloha I.)

2.3. Vysévací pokus

Pro výzkum schopnosti semen modelových druhů klíčit na vlastních lokalitách a lokalitách sesterského druhu jsem použil rámečkovou metodu vyvinutou Rasmussen a Whigham (1993), při které jsou semena vložena do jemné nylonové síťoviny uzavřené do rámečku na diapositivu. Hustota ok síťoviny (48 μm) umožňuje vstup mykorhizním houbám a mikroorganismům. Rámečky se vkládají do půdy pod úhlem asi 45° do hloubky cca 5 cm.

Tato metoda umožňuje klíčení semen v takřka přirozených podmínkách a následné snadné vyjmutí z půdy.

Semena použitá pro výsev jsem získal ze zralých semeníků rostlin sebraných na vybraných lokalitách. Na každé lokalitě bylo sebráno 10 semeníků z 10 rostlin u *N. ovata* a 5 semeníků z 10-20 rostlin (dle velikosti populace) u druhu *N. cordata*. Semena byla uchovávána v chladničce při teplotě 4 °C. Ze semen jsem poté vytvořil tři směsné vzorky – lesní *N. ovata*, luční *N. ovata* a *N. cordata*. Semena *N. cordata* byla v samostatném rámečku, semena *N. ovata* byla vkládána do půlených rámečků, kdy každý rámeček obsahoval síťku se semeny lesní směsi a síťku se semeny luční směsi. Množství a kvalita semen jednotlivých směrů jsou uvedeny v Tab. 1; množství a druhy rámečků vložených do půdy na jednotlivých lokalitách jsou uvedeny v Tab. 2. Rámečky byly na lokalitách sazeny v průběhu září. Malé množství rámečků se semeny *N. cordata* vysazených během roku 2008 bylo způsobeno nedostatečným množstvím sebraných semen, jež bylo způsobeno malou produkcí semen u tohoto druhu. Proto bylo vysazení opakováno i v roce 2009 s nově sebranými semeny obou druhů, ale i tento rok bylo množství získaných semen druhu *N. cordata* příliš malé a některé lokality tak byly vynechány

Rámečky se semeny obou druhů byly poté zasazeny společně na každé lokalitě do 4-6 skupin nacházejících se poblíž dospělých jedinců *N. ovata* či *N. cordata*. Každá skupina obsahovala 3-4 rámečky se semeny *N. ovata*, 1-2 rámečky se semeny *N. cordata* byly jen v některých skupinách. Tento design nám měl umožnit porovnat klíčivost obou druhů na vlastních i sesterských lokalitách a odhalit důvody limitace rozšíření v biotopech sesterských druhů; zda je limitace způsobena rozšířením vhodné mykorrhizní houby v těchto biotopech nebo jiným biotickým či abiotickým faktorem.

Během let 2010 a 2011 byly všechny rámečky postupně vyjmuty (počty vyjmutých rámečků jednotlivých druhů jsou uvedeny v Tab. 2). Následně byla semena zkontrolována pod binolupou a rozdělena do následujících kategorií: 1) mrtvá – semena s odumřelým embryem, 2) neklíčící – neprojevující žádnou známku klíčení, 3) klíčící – semena v počáteční asymbiotické fázi klíčení, 4) protokorm – embryo výrazně diferencováno, 5) odumřelý protokorm.

Tab. 1. Množství semen vkládané do rámečků a kvalita semen v jednotlivých směsích.

Rok	2008		2009	
Druh semen	podíl semen s embryem (%)	průměrný počet semen (\pm SD)	podíl semen s embryem (%)	průměrný počet semen (\pm SD)
<i>N. cordata</i>	78,5	60 (\pm 5,9)	96,4	135 (\pm 11,1)
<i>N. ovata</i> louka	97,2	86 (\pm 13,8)	97,5	194 (\pm 16,7)
<i>N. ovata</i> les	95	86 (\pm 13,8)	96,8	174 (\pm 28,4)

Tab. 2. Počty rámečků vložených do půdy a vyjmutých z půdy na jednotlivých lokalitách. Vysvětlivky: ZR Ztracený rybník; ZS Ztracená slat'; PN Ptačí nádrž; NM Novohuťské močály; BO Boubín; JS Jezerní slat'; MD Myší domky; VB Včelná pod Boubínem; VK Vinice louka; LH Louka u Hanzlů; LL Lštění; JK Javorník louka; VS Vinice les; SP Slatinný potok; KP Keply; NC Nicov; NB Nebe; JL Javorník louka; NO *N. ovata*; NC *N. cordata*.

¹Lokalita Jezerní slat'(JS) byla zničena a rámečky již nebyly vyjmuty; ²Rámečky sazené v roce 2008 + sazené v roce 2009; ³U lokalit Javorník louka a Javorník les nejsou zahrnuty zkušební rámečky vyjmuté už v roce 2009 kvůli kontrole rychlosti vývoje (dva u každé lokality)

Rok	Vložené rámečky					Rok	Vyjmuté rámečky					
	2008		2009		Celkem		2010		2011		Celkem	
Lokalita	NO	NC	NO	NC			Lokalita	NO ²	NC ²	NO ²		NC ²
<i>N. cordata</i>	ZR	16	4	18	14	52	ZR	8+4	2+4	4+12	2+8	44
	ZS	18	4	14	10	46	ZS	8+4	2+3	9+10	2+7	45
	PN	18	4	18	14	54	PN	9+4	2+3	9+12	2+10	51
	NM	12	4	14	10	40	NM	9+4	2+3	3+10	2+7	40
	BO	18	4	14	10	46	BO	13+4	4+3	5+9	0+7	45
	JS ¹	12	4	14	10	40	JS	0	0	0	0	0
<i>N. ovata</i> luční	MD	12	0	14	7	33	MD	8+4	0+2	4+10	0+5	33
	VB	12	0	14	7	33	VB	6+4	0+2	3+8	0+5	28
	VK	12	0	14	0	26	VK	8+4	0	4+10	0	26
	LH	18	4	14	0	36	LH	8+4	2+0	9+9	2+0	34
	LL	18	4	18	14	54	LL	12+4	3+2	6+9	1+8	45
	JK	18	4	14	7	43	JK	13+4	3+2	2+10	0+4	38 ³
<i>N. ovata</i> lesní	VS	12	0	14	0	26	VS	8+4	0	4+10	0	26
	SP	12	0	14	0	26	SP	8+4	0	4+10	0	26
	KP	12	0	14	7	33	KP	8+4	0+2	4+10	0+5	33
	NC	18	4	14	7	43	NC	12+4	2+2	5+10	1+5	41
	NB	17	4	18	14	53	NB	7+4	2+2	8+13	1+9	46
	JL	18	4	14	7	43	JL	11+4	3+2	5+10	0+5	40 ³
Součet	273	48	268	138	727	Součet	224	59	260	98	641	

2.4. Analýza symbiotických hub v protokormech

Pro zjištění mykorhizních partnerů během klíčení byly použity protokormy získané z rámečků vyjmutých z půdy. Protokormy pocházely ze semen sazených jak v roce 2008, tak 2009. Celkem bylo získáno 68 protokormů (z celkového počtu 86 nalezených živých protokormů, Příloha IV) dostatečně velkých pro analýzu symbiotických hub, a to ze tří lesních lokalit *N. ovata* (Nicov, Keply a Slatinný potok), čtyř lučních lokalit *N. ovata* (Javorník louka, Lštění, Myší Domky a Louka u Hanzlů) a jedné lokality *N. cordata* (Ztracený Rybník). Protokormy byly po vyjmutí z rámečků očištěny a zamrazeny a použity zvlášť na molekulární analýzu symbiotických hub. Celkem nakonec bylo analyzováno 45 protokormů.

2.5. Analýza symbiotických hub v kořenech dospělců

Pro zjištění mykorhizních partnerů dospělých rostlin byly provedeny odběry kořenů. U druhu *N. cordata* jsem odebíral vzhledem k velikosti rostliny celé jedince, a to vždy tři z jedné lokality. U jedinců *N. ovata* jsem odebral po třech kořenech z pěti rostlin na každé

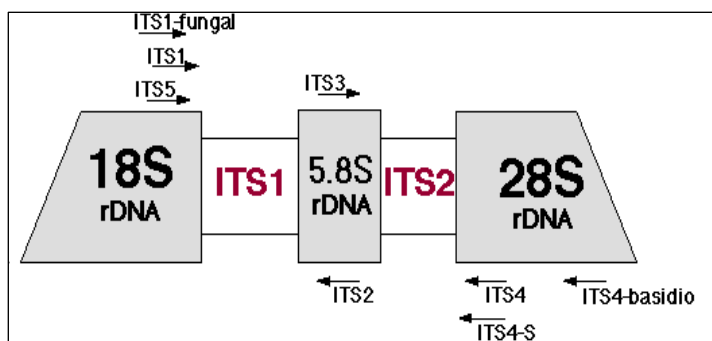
lokalitě, kvůli minimalizaci poškození rostliny. Kořeny byly po odběru očištěny, vloženy do 60% etanolu a převezeny do laboratoře, kde byly rozřezány po 0.5 cm. Byla zjišťována přítomnost a kvalita houbové infekce. Z infikovaných částí byly nařezány 2 mm řezy, které byly následně zamrazeny při -20 °C. Během dalších analýz byl použit vždy minimálně jeden řez z každé rostliny, většinou však jeden až dva řezy z každého infikovaného kořene. Každý řez byl izolován zvlášť.

Pro následné analýzy byly použity vzorky ze všech lokalit *N. cordata* (analyzováni 2-3 jedinci na lokalitu); u druhu *N. ovata* (analyzováni 2 - 4 jedinci na lokalitu) pak byly použity pouze vzorky kořenů z lokalit Louka u Hanzlů, Myší Domky, Lštění, Javorník louka, Javorník les, Vinice les, Slatinný potok, Keply a Nicov. V analýzách dalších lokalit nebylo pokračováno, jelikož z nich nebyly získány žádné protokormy. Lokality Vinice les a Javorník les, u nichž také nebyly zjištěny protokormy, byly analyzovány ještě před vyjmutím rámečků z půdy.

2.6. Metody molekulární identifikace

Pro izolaci DNA z protokormů byl použit kit Invisorb spin Plant Mini Kit (INVITEK GmbH) dle pokynů výrobce. Jediný rozdíl byl v přidání PVPP (Polyvinylpyrrolidon) během rozdrčení vzorku pro odstranění sekundárních metabolitů. Pro izolaci DNA z dospělých rostlin byla použita metoda CTAB dle protokolu uvedeného v příloze.

Během následné PCR byla amplifikována část úseku 18S, celý úsek ITS1, 5.8S, ITS2 a část úseku 28S rDNA (Obr. 1). Při přípravě směsi pro PCR jsem používal Plain PP Master Mix (Top-Bio) a složení reakce bylo následující: 7,5 µl PP Master Mixu; 1,2 µl 5' primeru (5 pmol), 1,2 µl 3' primeru (5 pmol), 2 µl DNA a 3,1 µl ddH₂O (výsledný objem 15 µl).



Obr. 1. Schéma sekvenovaného úseku rDNA. Úsek pro nasedání primeru ITS3-Seb leží na místě ITS3; pro ITS4-Tul leží mezi ITS4 a ITS4-B; pro TW13 leží na úseku 28S za ITS4-B (basidio). Převzato z The Bruns Lab (<http://plantbio.berkeley.edu/~bruns/>).

Pro podchycení diverzity hub předpokládané v kořenech orchidejí byly použity následující primery: ITS1-F (univerzální pro všechny Eumycota kromě rodu *Tulasnella*; Gardes a Bruns, 1993), ITS4-Tul (selektivní pro houby rodu *Tulasnella*; Taylor a McCormick, 2008), ITS3-Seb (selektivní pro houby čeledi Sebacinaceae; Setaro a kol., 2006), ITS1 (univerzální pro Eukaryota; White a kol., 1990), ITS4 (univerzální pro Eukaryota; White a kol., 1990) a TW13

(univerzální pro Eukaryota; O'Donnell, 1993). Pro primerové kombinace ITS1F+ITS4 a ITS1+ITS4-Tul jsem použil následující cyklus: 5 min. počáteční denaturace při 95 °C, následovaná 40 cykly denaturace 1 min. při 95 °C, annealing 1 min. při 55 °C a elongace 1 min. a 30 s při 72 °C; závěrečná elongace probíhala 10 min. při 72°C. Pro kombinaci ITS3-Seb+TW13 byl použit cyklus: 4 min. počáteční denaturace při 94 °C, následovaná 35 cykly denaturace 30 s při 94 °C, annealingu 30 s při 55 °C a elongace 30 s při 72 °C; konečná elongace probíhala 10 min. při 72°C. Produkt PCR reakce byl otestován při elektroforéze, kdy byl smíchan s barvivem GelRed (Biotium) a nanesen na 1,5% agarózový gel v 1x TBE pufru. Jako standard byl použit 100 bp DNA Ladder (NEB).

PCR produkt získaný použitím primerových kombinací ITS1+ITS4-Tul a ITS3-Seb+TW13 byl purifikován pomocí enzymu ExoSAP-IT (USB Corporation) a následně použit pro přípravu sekvenční reakce. PCR produkt získaný použitím kombinace ITS1F+ITS4 byl použit pro klonování.

Pro klonování byl použit vektor pGEM-T Vector system I od firmy Promega (<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>). Celkem bylo z každého vzorku odebráno osm pozitivních kolonií a následně byla provedena PCR pomocí primerů T7 a SP6.

Při jednosměrné sekvenaci byly použity primery ITS1 (při PCR kombinace primerů začínající ITS1), ITS3-Seb (ITS3-Seb), SP-6 (po klonování). Získané sekvence jsem upravil pomocí programů Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc.), ChromasPro 1.42 (Technelysium Pty. Ltd.) a Bioedit (Hall, 1999) a nakonec zjistil identitu a pravděpodobnou ekologii porovnáním s databází GenBank u NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) pomocí metody BLAST (Altschul a kol., 1997). Sekvence náležející k čeledi Sebacinaceae a Tulasnellaceae byly sjednoceny do operačních taxonomických jednotek (OTU) na základě 97% podobnosti – tato podobnost je u hub považována za nejrealističtější a také je nejčastěji používána (Hughes a kol., 2009). U čeledí Sebacinaceae i Tulasnellaceae byly na tvorbu OTU použity kompletní úseky ITS1, 5.8S a ITS2.

2.7. Statistická analýza dat

Pro analýzu klíčivosti semen pocházejících z různých biotopů („původ“) na třech typech stanovišť („biotop“) bylo použito procento klíčících semen, tj. součet procenta klíčících nemykorhizních semen (kategorie 3 v kapitole 2.3) a procenta mykorhizních protokormů (kategorie 4 v kapitole 2.3). Byly použity pouze výsledky u semen zasazených v roce 2008 a vyjmutých v roce 2010 z důvodu vyšší úmrtnosti semen vyjmutých až v roce

2011 a z důvodu špatné klíčivosti všech semen zasazených v roce 2009. Klíčivost byla rovněž analyzována pouze u druhu *N. ovata* kvůli téměř nulové klíčivosti *N. cordata*. Zobecněný lineární model se smíšenými efekty a binomiální distribucí (binomiální GLM) byl použit na analýzu procenta klíčících semen. Byla použita analýza *split-plot designu*: vliv *původu* a *biotopu* a jejich interakce byly testovány jako faktory s pevnými efekty, kde vliv *biotopu* byl testován jako nejvyšší hierarchický faktor proti variabilitě mezi lokalitami a vliv *původu* proti variabilitě residuálů, přičemž struktura dat byla zohledněna hierarchicky uspořádanými faktory s náhodným efektem, tj. lokalita výsevu byla hierarchicky vložena v biotopu (1|biotop/lokalita/skupina). Pro otestování rozdílů jednotlivých hladin faktoru *biotop* byly použity *a priori* definované kontrasty.

Obdobně byl na stejném datasetu testován vliv *původu* a *biotopu* na počet protokormů a velikost největšího protokormu v rámečcích pomocí lineárního modelu se smíšenými efekty (LME), avšak z důvodu malého počtu pozorování (pouze 27 rámečků v tomto datasetu obsahovalo protokormy) a nevyrovnanému počtu protokormů v jednotlivých skupinách byl faktor s náhodnými efekty zjednodušen na 1|lokalita. Obdobně byla testována závislost velikosti největšího protokormu v rámečku na počtu protokormů v rámečku. Počty protokormů i jejich velikosti byly před analýzou upraveny logaritmickou transformací.

Statistické analýzy byly provedeny v programu R verze 2.14 (R Development Core Team, 2006) za použití knihovny lme4 (Bates a kol., 2010) a nlme verze 3.1 (Pinheiro a kol., 2011) a vizualizovány pomocí knihovny lattice verze 0.19 (Sarkar, 2008).

Pro vyhodnocení rozdílů ve spektru symbiotických hub zjištěných u jedinců druhu *N. cordata*, jedinců druhu *N. ovata* rostoucími na lesním stanovišti a jedinci druhu *N. ovata* rostoucími na lučním stanovišti byla použita kanonická korespondenční analýza (CCA) provedená v programu CANOCO verze 4.53 (Ter Braak a Šmilauer, 2002). Pro test významnosti byl použit Monte-Carlo permutační test s 999 permutacemi. Pro analýzu byly použity všechny druhy hub skupiny Basidiomycota, jež byly pozorovány minimálně u dvou jedinců. Jednotlivé OTU získané u čeledí Tulasnellaceae a Sebacinaceae byly považovány za samostatné druhy. Za nezávislé pozorování byly považovány druhy hub nalezené u jednotlivých rostlin.

2.8. Fylogenetická analýza dat

Fylogenetická analýza OTU z čeledí Sebacinaceae a Tulasnellaceae byla provedena pomocí programu MrBayes verze 3.2 (Ronquist a kol., 2012). Alignment byl proveden pomocí algoritmu NJ/UPGMA v programu MAFFT verze 7.012 (Katoh, 2010) a následně

upraven pomocí programu Bioedit verze 7.0.4.1. (Hall, 1999). Vhodný model byl vybrán pomocí programu Kakusan4 verze 4.0.2011.05.28 (Tanabe, 2011) na základě AIC (Akaike, 1974). Analýza byla provedena vždy dvakrát, pokaždé pro 5×10^6 generací, každých 100 generací byl ukládán aktuální fylogram. Prvních 25 % uložených stromů bylo odstraněno a zbytek byl použit pro majoritní konsenzus. Větve s *Bayesian posterior probabilities* (BPP) nižšími než 0,95 byly považovány za špatně podpořené.

Ke každé OTU čeledi Tulasnellaceae byla nalezena nejpodobnější sekvence v databázi NCBI pomocí metody BLAST, dále pak byla matice doplněna o sekvence jednotlivých druhů rodu *Tulasnella* umístěných v databázi NCBI a o outgroup z řádu Cantharellales; celkem 27 sekvencí. Vzhledem k příliš vysoké variabilitě v oblastech ITS1 a ITS2 byly pro fylogenetickou analýzu použity pouze úsek 5.8S a části úseků 18S a 28S, celková délka alignmentu byla 396bs. Byl použit SYM+G (Zharkikh, 1994; Yang, 1994) substituční model vybraný pomocí programu Kakusan4.

Pro fylogenetickou analýzu OTU z čeledi Sebacinaceae byly do matice přidány sekvence několika druhů rodu *Sebacina* (*S. vermifera*, *S. incrustans*, *S. epigaea*, *S. dimitica*) a sekvence druhu *Piriformospora indica*. Dále byla matice doplněna o Sebacinaceae zjištěné jako endofytické (4 sekvence) či jako symbiotické účastníci se ECM, OM, erikoidní mykorrhizy, ektendomykorrhizy nebo mykorrhizy u jätrovek (Marchantiophyta) (13 sekvencí). Všechny přidané sekvence byly získány z databáze NCBI. Pro fylogenetickou analýzu byl použit region ITS2 a části regionů 5.8S a 28S, celková délka alignmentu byla 400bs. Byl použit GTR+G (Tavaré, 1986; Yang, 1994) substituční model vybraný pomocí programu Kakusan4.

2.9. TEM

Pro přípravu vzorků na transmisní elektronovou mikroskopii byly použity vzorky kořenů obou druhů a vzorek protokormu druhu *N. ovata*. Pro fixaci vzorku byl použit upravený protokol používaný Laboratoří elektronové mikroskopie v Českých Budějovicích. Přesné znění protokolů je v příloze (Příloha II. a III.).

3. Výsledky

3.1. Průběh klíčení

Celkem bylo analyzováno 78 965 semen (39 154 z lučních a 39 811 z lesních lokalit) *N. ovata* získaných ze 484 rámečků a 7 018 semen *N. cordata* získaných ze 157 rámečků. Vyjmout se nepodařilo pouze rámečky z lokality Jezerní slat', jež byla zničena těžbou. Výsledky klíčení a přežívání semen v půdě jsou v Tab. 3 a Příloha IV.

Klíčivost semen *N. ovata* vložených do půdy v roce 2008 byla po dvou letech 8,3 %, po třech pak 1,2 %. U semen sebraných a následně vložených do půdy v roce 2009 byla zjištěna takřka nulová klíčivost a velmi velká úmrtnost – 92 % semen bylo mrtvých již po prvním roce, po druhém roce to pak bylo 97 % semen (Obr. 2, Tab. 3). Oproti tomu u semen vysazených v roce 2008 bylo po dvou letech mrtvých 83% semen, což je o téměř 15 % méně.

U druhu *N. cordata* byla na všech lokalitách zjištěna vysoká úmrtnost, více než 98 % po jednom či dvou letech v půdě, a zároveň minimální klíčivost (< 0,2 %) semen vysazených v obou letech (Tab. 3). Po třech letech v půdě pak byla všechna semena *N. cordata* mrtvá.

Tab. 3. Klíčení semen druhů *N. ovata* a *N. cordata* v rámečcích v závislosti na roce sběru a vložení semen do půdy a na roce vyjmutí z půdy. U protokormů je v závorce uveden celkový počet. PAR=Počet analyzovaných rámečků.

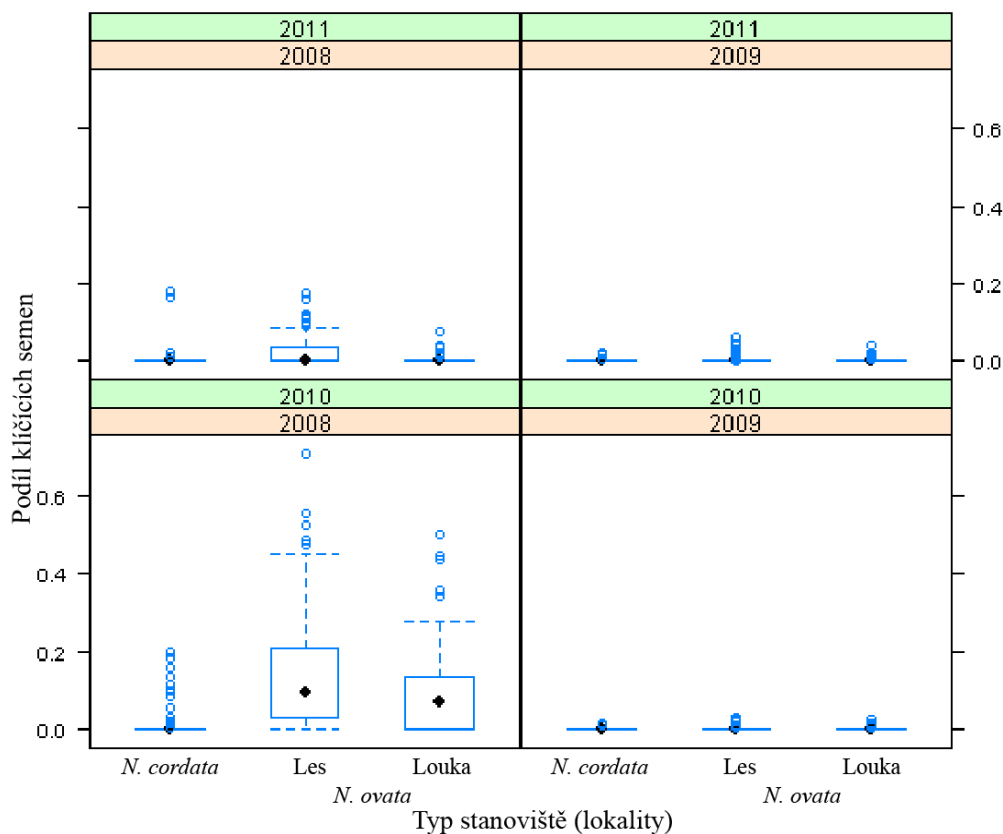
vyjmuta	vložena	druh	%klíčí	%neklíčí	%mrtvá	%protokormy	PAR
2010	2008	<i>N. ovata</i>	8,26	8,74	82,56	0,39 (68)	156
		<i>N. cordata</i>	0,17	1,49	98,35	0,00	27
	2009	<i>N. ovata</i>	0,25	7,58	92,18	0,00	68
		<i>N. cordata</i>	0,06	1,17	98,77	0,00	32
2011	2008	<i>N. ovata</i>	1,17	3,16	95,55	0,12 (14)	88
		<i>N. cordata</i>	0,00	0,00	100,00	0,00	13
	2009	<i>N. ovata</i>	0,26	2,65	97,07	0,01 (4)	162
		<i>N. cordata</i>	0,00	0,02	99,98	0,00	85

Do stádia protokormu se vyvinula pouze semena druhu *N. ovata*, a to na všech typech lokalit. Celkem jsem v rámečcích našel 86 živých protokormů, z nichž 68 bylo dostatečně velkých pro analýzu symbiotických hub, a 9 mrtvých protokormů (Příloha IV). Protokormy dostatečně velké pro analýzu symbiotických hub pocházely ze čtyř lučních a tří lesních lokalit *N. ovata* a jedné lokality *N. cordata* (Tab. 4 a Příloha IV). Největší protokorm měřil 11,5 mm a pocházel ze semen vložených do půdy v roce 2008 a vyjmutých v roce 2010, z lokality Myší domky.

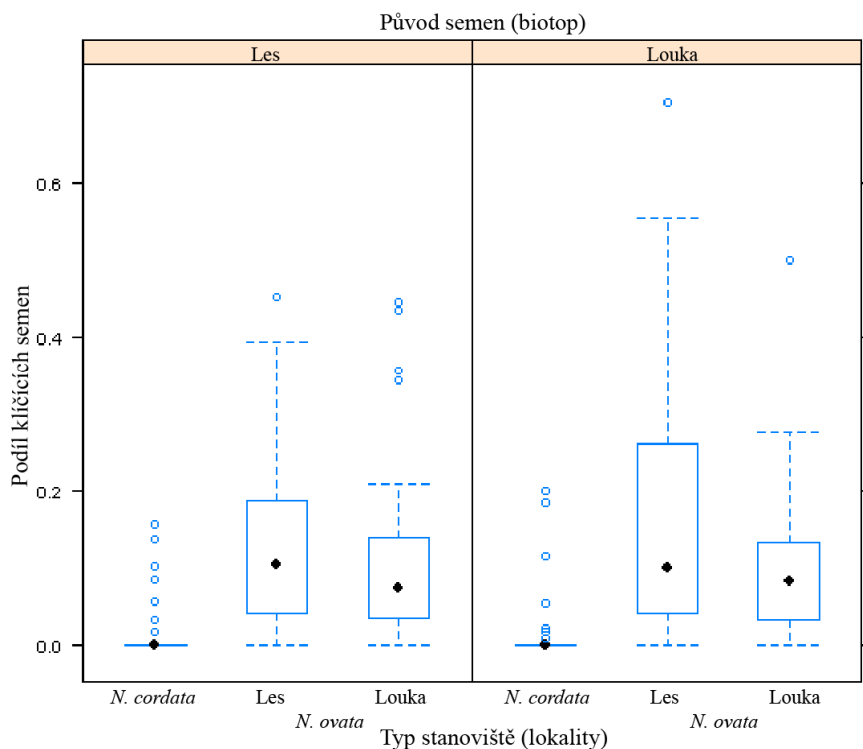
U druhu *N. ovata* nebyl zjištěn rozdíl v procentu klíčících semen mezi semeny pocházejícími z lesních a lučních lokalit (binomiální GLM, $\chi^2_1 = 0,009$, $p = 0,926$). Byl však zjištěn průkazný rozdíl v klíčovosti mezi biotopy (binomiální GLM, $\chi^2_2 = 12,23$, $p = 0,002$). Průkazně lepší klíčovost semen byla na lokalitách s výskytem *N. ovata* oproti lokalitám

s výskytem *N. cordata*, a to jak u semen z lučních lokalit *N. ovata* (binomiální GLM, $z = 2,75$, $p = 0,006$) tak u semen z lesních lokalit (binomiální GLM, $z = 2,325$, $p = 0,02$). Mezi lesními a lučními lokalitami *N. ovata* nebyl zjištěn průkazný rozdíl v procentu klíčících semen (binomiální GLM, $z = 0,843$, $p = 0,399$) (Obr. 3). U semen *N. cordata* nebyl vzhledem k téměř stoprocentní úmrtnosti semen na všech lokalitách testován vliv biotopu.

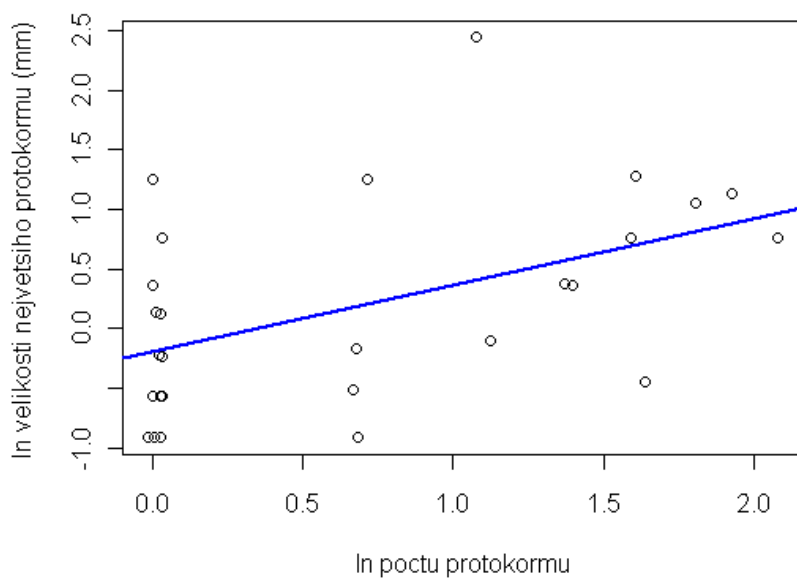
Nebyl zjištěn vliv biotopu ani původu semen na počet protokormů (LME, Likelihood ratio = 0,014, $p = 0,905$ pro biotop a Likelihood ratio = 0,03, $p = 0,862$ pro původ semen) ani na velikost protokormů (LME, Likelihood ratio = 1,673, $p = 0,196$ pro biotop a Likelihood ratio = 0,535, $p = 0,465$ pro původ semen). Velikost největšího protokormu v rámečku však byla průkazně ovlivněna počtem protokormů v daném rámečku (LME, Likelihood ratio = 7,248, $p = 0,007$) (Obr. 4).



Obr. 2. Box and Whisker diagram znázorňující klíčivost zjištěnou u semen druhu *N. ovata* (směs semen pocházejících z obou biotopů) v závislosti na roce vložení a roce vyjmutí z půdy. Zeleně je podbarven rok vyjmutí semen z půdy a růžově rok sběru semen a vložení do půdy. Boxy znázorňují mezikvartilové rozpětí, *whiskers* potom zahrnují body do 1,5x rozpětí mezi kvartily.



Obr. 3. Box and Whisker diagram ukazující rozdíly v klíčivosti lučních a lesních semen *N. ovata* vložených do půdy v roce 2008 a vyjmutých v roce 2010 mezi jednotlivými typy lokalit (s výskytem *N. cordata*; lesní a luční s výskytem *N. ovata*). Na diagramu je též vidět minimální rozdíl v klíčivosti mezi semeny z lesního a lučního biotopu.



Obr. 4. Korelace mezi velikostí největšího zjištěného protokormu a celkovým počtem protokormů v tom samém rámečku (Pearsonův korelační koeficient, $t = 2,77$, $df = 25$, $p = 0,011$, $R^2 = 0,234$). K jednotlivým pozorováním bylo přidáno malé množství variance na ose x proto, aby byly v grafu patrné všechny vzorky.

3.2. Symbiotické houby v protokormech a kořenech dospělců

Symbiotické houby se podařilo zjistit u 34 ze 45 analyzovaných protokormů u druhu *N. ovata*, u všech 26 analyzovaných dospělců druhu *N. ovata* a u 14 z 15 analyzovaných dospělců *N. cordata*. Jednotlivé druhy hub zjištěné v dospělcích i v protokormech jsou uvedeny v Tab. 4. U obou druhů dominovaly houby ze skupiny ‚rhizoctonia‘, a to hlavně druhy z čeledi Sebacinaceae (zjištěny u 93 % dospělců druhu *N. cordata*, 92 % dospělců druhu *N. ovata* a 77 % protokormů druhu *N. ovata*), méně časté pak druhy čeledi Tulasnellaceae (zjištěny u 30 % dospělců druhu *N. ovata*, u protokormů *N. ovata* a dospělců *N. cordata* byly zjištěny vždy jen jednou). Jednotlivé sekvence těchto druhů byly rozděleny do 16 OTU u čeledi Sebacinaceae a 5 OTU u čeledi Tulasnellaceae.

Při fylogenetické analýze vyšla čeleď Sebacinaceae jako dobře podpořená monofyletická skupina. Tato čeleď se zároveň dělí na dvě části; a to skupinu A tvořenou ECM druhy a skupinu B tvořenou saprotrofickými druhy (Weiss a kol. 2004). Většina mnou zjištěných OTU náleží do saprotrofické skupiny B, jen jediná OTU 32S se umístila na bázi ECM skupiny A, toto umístění má však malou podporu (Obr. 6).

Čeleď Tulasnellaceae vyšla při fylogenetické analýze také jako dobře podpořená monofyletická skupina. Můžeme ji rozdělit na dvě skupiny, A a B. Skupinu A tvoří tzv. ‚jádrové Tulasnellaceae‘, kam patří všechny známé druhy rodu *Tulasnella* a umístila se do ní rovněž část mnou izolovaných sekvencí. Skupina B je umístěna na bázi skupiny A a patří k ní jedna OTU izolovaná ze dvou rostlin jedné lokality (Obr. 7).

Zajímavé je porovnání zastoupení zjištěných OTU z čeledi Sebacinaceae mezi druhy rodu *Neottia* a typem lokalit (Tab. 5, Obr. 5 a 7). OTU 8S, 12S, 14S a 15S se vyskytují pouze u druhu *N. cordata*, zbylé OTU se naopak vyskytují pouze u *N. ovata*. U *N. ovata* je vidět i rozdíl mezi biotopy v diverzitě symbiotických hub u dospělých jedinců (Obr. 5). Zatímco ve 14 jedincích ze čtyř lučních lokalit byly zjištěny 4 OTU (2S, 5S, 16S a 17S), ve stejném počtu jedinců z pěti lesních lokalit bylo zjištěno 10 OTU (2S, 4S, 5S, 6S, 9S, 17S, 20S, 26S, 28S, 32S). Dvě blízce příbuzné OTU 2S a 5S (Obr. 7) patřily mezi nejhojněji nalézané OTU v dospělcích *N. ovata* na lesních i lučních lokalitách. Tyto dvě OTU byly rovněž dominantní u protokormů v obou typech biotopů s dospělci *N. ovata*. Výjimkou je pouze lesní lokalita Keply, na které jako jediné byly u protokormů kromě těchto dvou OTU zjištěny i jiné OTU (11S a 26S).

Z pěti OTU zjištěných u čeledi Tulasnellaceae byly dvě zjištěny pouze u dospělců *N. ovata* z lučních lokalit (OTU 1T a 5T), další dvě pak pouze u dospělých jedinců *N. ovata*

z lesních lokalit (OTU 2T a 4T). Zajímavá je OTU 3T, která byla zjištěna jak u protokormu *N. ovata* z luční lokality a u dospělce z lesní lokality *N. ovata*, tak i u dospělce *N. cordata*. Jedná se tak o jediný druh zjištěný jak u *N. ovata*, tak u *N. cordata*.

Kromě hub z čeledí Tulasnellaceae a Sebacinaceae bylo nalezeno dalších 13 druhů hub u *N. ovata* a pouze dva další druhy u *N. cordata* (Tab. 4). Nejčastěji byly nalézány ECM druhy hub ze skupiny Basidiomycota, a to jak na lesních, tak na lučních lokalitách. Část byla nalezena pouze u protokormů (např. čeleď Thelephoraceae), část pouze u dospělců *N. ovata* (např. čeleď Tricholomataceae). U *N. cordata* byl zjištěn pouze jediný ECM druh houby, a to *Tylospora fibrillosa*, byla však nalezena opakovaně ve čtyřech jedincích ze tří lokalit. Zjištěno bylo také několik většinou saprotrofních druhů hub ze skupiny Ascomycota, u kterých není známa účast na OM.

Ve dvou protokormech druhu *N. ovata*, jež byly jako jediné získány z lokality *N. cordata* Ztracený rybník, byla zjištěna parazitická houba rodu *Physoderma*.

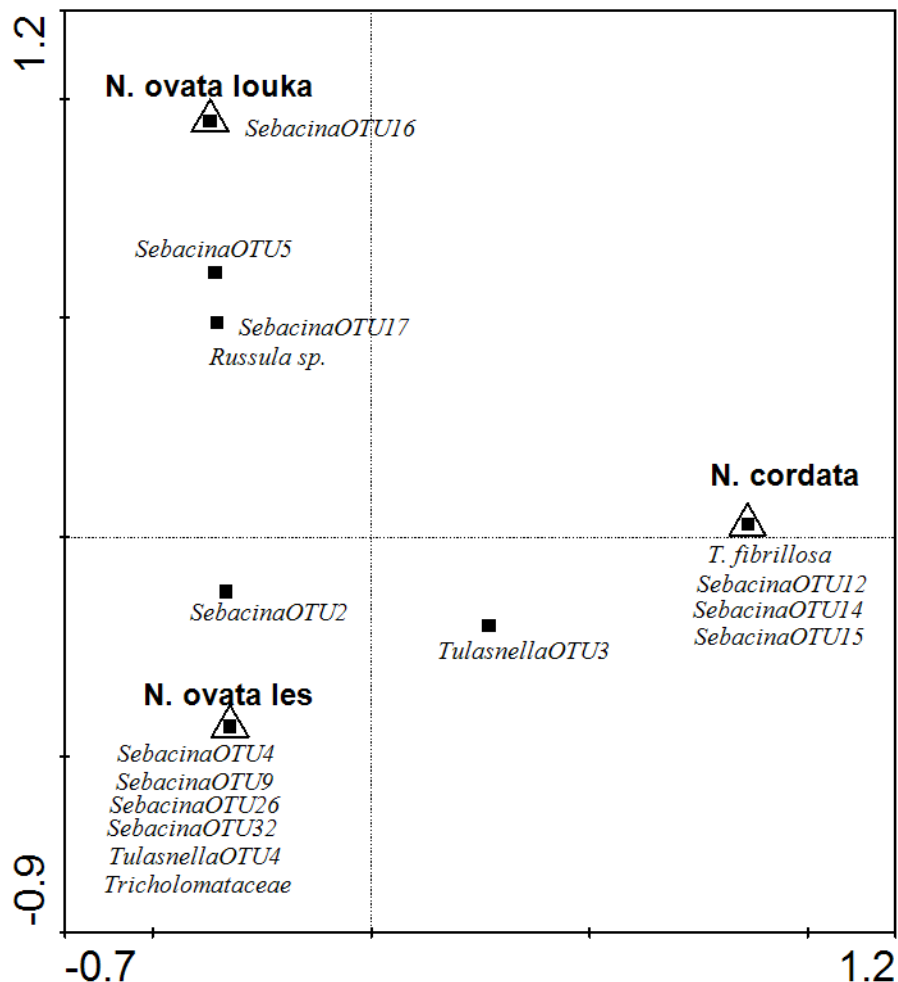
Tab. 4. Druhy hub zjištěné v kořenech dospělých druhů *N. cordata* a *N. ovata* a v protokormech *N. ovata* na jednotlivých lokalitách. Čísla udávají v kolika dospělých jedincích či protokormech byl daný druh houby zjištěn.

U čeledí Sebacinaceae a Tulasnellaceae jsou v závorkách uvedeny čísla OTU zjištěných na jednotlivých lokalitách. **Vysvětlivky:** PAJ počet analyzovaných jedinců; v horní řádce jsou dospělí jedinci, v dolní pak protokormy; **Lokalita:** ZR Ztracený rybník, ZS Ztracená slať, PN Ptačí nádrž, NM Novohuťské močály, BO Boubín, JS Jezerní slať, MD Myší domky, VB Včelná pod Boubínem, VK Vinice louka, LH Louka u Hanzlů, LL Lštění, JK Javorník louka, VS Vinice les, SP Slatinný potok, KP Kepy, NC Nicov, NB Nebe, JL Javorník les; **Pozn.:** B Basidiomycota, Ch Chytridiomycota, A Ascomycota, S Saprofytická, ECM Ectomykorhizní, P Parazitická.

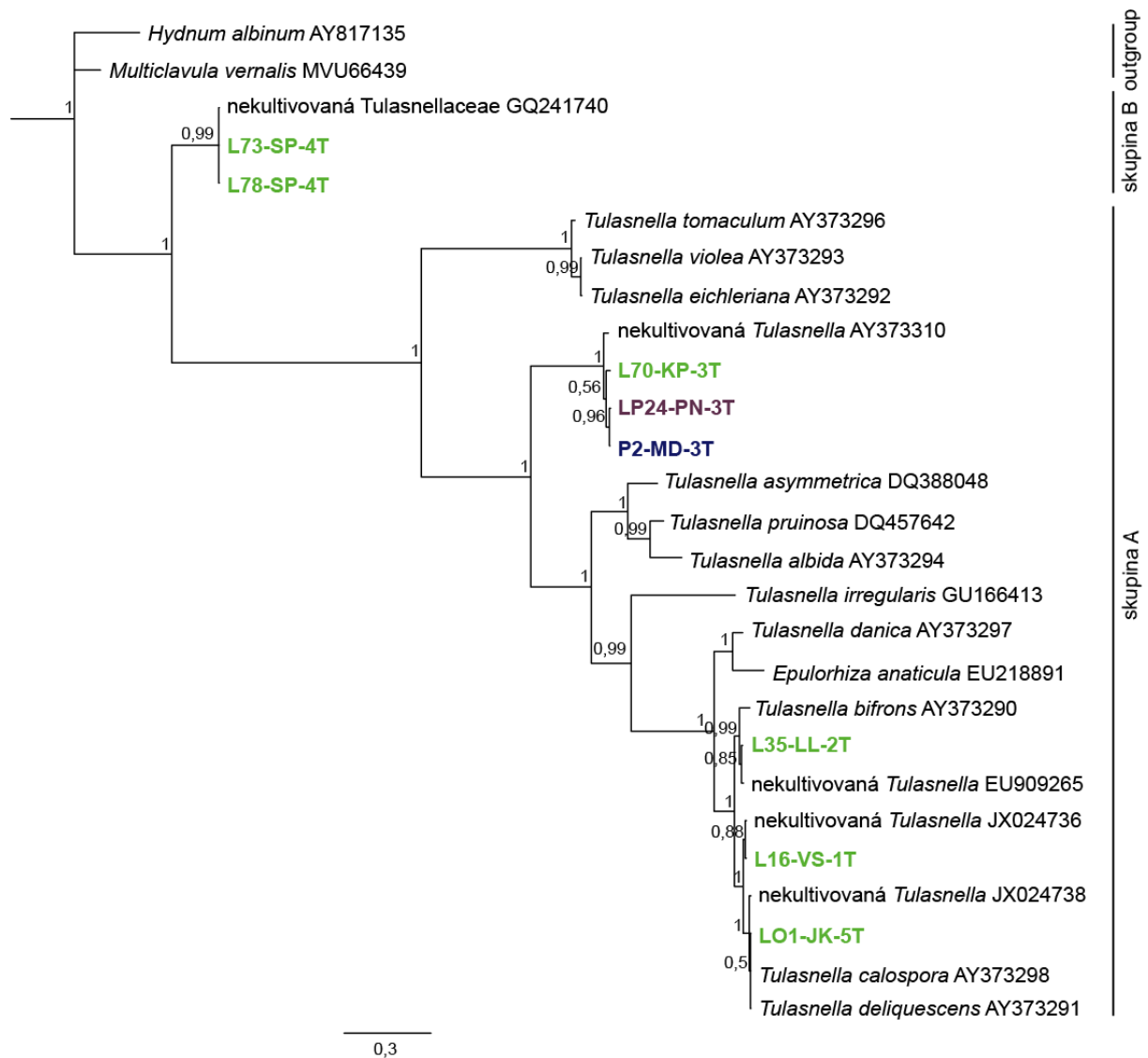
Typ lokality	Lokalita	Pozn.	Sebacinaeae (OTU)	Tulasnellaceae (OTU)	Tylospora fibulosa (B: ECM)	Clavariaceae (B: ECM)	Tricholomataceae (B: ECM)	Russula sp. (B: ECM)	Thelephoraceae (B: ECM)	Entoma sp. (B: S/ECM)	Inocybe flocculosa (B: ECM)	Polyporales (B: S/P)	A: S/ECM	Capnodiales (A: S/P)	Exophiala sp. (A: S)	Alternaria sp. (A: S)	Fusarium sp. (A: S)	Ch: P
<i>N. ovata</i> luční	MD	PAJ 2	2 (17S)	1 (3T)		2							1					Physoderma sp.
	LH	2	2 (17S)	1											1			
	LL	4	4 (2S,5S)	1 (2T)		1												
	JK	4	4 (2S,5S)	1 (5S)										1				
		2	2 (16S,2S)	1 (5T)										1				
		5	3 (2S)							1				2				
		4	3 (4S,5S,17S)	1 (1T)				1						1				
		VS	4	4 (2S,20S)	2 (4T)													
		SP	2	1 (5S)					1									
		KP	4	3 (26S,6S,4S)	1 (3T)				1									
<i>N. ovata</i> lesní	NC	9	5 (2S,11S,26S,5S)							1			1		3			
		2	2 (26S,28S,32S)											1		1		
		4	3 (5S,2S)															
		2	2 (9S,2S)						1									
		JL	2	2 (9S,2S)														
		ZR	3	3 (12S,8S,15S)														
		ZS	2	2 (15S)														
		PN	2	2 (15S)	1 (3T)													
		NM	2	2 (15S)														
		BO	3	2 (12S, 15S)														
	JS	2	2 (14S)															
	ZR	2																2

Tab. 5. OTU čeledi Sebacinaceae zjištěné u dospělců druhu *N. cordata* a protokormů a dospělců druhu *N. ovata* z lesních a lučních stanovišť.

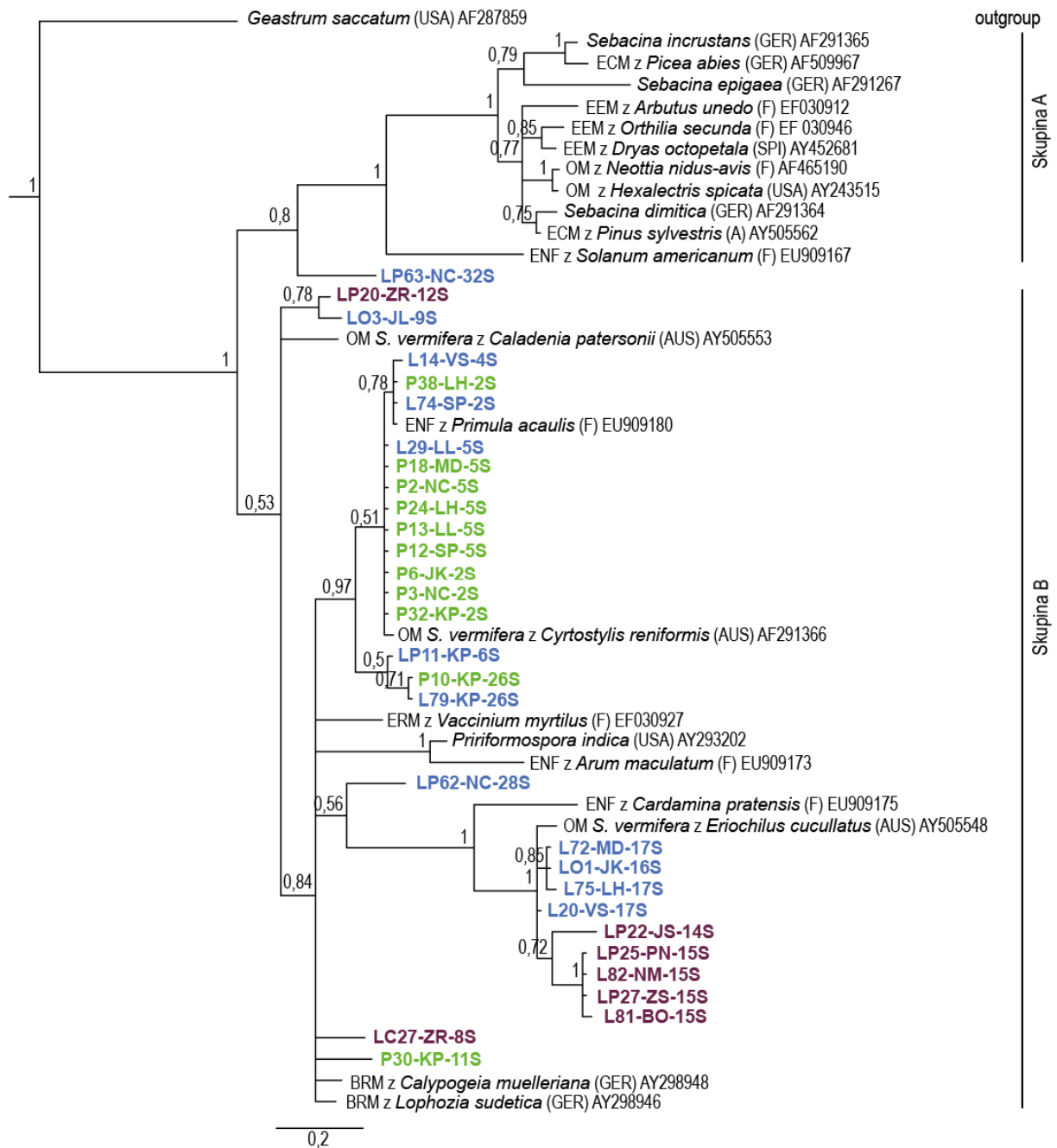
OTU	<i>N. ovata</i> luční		<i>N. ovata</i> lesní		<i>N. cordata</i>
	dospělec	protokorm	dospělec	protokorm	
2S					
4S					
5S					
6S					
8S					
9S					
11S					
12S					
14S					
15S					
16S					
17S					
20S					
26S					
28S					
32S					



Obr. 5. CCA ordinační diagram ukazující rozdílnou diverzitu hub zjištěných u dospělých jedinců druhu *N. cordata* a u dospělých jedinců druhu *N. ovata* na lučních a lesních lokalitách. První dvě osy vysvětlují dohromady 13,2 % druhové variability. Výsledek Monte-Carlo permutačního testu: $p = 0,001$, $F = 2,98$.



Obr. 6. Fylogenetické vztahy jednotlivých OTU z čeledi Tulasnellaceae nalezených u *Neottia ovata* a *N. cordata* a dalších druhů čeledi Tulasnellaceae na základě kompletních sekvencí 5.8S oblasti a části sekvencí 18S a 28S oblastí rDNA zkonstruovaných metodou Bayesiánské inference. Zeleně jsou označeny sekvence získané z kořenů dospělých rostlin druhu *N. ovata*, fialově sekvence získaná z dospělé rostliny *N. cordata* a modře sekvence získaná z protokormu *N. ovata*. V kódu sekvence je obsažena zkratka kódu vzorku (první část před pomlčkou), zkratka lokality (prostřední část mezi pomlčkami) a označení OTU (číslice+T na konci). Zkratky lokalit: SP Slatinný potok, KP Kepy, MD Myší domky, LL Lštění, VS Vinice les, JK Javorník louka, PN Ptačí nádrž.



Obr. 7. Fylogram ukazující vztahy jednotlivých OTU z čeledi Sebacinaceae na základě sekvencí ITS2 a 28S oblastí rDNA zkonstruovaný pomocí Bayesiánské inference. Pro tvorbu fylogramu byly z každé lokality použity všechny OTU na dané lokalitě nalezené, a to jak u dospělců, tak u protokormů (proto se některé OTU opakují). Modře jsou označeny sekvence získané z kořenů dospělých rostlin *N. ovata*, fialově z *N. cordata*; zeleně z protokormů *N. ovata*. Kód vzorků obsahuje zkratku lokality (část mezi pomlčkami) a označení OTU (číslo+S na konci kódu). Rozdělení do funkčních skupin dle Weiss a kol. (2004): skupina A druhy tvořící ECM, B saprotrofitické druhy.

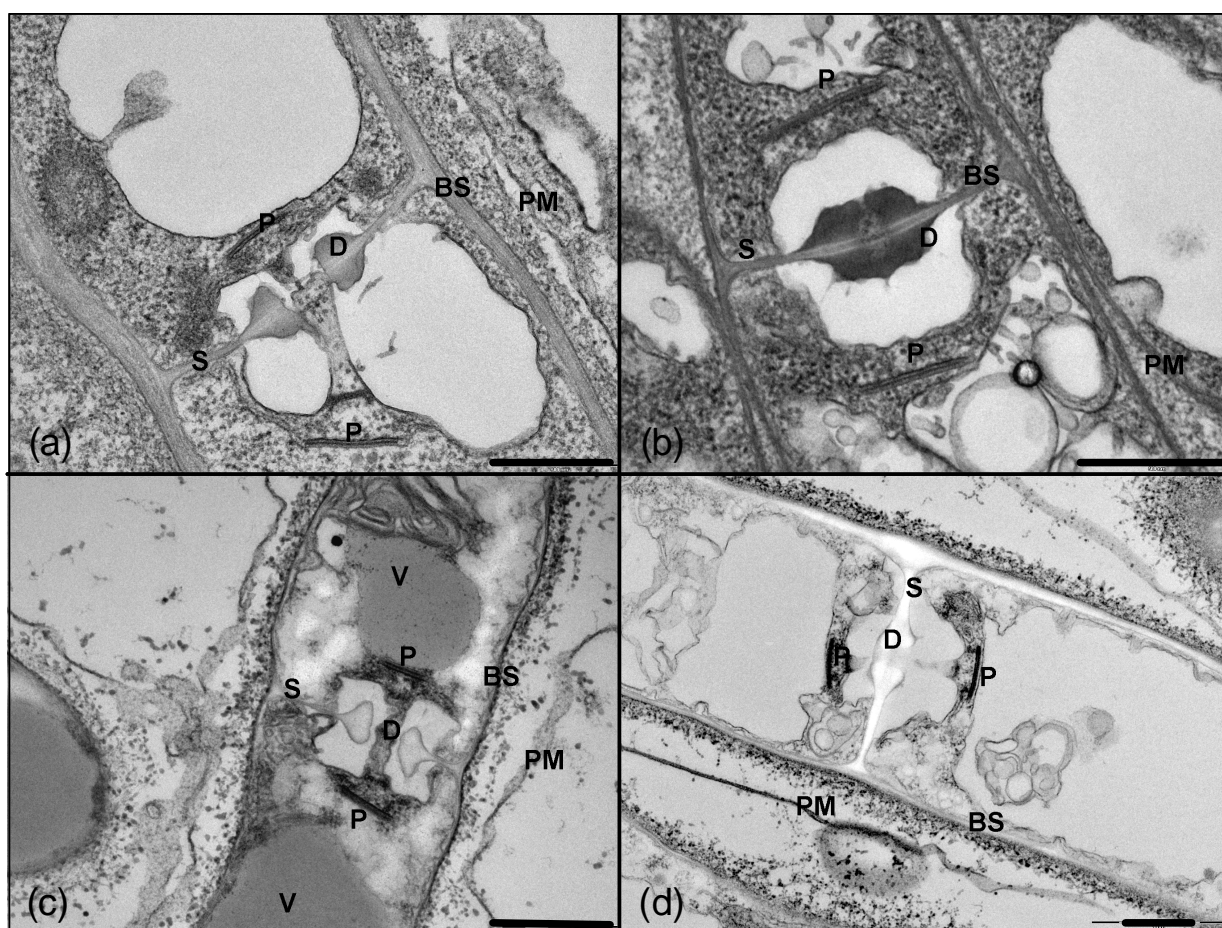
Vysvětlivky: OM orchideoidní mykorrhiza, ERM erikoidní mykorrhiza, EEM ectendomykorrhiza, ECM ectomykorrhiza, BRM mykorrhiza izolovaná z jätrovek (Marchantiophyta), ENF endofyt; F Francie, GER Německo, AUS Austrálie, A Rakousko, USA Amerika, SPI Špicberky.

Zkratky lokalit: ZR Ztracený rybník, JS Jezerní slat', PN Ptačí nádrž, NM Novohuťské močály, ZS Ztracená slat', BO Boubín, NC Nicov, JL Javorník les, VS Vinice les, SP Slatinný potok, KP Keply, LL Lštěn, LH Louka u Hanzlů, JK Javorník louka, MD Myší Domky.

3.3. TEM

Pomocí TEM byla v kořenech obou druhů rodu *Neottia* zjištěna tvorba pelotonů pouze houbami ze skupiny Basidiomycota (Obr. 8.). Houby ze skupiny Ascomycota nebyly nalezeny. Celkem byly prohlédnuty čtyři vzorky, dva pocházely ze dvou jedinců druhu *N. ovata*, dva ze dvou jedinců *N. cordata*. U protokormů se přes úpravu protokolu nepodařila fixace vzorku. Zároveň nemohl být pokus opakován, jelikož jsou pro analýzu potřeba čerstvé vzorky.

Na snímcích je jasně vidět struktura doliporu s parentosomem, jež je typická pro Basidiomycota. Dle struktury parentosomu (je třívrstevný, mezi dvěma propustnými vrstvami je zřetelná vrstva elektronově husté „hmoty“) by se pak dalo předpokládat, že se jedná o houby náležející do čeledi Sebacinaceae (Andersen, 1996; Suárez a kol., 2008; Shimura a kol., 2009).



Obr. 8. Snímky z TEM zachycující hyfová vlákna uvnitř kořene orchidejí druhu *N. cordata* (a, b) a *N. ovata* (c, d). Na snímcích je jasně vidět septum (S) s doliporem (D), což je typický znak pro Basidiomycota. Na obou stranách doliporu můžeme vidět parentosom (P), uvnitř buněk pak vakuolu (V). Pro symbiózu je důležité, aby byla zachována buněčná stěna hyfy (BS) a plasmatická membrána buněk hostitelské rostliny (PS). Měřítka v pravém dolním rohu = 500nm.

4. Diskuse

Průběh klíčení

Při analýze klíčivosti byla zjištěna takřka nulová schopnost klíčení u druhu *N. cordata*, většina semen tohoto druhu odumřela během prvního roku v půdě a nenalezl jsem jediný protokorm. Vzhledem k vysévání semen do blízkosti dospělých jedinců by takový výsledek neměl být způsoben absencí vhodné houby. Vliv na klíčení však můžou mít další faktory, např. sukcesní stádium lesa či typ a množství opadu na povrchu půdy (McCormick a kol., 2012), u *N. cordata* se uvádí potřeba zetlelého dřeva (Procházka, 1980). U tohoto druhu se dá také předpokládat velký podíl vegetativního šíření a k šíření pomocí semen u něj může docházet jen výjimečně. Tomu by odpovídalo i shlukovité rozmístění rostlin na lokalitách.

Důvodem špatné klíčivosti může být i malé procento životaschopných embryí vložených do půdy. V porovnání s *N. ovata* se embrya u semen *N. cordata* jevila mírně deformovaná, zároveň se však stále dala odlišit abortovaná embrya, jež byla výrazně menší (viz Fotopříloha). Vzhledem k deformaci pak nemusela být plně vyvinuta ani větší embrya, či u nich mohlo dojít pouze k částečné abortaci. Příčinou abortace semen může být absence vhodného opylovače a následná autogamie (Jersáková a kol. 2006). Pro *N. cordata* jsou jako opylovači uváděni tiplice *Tipula subnodicornis* a lumčící rodu *Microgaster* sp. (Pijl a Dodson, 1966). Přestože tyto druhy byly zjištěny při výzkumu ve Finsku, vyskytují se i na Šumavě. *N. cordata* je zároveň protandrický, a tudíž allogamický druh, a autogamie je u tohoto druhu velmi nepravděpodobná.

Naproti tomu u druhu *N. ovata* se několik semen vyvinulo až do stádia protokormu, které bylo možné použít pro další analýzy. Množství získaných protokormů je však vzhledem k počtu vyšetřených semen velmi nízké, zvláště v porovnání s dalším u nás běžným druhem orchideje: u *Epipactis helleborine* se protokormy vyskytovaly v 67 % vyjmutých rámečků (Těšitelová T., osobní komunikace), u *N. ovata* se protokormy nacházely pouze v 5,4 % vyjmutých rámečků. Naopak u druhu *E. dunensis* byly protokormy nalezeny v méně než 1 % rámečků (Bidartondo a Read, 2008) a u druhu *E. albensis* nebyly nalezeny žádné protokormy (Těšitelová a kol., 2012). Bidartondo a Read (2008) dále zjistili u *E. atrorubens* 6 % klíčivost a u *Cephalanthera longifolia* 63 % klíčivost, zároveň se do stádia protokormu vyvinulo u obou druhů přibližně 1 % semen. Semena obou druhů byla v půdě ponechána dva roky. U *N. ovata* klíčilo po dvou letech v půdě 8 % semen sazených v roce 2008 a až do stádia protokormu pak za stejně dlouhou dobu dospělo 0,4 % semen. McKendrick a kol. (2002)

zjistili u příbuzného druhu *N. nidus-avis* klíčivost mezi 11 a 29 % u semen sazených v blízkosti dospělých rostlin; zároveň však zjistila takřka nulovou klíčivost na plochách bez dospělého jedince *N. nidus-avis*. Dá se tedy říci, že *N. ovata* má ve srovnání s jinými druhy z tribu Neottieae horší klíčivost a méně semen se u ní vyvine do stádia protokormu. U druhů *E. dunensis* (Bidartondo a Read, 2008) a *E. albensis* (Těšitelová a kol., 2012) byla zjištěna klíčivost horší než u *N. ovata*. U těchto druhů však může špatnou klíčivost působit malá životaschopnost semen v důsledku autogamie.

Klíčení bylo zároveň shlukovité. Většinou v jednom rámečku klíčilo několik protokormů, které pak dosahovaly větších velikostí (Obr. 4), případně klíčící protokormy byly nalezeny v několika rámečcích v jedné skupině. To je způsobeno pravděpodobně mozaikovitým rozšířením vhodných mykorrhizních hub na stanovišti (Diez, 2007), klíčení může silně ovlivňovat i množství symbiotických hub v půdě (McCormick a kol., 2012).

Vzhledem k velké úmrtnosti semen se ani u jednoho ze studovaných druhů nedá předpokládat dlouhodobá semenná banka. U *N. cordata* byla po třech letech všechna semena mrtvá, u *N. ovata* byla po třech letech nalezena pouze 3 % neklíčících živých semen. Whigham a kol. (2006) uvádí, že po pěti letech bylo u druhu *Aplectrum hyemale* ještě cca 70 % semen živých a neklíčících, u druhu *Liparis lilifolia* to pak bylo přibližně 30 % semen. U druhů *E. atrorubens* a *C. longifolia* pak bylo po dvou letech v půdě nalezeno 82 % neklíčících semen živých (Bidartondo a Read, 2008). Ve většině uvedených případů se jedná o lesní druhy orchidejí, u nichž je předpokládána dlouhodobá semenná banka (Whigham a kol., 2006). Semenná banka *N. ovata* a *N. cordata* se však více podobná krátkodobé semenné bance lučních druhů, např. u *Dactylorhiza lapponica* bylo po třech letech v půdě nalezeno pouze 0,2 % živých semen (Øien a kol., 2008).

Také nebyl zjištěn žádný rozdíl v průběhu klíčení mezi semeny *N. ovata* pocházejícími z lesní a z luční lokality. Dá se tak předpokládat, že u druhu *N. ovata* nedošlo ke genetickému přizpůsobení jednotlivých populací prostředí, ve kterém rostou.

Klíčení může být ovlivněno i mnoha dalšími faktory než jen přítomností symbiotické houby, dá se však předpokládat, že na lokalitě s výskytem dospělých rostlin by měly panovat vhodné podmínky pro klíčení. Špatná klíčivost tak může být způsobena i manipulací se semeny, kdy mnou nezjištěný faktor může snižovat klíčivost. Mnou sebraná semena v průběhu července byla následně uskladněna v chladničce při teplotě 4 °C. Poté byly připraveny rámečky pro výsev semen a do nich vložena semena. Rámečky se semeny již byly uchovávány při pokojové teplotě. Rámečky se semeny pak byly na lokalitách sazeny v průběhu září. Při porovnání s přístupem dalších autorů se dají najít dva rozdíly v manipulaci

se semeny. U žádného autora jsem nenašel zmínku o skladování v chladu (např. McKendrick a kol., 2000b; McKendrick a kol., 2002; Diez, 2007; Bidartondo a Read, 2008). Všichni autoři pak používali stejnou metodu výsevu semen v rámečkách. Doba mezi sběrem semen a vložením rámečků se pak značně liší: zatímco McKendrick a kol. (2002) vložili všechny rámečky do půdy do čtyř dnů od sebrání semen, jiným autorům to již trvalo přibližně jeden (Bidartondo a Read, 2008) až dva měsíce (Diez, 2007). Zdá se tedy, že pokud vůbec byla malá klíčivost semen způsobena špatnou manipulací s nimi, mohlo to způsobit jediné skladování v chladničce, jež by bylo tedy možná vhodné v dalších studiích vynechat. Skladování semen v ledničce se však běžně praktikuje.

Analýza mykorhizních partnerů

Při analýze symbiotických hub v kořenech dospělých rostlin obou zkoumaných druhů byly jako dominantní zjištěny houby ze skupiny ‚rhizoctonia‘. To odpovídá dřívějším poznatkům, které získali Downie (1959) a Rasmussen a kol. (1991). Převládají druhy čeledi Sebacinaceae, čeleď Tulasnellaceae je pak zastoupena méně. Druhy čeledi Sebacinaceae se pak dají považovat za skutečné mykorhizní partnery obou druhů, a to vzhledem k výsledkům TEM. Během TEM byly uvnitř buněk kořenů zjištěny hyfy obklopené neporušenou plasmatickou membránou kořenových buněk – znak odlišující mykorhizní houby od parazitických. Zároveň tyto hyfy vzhledem ke znakům ve stavbě dolipóru a parentosomu patří houbám z čeledi Sebacinaceae (Andersen, 1996; Suaréz a kol., 2008; Shimura a kol., 2009) (Obr. 8).

Jak u *N. ovata*, tak u *N. cordata* bylo zjištěno vlastní spektrum mykorhizních partnerů, jež se vzájemně nepřekrývá. Jedinou výjimkou je OTU 3T náležející do čeledi Tulasnellaceae (Obr. 6). U druhu *N. ovata* bylo nalezeno širší spektrum OTU čeledi Sebacinaceae u lesních lokalit. Rozdíl ve druhových spektrech mezi *N. ovata* a *N. cordata* může ukazovat na určitou specializaci, kdy i blízké příbuzné druhy mohou mít rozdílné symbiotické houby a jejich spektra se nepřekrývají (Taylor a Bruns, 1999). Vzhledem k nedostatečným výsledkům pokusu s klíčením semen se však nedá odlišit vliv biotopu a druhu rostliny. Takřka nulová klíčivost semen *N. ovata* na lokalitách *N. cordata* pak může mít dvě vysvětlení: 1) na lokalitě nebyly vhodné OTU čeledi Sebacinaceae; 2) klíčení bylo inhibováno nějakým jiným biotickým či abiotickým faktorem. Mé výsledky jsou pak nedostatečné pro potvrzení či vyvrácení některého u nich.

Čeleď Sebacinaceae se dělí na dvě skupiny. Skupinu A tvoří druhy tvořící ECM (Selosse a kol., 2002; Urban a kol., 2002; Avis a kol., 2003; Moyersoen, 2006; Tedersoo a

kol., 2006) a známé rovněž z některých MH (McKendrick a kol., 2002; Selosse a kol., 2002; Taylor a kol., 2003; Okayama a kol., 2012) a MX (Selosse a kol., 2004; Julou a kol., 2005) orchidejí. Skupina B je pak tvořena saprotrofními druhy hub, jež byly izolovány kromě OM i z erikoidní mykorrhizy (Selosse a kol., 2007) či z mykorrhizy některých druhů jätrovek (Kottke a kol., 2003). U orchidejí pak byly druhy skupiny B izolovány z některých drobných australských druhů orchidejí jako je *Cyrostylis reniformis*, *Eriochilus cucullatus* (Weiss a kol., 2004; Bougoure a kol., 2005) či druhy rodu *Caladenia* (Swarts a kol., 2010). V Evropě pak Girlanda a kol. (2011) velmi vzácně izolovali druhy skupiny B z kořenů lučních orchidejí *Anacamptis laxiflora* a *Serapias vomeracea*, u nichž však dominantními symbionty byly druhy z čeledi Tulasnellaceae a Cerayobasidiaceae. Do Sebacinaceae skupina B patří i sekvence izolované z *N. ovata* a *N. cordata*. Jedná se tak o první zjištění hub ze saprotrofické skupiny B u evropských orchidejí rostoucích v lese, u kterých jsou zároveň Sebacinaceae skupina B dominantními mykorrhizními symbionty.

Čeď Tulasnellaceae byla zjištěna jak na lučních, tak na lesních lokalitách. Jednou byla také zjištěna u druhu *N. cordata* (OTU 3T). Jedná se o jediného zjištěného společného mykorrhizního partnera *N. ovata* a *N. cordata*. Tato OTU byla také jako jediná OTU čeledi Tulasnellaceae izolovaná z protokormu druhu *N. ovata*. To může být způsobeno větším geografickým rozšířením této OTU. Zjištění hub čeledi Tulasnellaceae na lesních i na lučních lokalitách odpovídá výsledkům analýzy u rodu *Cypripedium* (Shefferson a kol., 2005), kdy byly rovněž zjištěny jak na lučních, tak na lesních lokalitách. Dá se tedy říci, že houby čeledi Tulasnellaceae, jež jsou nejrozšířenější u lučních druhů orchidejí a u epifytických druhů (Dearnaley, 2007), se vyskytují i druhů, jež kromě lučních biotopů osídlují i světlá lesní stanoviště.

Z dalších druhů hub, izolovaných jak z dospělců obou druhů tak z protokormů, patří většina mezi druhy hub tvořící ECM. I zde můžeme vidět rozdíl mezi oběma studovanými druhy orchidejí. Zatímco u *N. cordata* byla z ECM druhů zjištěna pouze *Tylospora fibrillosa*, u dospělců *N. ovata* byly zjištěny dva druhy ECM hub a u protokormů *N. ovata* tři (Tab. 4). *Tylospora fibrillosa* je druh často tvořící ECM u *Picea abies* (Peter a kol., 2008). Z ECM hub nalezených u dospělců *N. ovata* jsou oba, *Russula* sp. a Tricholomataceae, typické pro některé MH druhy orchidejí; např. severoamerické příslušníky rodu *Corallorhiza* (Taylor a Bruns 1999) či evropské *Limodorum abortivum* (Girlanda a kol., 2006). Zároveň byly tyto druhy ECM hub izolovány i z některých MX druhů orchidejí (Bidartondo a Read, 2008). Vzhledem k nálezům ECM druhů hub v kořenech obou studovaných druhů orchidejí by se dal předpokládat jejich posun k MX. Tento posun však není podpořen výsledky izotopových

analýz (Gebauer a Meyer, 2003; Tedersoo a kol., 2007; Kotlínek, 2010). Pro *N. ovata* byl vypočítán zisk uhlíku z mykorhizní houby mezi 20 % (Tedersoo a kol., 2007) a 27 % (Gebauer a Meyer, 2003). Ten však není považován za průkazný pro MX (Tedersoo a kol., 2007; Gebauer a Meyer, 2003). Gebauer a Meyer (2003) pokládali za prokazatelný pouze 85 % zisk uhlíku u druhu *Cephalanthera domasonium* (u jiného druhu orchideje nezjistili zisk větší než 30 %), Tedersoo a kol. (2007) pokládali za průkazný již zisk 37,6 % u druhu *Pyrola chlorantha*, z jimi zkoumaných druhů orchidejí byl za průkazný pokládán zisk 60,1 % u *Platanthera bifolia* a 62,6 % u *Epipactis atrorubens*. Oba mnou studované druhy tak od ECM hub získávají patrně jen minerální látky, případně pouze minimální množství uhlíku těžko zjištělné analýzou stabilních izotopů.

Během analýzy symbiotických hub bylo zjištěno i několik druhů patřících do skupiny Ascomycota. Z nich pak příslušníci skupiny Pezizomycotina, jež byli zjištěni u pěti protokormů, jednoho dospělce *N. ovata* a jednoho dospělce *N. cordata*, byli izolováni z kořenů orchidejí rodu *Epipactis* (Selosse a kol., 2004; Bidartondo a kol., 2004; Ogura-Tsujita a Yukawa, 2008; Těšitelová a kol., 2012), jež patří do stejného tribu jako rod *Neottia*. Houby skupiny Ascomycota však nebyly během TEM zjištěny uvnitř buněk kořenů ani jednoho ze studovaných druhů. Nedá se tak s jistotou říci, že se jedná o symbiotické druhy vázané s druhy rodu *Neottia*. Z dalších druhů ze skupiny Ascomycota, jež byly z kořenů obou druhů a z protokormů *N. ovata* nalezeny, jsou všechny považovány za endofyty, jež občas bývají izolováni z kořenů orchidejí (Ogura-Tsujita a Yukawa, 2008; Kohout a kol., in press).

Ze dvou protokormů *N. ovata*, které byly získány jako jediné z lokality *N. cordata*, byla izolována houba rodu *Physoderma*. Tato houba patří do skupiny Chytridiomycota. Do rodu *Physoderma* pak řadíme fytoparazitické druhy jako *Physoderma maydis* (hnědá skvrnitost kukuřice) či *Physoderma alfalfae* (nádory na kořenech a stoncích vojtěšky). Tato houba se tak nedá velice pravděpodobně považovat za symbiotickou. V části protokormů získaných z lokalit *N. ovata* také nebyly nalezeny žádné OTU z čeledi Sebacinaceae a byly nalezeny pouze ECM (8 % protokormů) či endofytické (15 % protokormů) druhy hub. Přesto, že všechny analyzované protokormy byly živé, je možné, že tyto druhy hub byly semenem chybně rozpoznány jako symbiotické a nevedly by k dalšímu vývoji rostliny (Bidartondo a Read 2008).

Při porovnání druhového spektra mezi protokormy a dospělci zjišťujeme, že v protokormech bylo zjištěno téměř stejně široké spektrum hub jako v dospělci, ale mezi četnostmi pozorování jednotlivých druhů naprosto dominuje čeleď Sebacinaceae. Zároveň ne všechny houby izolované z protokormů musí nutně umožňovat kompletní vývoj rostliny a

v budoucnu by mohlo dojít k úhynu semenáčků (Bidartondo a Read, 2008). To platí především pro ECM druhy hub zjištěné u protokormů, z nichž žádný nebyl zjištěn zároveň u dospělých jedinců *N. ovata*. To však může být způsobeno malým počtem analyzovaných vzorků. Při pohledu na spektrum OTU čeledi Sebacinaceae zjištěných u protokormů (Tab. 5) se zdá, že jsou zde dominantní dvě OTU (2S, 5S) bez ohledu na OTU zjištěné u dospělých rostlin na stejné lokalitě. Jedná se také o dvě nejčastěji zjišťované OTU při analýze dospělců. Je tedy možné, že semena klíčí hlavně s úzkým spektrem široce rozšířených druhů a až v dospělosti dochází ke kolonizaci kořenů dalšími druhy. To by pak u tohoto druhu mohlo snižovat úmrtnost semenáčků během vývoje a alespoň částečně kompenzovat minimální klíčivost. Zároveň specializace na široce rozšířený druh by částečně řešila problém s hledáním vhodné houby, jež je popisován u úzce specializovaných druhů orchidejí (Bonnardeaux a kol., 2007).

5. Závěr

Během analýzy kořenů dospělých rostlin druhů *N. ovata* a *N. cordata* a protokormů druhu *N. ovata* byly jako dominantní zjištěny houby ze saprotrofické skupiny B čeledi Sebacinaceae. Jedná se o první zjištění hub z této skupiny u lesních druhů orchidejí. Dále byla zjištěna velká úmrtnost semen obou druhů a zároveň jejich velmi malá klíčivost. U *N. cordata* pak byla klíčivost takřka nulová. Tyto výsledky pokusu s klíčením neumožnily zjistit mykorhizní asociace *N. cordata* během klíčení. Zároveň nebylo možné odlišit vliv mykorhizních hub na rozšíření *N. ovata* a *N. cordata* od dalších biotických a abiotických faktorů.

Další výzkum by bylo vhodné směřovat na objasnění nulové klíčivosti u druhu *N. cordata* a na zjištění podílu vegetativního rozmnožování na šíření tohoto druhu. Vhodnou metodou pro studium klíčivosti by bylo klíčení *in vitro* ve spojení s houbami zjištěnými u dospělých rostlin a následně izolovanými do kultury. U druhu *N. ovata* by bylo vhodné zjistit spektrum hub v průběhu celé ontogeneze. To by umožnilo jednoznačně identifikovat druhy umožňující vývoj rostliny od protokormu po dospělce. Zároveň by bylo velmi zajímavé pokusit se o izolaci houbové DNA z půdy v blízkosti rámečků se semeny a tak potvrdit či vyvrátit přítomnost vhodných symbiotických hub na jednotlivých lokalitách. Rovněž by bylo vhodné porovnat půdní vlastnosti. Takovýto přístup by mohl jasněji rozlišit, zda jsou za absencí klíčení a tvorby protokormů nevhodné abiotické podmínky prostředí nebo absence vhodných mykorhizních hub.

6. Literatura

- Abadie J-C, Püttsepp Ü, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse M-A.** 2006. *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) in mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Canadian Journal of Botany* 84: 1462-1477.
- Akaike H.** 1974. "New look at statistical-model identification". *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Andersen TF.** 1996. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycological Research* 100: 1117-1128.
- Avis PG, McLaughlin DJ, Dentinger BC, Reich PB.** 2003. Long-term increase in nitrogen supply alters above- and below-ground ectomycorrhizal communities and increases the dominance of *Russula spp.* in a temperate oak savanna. *New Phytologist* 160: 239-253.
- Barrett CF, Freudenstein JV, Taylor DL, Kõljalg U.** 2010. Rangewide analysis of fungal associations in the fully mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* complex (Orchidaceae) reveals extreme specificity on ectomycorrhizal *Tomentella* (Thelephoraceae) across North America. *American Journal of Botany* 97: 628–643.
- Bates D, Maechler M, Bolker B.** 2011. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. R package version 0.999375-38.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett M, Sivasithamparan K.** 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytologist* 152: 511-520.
- Bernard N.** 1909. L'évolution dans la symbiose des orchideés et leur champignons commensaux. *Annales des Sciences Naturelle Paris*, 9. sér., 9: 1-196.
- Bernard N.** 1911. Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydées. *Annales des Sciences Naturelle Paris*, 9. sér., 14: 221.
- Bidartondo MI.** 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist* 167: 335-352.
- Bidartondo MI, Read DJ.** 2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* 17: 3707-3716.
- Bidartondo MI, Bruns TD, Weiss M, Sergio C, Read DJ.** 2003. Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 835-842.
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ.** 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liasons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society B* 271: 1799-1806.
- Björkman E.** 1960. *Monotropa hypopitys* L. – an epiparasite on tree roots. *Physiologia Plantarum* 13: 308-327.

- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K.** 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research* 111: 51-61.
- Bougoure J, Ludwig M, Brundrett M, Grirson P.** 2009. Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. *Mycological Research* 113: 1097-1106.
- Bruns TD.** 1995. Thoughts on the processes that maintain local species-diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 170: 63–73.
- Burgeff H.** 1909. *Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihre Leben in der Pflanze*. Gustav Fischer, Jena, NSR.
- Burgeff H.** 1932. *Saprotrophytismus und Symbiose. Studien an tropischen Orchideen*. Gustav Fisher, Jena, NSR.
- Burgeff H.** 1936. *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihren Keimpflanzen*. Gustav Fisher, Jena, NSR.
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ.** 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist* 171: 405-416.
- Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR.** 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* 180: 176-184.
- Cribb PJ, Kell SP, Dixon KW, Barrett RL.** 2003. Orchid conservation: a global perspective. *Natural History Publications*, Kota Kinabalu, Malaysia. pp 1-24.
- Darwin C.** 1862. *On the Various Contrivances by which British and Foreign Orchids are Fertilized by Insects, and on the Good Effects of Intercrossing*. John Murray, London, UK.
- Dearnaley JDW.** 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486.
- Dearnaley JDW, Bougoure JJ.** 2010. Isotopic and molecular evidence for saprotrophic Marasmiaceae mycobionts in rhizomes of *Gastrodia sesamoides*. *Fungal ecology* 3: 288-294.
- Diez MJ.** 2007. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology* 95: 159-170.
- Downie DG.** 1959. *Rhizoctonia solani* and orchid seed. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh* 37: 279.
- Dressler RL.** 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, USA.
- Dressler RL.** 2004. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Gardes M.** 2002. An orchid-fungus marriage-physical promiscuity, conflict and cheating. *New Phytologist* 154: 4-6.
- Gardes M, Bruns TD.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gebauer G, Meyer M.** 2003. ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160: 209-223.

- Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodda M, Ercole E, Cozzolino S, Gebauer G, Perotto S.** 2011. Photosynthetic mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany* 98: 1148–1163. 2011.
- Girlanda M, Selosse M-A, Cafasso D, Brilli F, Delfine S, Fabbian R, Ghignone S, Pinelli P, Segreto R, Loreto F, Cozzolino S, Perotto S.** 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorun abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* 15: 491-504.
- Gryndler M, Baláž M, Hršelová H, Jansa J, Vosátka M.** 2004. *Mykorhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin*. ACADEMIA, Praha, ČR.
- Hall TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hughes KW, Petersen RH, Lickey EB.** 2009 . Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist* 182: 795-798.
- Hynson NA, Mambelli S, Amend AS, Dawson TE.** 2012. Measuring carbon gains from fungal networks in understory plants from the tribe Pyroleae (Ericaceae): a field manipulation and stable isotope approach. *Oecologia* 169: 307–317.
- Jersáková J, Malinová T.** 2007. Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176: 237-241.
- Jersáková J, Johnson SD, Kindelmann P.** 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* 81: 219-235.
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A.** 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* 166: 639-653.
- Katoh F.** 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26: 1899-1900.
- Kennedy AH, Taylor DL, Watson LE.** 2011. Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic *Hexalectris* Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Molecular Ecology* 20: 1303–1316.
- Kohout P, Těšitelová T, Roy M, Vohník M, Jersáková J.** 2012 A diverse fungal community associated with *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) roots. *Fungal Ecology*, in press.
- Kotlínek M.** 2010. Je rozšíření orchidejí limitováno rozšířením jejich mykorhizních partnerů? [Is orchid distribution limited by their mycorrhizal associations? Bc. Thesis, in Czech]. – 25p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Kottke I, Beiter A, Weiß M, Haug I, Oberwinkler F, Nebel M.** 2003. Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatics: Jungermanniales have sebacinoic mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. *Mycological Research* 107: 957-968.

- Kottke I, Suarez JP, Herrera P, Cruz D, Bauer R, Haug I, Garnica S.** 2010. Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 1289-1298.
- Látalová K, Baláž M.** 2010. Carbon nutrition of mature green orchid *Serapias strictiflora* and its mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp.. *Biologia Plantarum* 54: 97-104.
- Leake JR.** 1994. The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytologist* 127: 171-216.
- Liebel HT, Gebauer G.** 2011. Stable isotope signatures confirm carbon and nitrogen gain through ectomycorrhizas in the ghost orchid *Epipogium aphyllum* Swartz. *Plant Biology* 13: 270-275.
- Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fomel J, Dubois M-P, Selosse M-A.** 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* 184: 668-681.
- Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito S-I, Selosse M-A.** 2012. Seasonal and environmental changes of mycorrhizal association and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) growing under different light environments. *American Journal of Botany* 99: 1177-1188.
- Mabberley DJ.** 1997. *The plant book*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- McCormick MK, Whigham DF, O'Neill J.** 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163: 425-438
- McCormick MK, Whigham DF, Sloan D, O'Malley K, Hodkinson B.** 2006. Orchid-fungus fidelity: A marriage meant to last? *Ecology* 87: 903-911.
- McCormick MK, Taylor DL, Juhaszova K, Burnett RK, Whigham DF, O'Neill JP.** 2012. Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. *Molecular Ecology* 21: 1511-1523.
- McKendrick SL, Leake JR, Read DJ.** 2000a. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* 145: 539-548.
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ.** 2000b. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 145: 523-537.
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ.** 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp.. *New Phytologist* 154: 233-247.
- Merckx V, Freudstein JV.** 2010. Evolution of myco-heterotrophy in plants: a phylogenetic perspective. *New Phytologist* 185: 607-610.
- Motomura H, Selosse M-A, Martos F, Kagawa A, Yukawa T.** 2010. Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 106: 573-581.
- Moyersoen B.** 2006. Pakaraimaea dipterocarpacea is ectomycorrhizal, indicating an ancient Gondwanaland origin for the ectomycorrhizal habit in Dipterocarpaceae. *New Phytologist* 172: 753-762.

- O'Donnell K.** 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW and eds. *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CAB International, Wallingford, USA. pp 225-233
- Okayama M, Yamato M, Yagame T, Iwase K.** 2012. Mycorrhizal diversity and specificity in *Lecanorchis* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*: DOI 10.1007/s00572-012-0429-z.
- Ogura-Tsujita Y, Yukawa T.** 2008. *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan. *Mycorrhiza* 18: 331-338.
- Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Tomohisa Y.** 2009. Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society B* 276: 761-767.
- Øien D-I, O'Neill JP, Whigham DF, McCormick MK.** 2007. Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid *Dactylorhiza lapponica* (Orchidaceae). *Annals Botanic Fennici* 45: 161-172.
- Otero JT, Flanagan NS, Herre EA, Ackerman JD, Bayman P.** 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94: 1944-1950.
- Peter M, Ayer F, Cudlín P, Egli S.** 2008. Belowground ectomycorrhizal communities in three Norway spruce stands with different degrees of decline in the Czech Republic. *Mycorrhiza* 18:157-169.
- Phillips RD, Barrett MD, Dixon KW, Hopper SD.** 2011. Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *Journal of Ecology* 99: 858–869.
- Pijl L van der, Dodson CH.** 1966. *Orchid flowers, their pollination and evolution*. Miami, Florida.
- Procházková F.** 1980. *Naše orchideje*. Krajské muzeum východních Čech, Pardubice, ČR.
- Peřkan-Berghöfer T, Shahollari B, Giong PH, Hehl S, Markert C, Blanke V, Kost G, Varma A, Oelmüller R.** 2004. Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant–microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum* 122: 465-477.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team.** 2011. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-98.
- R development core team.** 2006. *R: A language and environment for statistical computing*. Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Website <http://www.R-project.org>
- Ramírez SR, Gravendeel B, Singer RB, Marchall AR, Pierce NE.** 2007. Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature* 448: 1042-1045.
- Rasmussen HN.** 1995. *Terrestrial Orchid: From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rasmussen HN, Whigham DF.** 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany* 80: 1374-1378.
- Rasmussen HN, Whigham DF.** 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154: 797-807.

- Rasmussen HN, Johansen B, Andersen TF.** 1991. Symbiotic *in vitro* culture of immature embryos and seeds from *Listera ovata*. *Lindleyana* 6: 134-139.
- Ronquist F, Teslenko M, Mark P van der, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP.** 2011. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542.
- Sarkar D.** 2008 *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. Springer, New York.
- Selosse M-A, Roy M.** 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* 14: 64-70.
- Selosse M-A, Dubois M-P, Alvarez N.** 2009. Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research* 113: 1062-1069.
- Selosse M-A, Weiß M, Jany JL, Tillier A.** 2002. Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. And neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* 11: 1831-1844.
- Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P.** 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including Truffles. *Microbial Ecology* 47: 416-426.
- Selosse M-A, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C, Weiss M.** 2007. Sebaciales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864-878.
- Shefferson RP, Weiss M, Kull T, Tayllor DE.** 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* 14: 613-626.
- Shimura H, Sadamoto M, Matsuura M, Kawahara T, Naito S, Koda Y.** 2009. Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetically distinct fungi associated with the orchid. *Mycorrhiza* 19:525–534.
- Smith SE, Read DJ.** 2008. *Mycorrhizal symbiosis, third edition*. Academic Press, New York, USA.
- Sommer J, Pausch J, Brundrett MC, Dixon KW.** 2012. Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian orchids. *American Journal of Botany* 99: 1133–1145.
- Stöckel M, Meyer C, Gebauer G.** 2011. The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *Cephalanthera damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. *New Phytologist* 189: 790–796.
- Suárez JP, Weiß M, Abele A, Oberwinkler F, Kottke I.** 2008. Members of Sebaciales subgroup B form mycorrhizae with epiphytic orchids in a neotropical mountain rain forest. *Mycological Progress* 7:75–85.
- Swartz ND, Sinclair EA, Francis A, Dixon KW.** 2010. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology* 19: 3226–3242.
- Tanabe AS.** 2011. Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Molecular Ecology Resources* 11: 914-921.

- Tavaré S.** 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57-86.
- Taylor DL, Bruns TD.** 1999. Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719-1732.
- Taylor DL, McCormick MK.** 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 117: 1020-1033.
- Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ.** 2002. *Mycorrhizal specificity and function in mycoheterotrophic plants. The Ecology of Mycorrhizas.* Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 375–413.
- Taylor DL, Bruns TD, Szaro TS, Hodges SA.** 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a non-photosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany* 90: 1168-1179.
- Tedersoo L, Suvi T, Larsson E, Kõljalg U.** 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycological Research* 110: 734-748.
- Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse M-A.** 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* 151: 206-217.
- Ter Braak CJF, Šmilauer P.** 2002. *Canoco reference manual and CanoDraw for Windows. User's guide: Software for Canonical Community Ordination, version 4.5.* Microcomputer Power, Ithaca, New York, USA.
- Těšitelová T, Těšitel J, Jersáková J, Říhová G, Selosse M-A.** 2012. Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *American Journal of Botany* 99: 1020–1032.
- Urban A, Weiß M, Bauer R.** 2003. Ectomycorrhizae involving sebacinoid mycobionts. *Mycological Research* 107: 3-14.
- Wang B, Qui Y-L.** 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- WCSP.** 2012. World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available at: <http://apps.kew.org/wcsp/>. Accessed 5.12.2012.
- Weiss M, Selosse M-A, Rexer K-H, Urban A, Oberwinkler F.** 2004. Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research* 108: 1003-1009.
- Whigham DF, O'Neill JP, Rasmussen HN, Caldwell BA, McCormick MK.** 2006. Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent in situ seed banks. *Biological Conservation* 129: 24-30.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, USA. 315–322 pp.
- Xu Q, Liu Y, Wang X, Gu H, Chen Z.** 1998. Purification and characterization of novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 899-905.

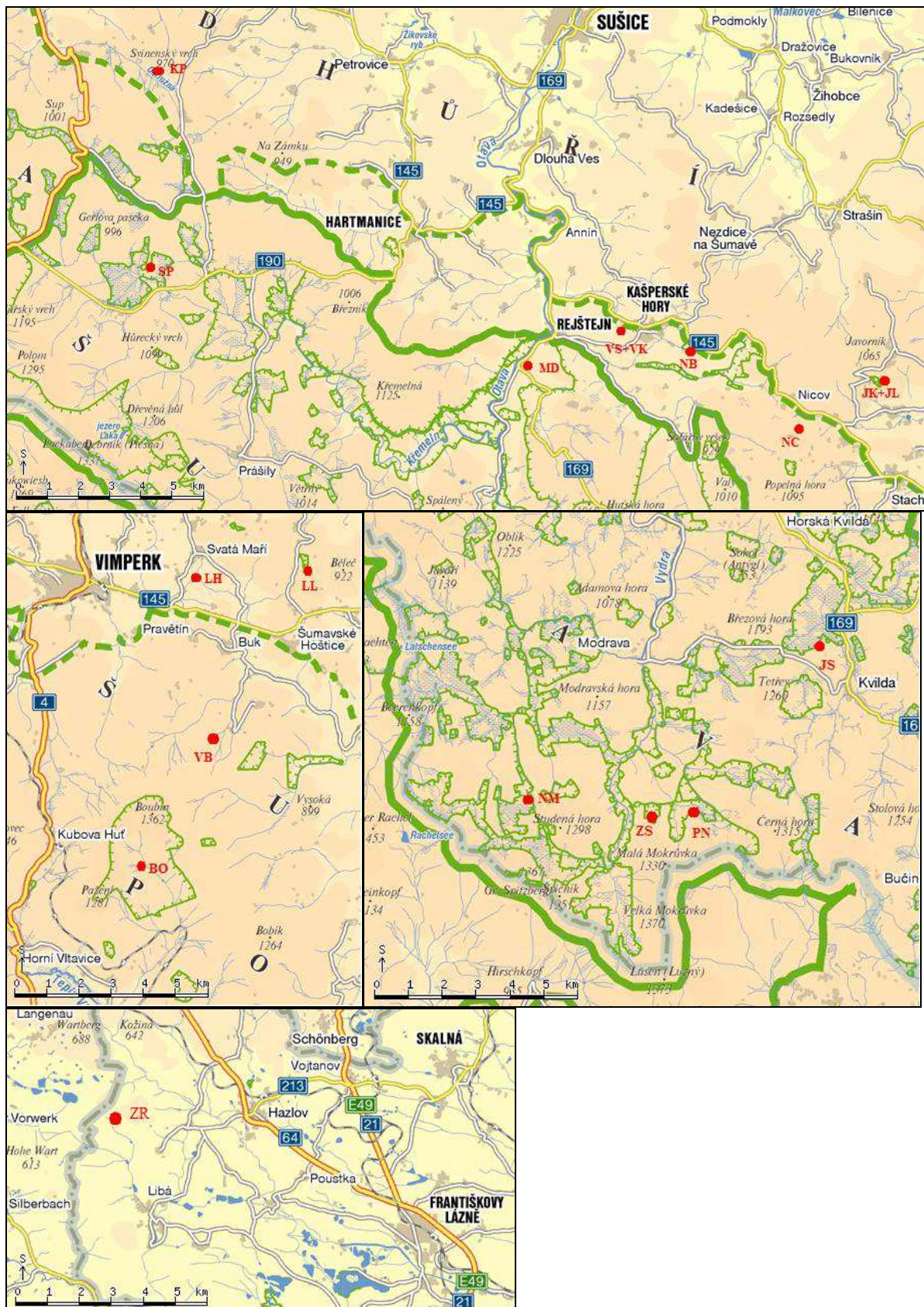
Yang Z. 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *Journal of Molecular Evolution* 39: 306-314.

Zharkikh A. 1994. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 39: 315-329.

7. Přílohy

Příloha I.

Rozmístění lokalit (Zdroj map www.mapy.cz)



Seznam lokalit

Neottia ovata – luční

- Vinice louka (VK) – GPS N49°08,632' E13°31,916'
Javorník louka (JK) – GPS N49°07,742' E13°39,548'
Myší domky (MD) – GPS N49°08,003' E13°30,184'
Louka u Hanzlů (LH) – GPS N49°03,479' E13°49,848'
Včelná pod Boubínem (VB) – GPS N49°00,791' E13°50,410'
Lštění (LL) – GPS N49°03,681' E13°52,699'

Neottia ovata – lesní

- Slatinný potok (SP) – GPS N49°09,288' E13°19,964'; starý smrkový les
Keply (KP) – GPS N49°12,719' E13°20,523'; mladý smrkový les
Vinice les (VS) – GPS N49°08,813' E13°31,811'; porost listnatých náletových dřevin
Javorník les (JL) – GPS N49°07,760' E13°39,522'; smíšený sukcesní les
Nicov (NC) – GPS N49°06,882' E13°37,463'; smrkový les s příměsí javoru
Nebe (NB) – GPS N49°08,343' E13°34,689'; dvě části: 1) porost listnatých náletových dřevin; 2) starý smrkový les

Neottia cordata

- Boubín (BO) – GPS N48°58,536' E13°48,466'
Novohuťské močály (NM) – GPS N48°59,039' E13°26,718'
Jezerní slat' (JS) – GPS N49°01,802' E13°34,034'
Ptačí nádrž (PN) – GPS N48°59,075' E13°30,794'
Ztracená slat' (ZS) – GPS N48°58,956' E13°30,075'
Ztracený rybník (ZR) – GPS N50°09,373' E12°12,743'

Příloha II.

Příprava vzorku kořenů pro TEM

-2,5% GA v 0,2M kakodilátovém pufru	nejméně 4 hod.
-vypírací roztok	3x15 min.
-pufr + 4% roztok OsO ₄ 1:1	4 hod.
-vypírací roztok	3x15 min.
-30% aceton	15min.
-50% aceton	15min.
-70% aceton	15min.
-80% aceton	15min.
-90% aceton	15min.
-95% aceton	15min.
-100% aceton	15min.
-pryskyřice + aceton 1:2	1hod.
-pryskyřice + aceton 1:2	1hod.
-pryskyřice + aceton 1:2	1hod.
-čistá pryskyřice	24hod.
-zalití do zalévacích formiček a polymerace v termostatu	24hod

Příloha III.

Příprava vzorků protokormů pro TEM

-2,5% GA v 0,2M kakodilátovém pufru	nejméně 4 hod.
-vypírací roztok	3x15 min.
-pufr + 4% roztok OsO ₄ 1:1	4 hod.
-vypírací roztok	3x15 min.
-30% ethanol	15min.
-50% ethanol	15min.
-70% ethanol	15min.
-80% ethanol	15min.
-90% ethanol	15min.
-95% ethanol	15min.
-100% ethanol	15min.
-aceton+ethanol 1:2	15min.
-aceton+ethanol 1:1	15min.
-aceton+ethanol 2:1	15min.
-100% aceton	15min.
-pryskyřice + aceton 1:2	1hod.
-pryskyřice + aceton 1:2	1hod.
-pryskyřice + aceton 1:2	1hod.
-čistá pryskyřice	24hod.
-zalití do zalévacích formiček a polymerace v termostatu	24hod

Příloha IV

Počet živých a mrtvých protokormů nalezených na jednotlivých lokalitách v jednotlivých letech

Typ lokality	Lokalita	2008-2010			2008-2011			2009-2011		
		živé *	mrtvé*	PRP	živé*	mrtvé*	PRP	živé*	mrtvé*	PRP
<i>N. ovata</i> luční	Lštění	2+1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Javorník louka	7+4	2+2	3	0	0	0	0+1	0	1
	Myší domky	4+6	1+1	3	0	0	0	0	0	0
	Louka u Hanzlů	6+0	0+1	2	3+0	1+0	1	1+0	0	1
	Vínice louka [#]	0+1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>N. ovata</i> lesní	Vínice les [#]	0+1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Nicov	2+6	0	3	0+5	0	2	0	0	0
	Slatinný potok	7+1	1+0	2	0+2	0	1	0	0	0
	Kepley	11+7	0	3	3+1	0	1	2+0	0	2
<i>N. cordata</i>	Ztracený rybník	2+0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Celkem	68	8	20	14	1	5	4	0	3

Množství živých a mrtvých protokormů nalezených v rámečcích z jednotlivých lokalit. Výsledky jsou rozděleny dle roku sazení a vyjmutí rámečků.

Vysvětlivky: PRP – Počet rámečků v nichž byly nalezeny protokormy na dané lokalitě;

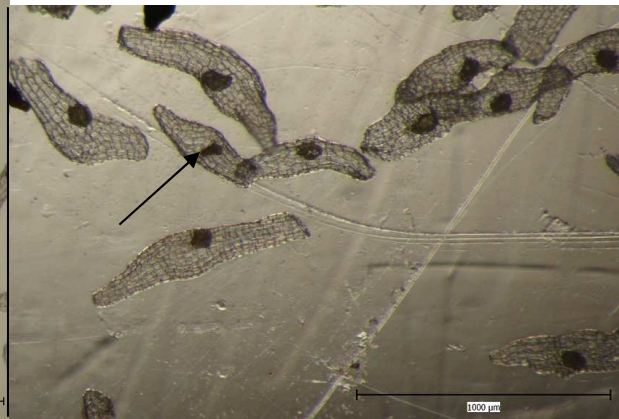
*uveden počet protokormů nalezených v síťce se semeny pocházejícími z lesních lokalit + počet protokormů nalezených v síťce se semeny pocházejícími z lučních lokalit (rámečky byly půlené, síťky do nich byly vkládány společně);

Na lokalitách Vínice les a Vínice louka bylo nalezeno pouze po jednom protokormu, ty nebyly použity pro molekulární analýzy.

Fotopříloha



Semena *N. ovata* před vložením do rámečků. Semena z roku 2008 z lokality Nicov. Šipkou jsou označena abortovaná semena. Měřítka: 1mm.



Semena *N. cordata* před vložením do rámečků. Semena z roku 2009 z lokality Ztracený rybník. Šipkou je označeno abortované semeno. Měřítka: 1mm.



Protokormy získané z jednoho rámečku vysazeného na lokalitě Keply. Největší byl použit pro TEM, druhý největší pro analýzu mykorhizních hub. Ostatní byly zamrazeny jako rezerva. Měřítka: 1mm.



Detailní fotka největšího z protokormů zachycených na snímku vlevo. Na snímku je možné rozeznat pelotony uvnitř buněk protokormu, zároveň jsou vidět rhizoidy vyrůstající z protokormu. Skrze rhizoidy může docházet ke kolonizaci symbiotickou houbou. Měřítka: 1mm.



Největší nalezený protokorm, získaný z lokality Myší domky. Protokorm je vyfocen na síťce, v níž byla semena vkládána do půdy. Ve spodní části protokormu je vidět růstový vrchol. Protokorm měřil 11,5 mm.



Lokalita Jezerní slat (*N. cordata*) po těžbě smrků napadených kůrovcem. Rámečky se semeny nebylo možné najít. (září 2011)



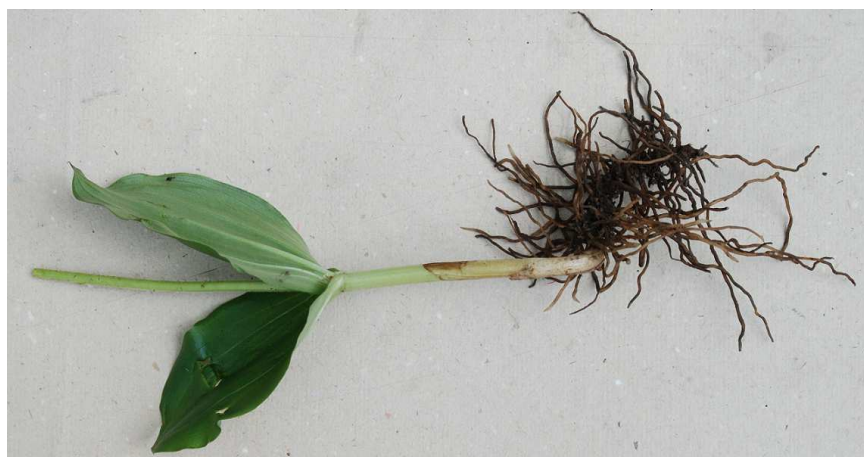
Rostlina *N. ovata* na lokalitě Nebe při odběru kořenů pro analýzu symbiotických hub. Při odběru byly odkryty kořeny pouze na jedné straně rostliny a rostlina tak nebyla úplně zničena. (červenec 2009)



Rostlina *N. cordata* na lokalitě ztracená slat'. Při odběru kořenů bylo vzhledem k velikosti rostliny potřeba vykopat celého jedince a rostlina tak byla zničena. (září 2009, foto Jana Jersáková)



Při odběru kořenů druhu *N. cordata* na lokalitě Ztracený rybník byly nalezeny dvě rostliny spojené kořeny. To u *N. cordata* dokazuje vegetativní šíření, jež by mohlo u tohoto druhu hrát významnou roli. (foto Jana Jersáková)



Kořenový systém *N. ovata*. Oproti druhu *N. cordata* je značně mohutnější (foto Jana Jersáková)