

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta



Bakalářská práce

**Udržování polymorfismu v barvě květu u druhu  
*Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae)**

Vypracovala: Markéta Kremlová  
Školitel: Prof. RNDr. Pavel Kindlmann, DrSc.

České Budějovice 2007

**Kremlová M.**, 2007: Udržování polymorfismu v barvě květu u druhu *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae) [The maintenance of corolla colour polymorphism in *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae), Bc. Thesis, in Czech] – 28 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** The European rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* commonly produces yellow- and purple-flowered individuals in frequencies that in different populations range from balanced to very unbalanced ones (we can find even monochromatic populations). I studied female reproductive success of the two morphs in four populations in the Beskydy Mountains in the eastern part of the Czech Republic. The data obtained from the crossing experiment showed that seed mass, proportion of seeds with big embryo, proportion of seeds without embryo and viability of seeds depend neither on the type of crossing, nor on morph colour. They depended only on the locality.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 9. 5. 2007

.....  
Markéta Kremlová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Prof. P. Kindlmannovi za odborné vedení této práce, Dr. J. Jersákové za cenné připomínky, rady a poskytnuté materiály a především Mgr. Ivě Schödelbauerové za konzultace, pomoc při zpracování a vyhodnocování dat a čas, který mi věnovala. Velký dík patří mým rodičům a mému příteli za podporu, pochopení a lásku.

Práce byla finančně podpořena grantem LC06073 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky .

## Obsah:

1 Úvod.....	5
2 Metodika.....	10
2.1 Charakteristika studovaného druhu.....	10
2.2 Popis lokalit.....	11
2.3 Metodika pokusů.....	11
2.3.1 Opylování.....	11
2.3.2 Zjištění kvantity a kvality semen.....	12
2.3.3 Zjištění vitality semen pomocí tetrazoliového testu.....	12
2.4 Použité statistické metody.....	13
3 Výsledky.....	15
3.1 Vliv lokality a způsobu opylení na váhu semen.....	15
3.2 Vliv lokality a způsobu opylení na podíl semen s velkými embryi a na podíl semen prázdných.....	16
3.3 Vliv lokality a způsobu opylení na vitalitu semen.....	17
3.4 Rozdíly mezi lokalitami.....	19
4 Diskuse.....	20
5 Závěr.....	23
6 Literatura.....	24

# 1 Úvod

Ve většině přírodních populací se uplatňuje více či méně nápadný polymorfismus, který hraje velkou roli v celé řadě ekologických, etologických i evolučních dějů. Často je tento jev určen geneticky a je podmíněn přítomností dvou či více variant alel jednotlivých genů. Za předpokladu, že všechny organismy jsou vystaveny neustálému působení přirozeného výběru a všechny alely jsou z hlediska evoluční zdatnosti rovnocenné, dalo by se očekávat, že nejvýhodnější alela by mohla vytlačit ty, které jsou v dané situaci zrovna méně hodnotné, avšak existují mechanismy schopné takovému jevu zabránit (Flegr 2005). Studie a pokusy zabývající se některými z těchto způsobů trvalého udržení polymorfismu u rostlin, který je u mnoha krytosemenných často spojen s barvou květu, si nezdá za modelové organismy vybírají zástupce čeledi *Orchidaceae*. Skupina vstavačovitých je pozoruhodná vysokým výskytem polymorfismu (ať už v barvě květu, nebo, což je méně časté, v barvě samotného korunního plátku např. ve velikosti a barevnosti jednotlivých plošek nebo teček), s kterým souvisí různorodé opylovací mechanismy a přítomnost tzv. šálivých květů.

Jako šálivé označujeme květy bez nektaru, vyskytující se u více jak třetiny orchidejí. Jsou podvodným prostředkem, jak přilákat hmyzí pozornost, protože nenabízejí opylovačům za přenos pylu žádnou odměnu v podobě energeticky cenného zdroje. Pylová zrna orchidejí se nacházejí ve shlucích v prašnickovém útvaru tzv. brylce, která se nalepí na tělo opylovače (Dykyjová 2003) a ten není schopen jednotlivá pylová zrna z brylek získat a využít (Nilsson 1992, Johnson & Edwards 2000). Existují dvě základní hypotézy o tom, jak takové klamání opylovačů může zvýšit reprodukční úspěšnost rostlin: (i) přerozdělení energie, která se jinak vkládá do výroby nektaru, ve prospěch květů a produkce semen a (ii) vyšší míra cizosprašení díky tomu, že opylovači na rostlině bez nektaru navštíví méně květů (Jersáková et al. 2006a). Experimenty provedené na populacích orchidejí také prokázaly, že přenos brylek na květenství je u jedinců bez nektaru podstatně vyšší, než je tomu u jedinců s nektarem, a to

díky tomu, že opylovač, pokud nemůže najít nektar, mění pozice svého těla v květu, a tak se zvyšuje šance na přenos brylek (Smithson & Gigord 2001).

Orchideje s šálivými květy využívají k vábení opylovačů různé alternativní strategie, jako je například napodobování hmyzích partnerek (Kullenberg 1961), imitování druhů nabízejících odměnu (tzv. potravních modelů, Roy & Widmer 1999, Johnson 2000) nebo využívají všeobecné podobnosti s potravními zdroji (Dafni 1986). Avšak většina takto uzpůsobených vstavačovitých kvete hromadně brzy na jaře a je opylována převážně nově se líhnoucími jedinci různých druhů blanokřídlých (van der Cingel 1995), proto se zdá, že mimikry květin bez nektaru kvetoucích v tuto dobu mohou fungovat jako selektivní činitel pouze za určitých ekologických podmínek, protože tyto druhy spoléhají spíše na naivitu mladých jedinců hmyzu (Gigord et al. 2002). Předpokládá se, že tato skutečnost úzce souvisí s vysokou mírou polymorfismu barvy květů v populacích orchidejí, který zřejmě primárně slouží ke zpomalení procesu učení, při kterém se opylovači naučí vyhýbat pro ně energeticky bezcenným květům (Heinrich 1975, 1983, Real et al. 1990).

Je tedy na místě se domnívat, že možná cesta k udržení stabilního květního polymorfismu u vstavačovitých, vede skrz opylovače. Jedna z teorií vysvětlujících tuto skutečnost je selekce závislá na frekvenci (frequency dependent selection, Ridley 1996), která nastává, jestliže selekční koeficient některé alely s její zmenšující se frekvencí v populaci stoupá. To znamená, že čím vzácnější je alela v populaci, tím je větší zdatnost jejích nositelů (Flegr 2005). Má se obecně za to, že v případě modelového organismu prstnatce bezového (*Dactylorhiza sambucina*), u kterého se vyskytuje polymorfismus v barvě květu (červená a žlutá forma), by to mohlo fungovat tím způsobem, že opylovač dává přednost méně častému barevnému fenotypu. Těmito opylovači jsou především královny čmeláků (Nilsson 1980), které poté, co naleznou květ bez nektaru, ve snaze vyhnout se těmto šálivým květům navštíví květ jiné barvy, ale stejného druhu, a takto zvýší reprodukční úspěšnost rostlinám se

vzácnějším fenotypem. Každá barevná varianta by tedy měla ve své reprodukční úspěšnosti vykazovat negativní závislost na hustotě jedinců druhé barevné formy (Smithson & Macnair 1997). Četnosti jednotlivých barevných forem v rámci populace by se tak měly časem obrátit ve prospěch toho fenotypu, který byl předtím vzácnější, tudíž by frekvence fenotypů různě oscillovaly v čase kolem určitého rovnovážného stavu, který představuje situaci, kdy jsou obě barevné formy zastoupeny stejným počtem jedinců (Gigord et al. 2001).

Mechanismus negativní selekce závislé na frekvenci u prstnatce bezového se podařilo prokázat v manipulativním experimentu (Gigord et al., 2001), kdy byly rostliny obou barevných forem přesazeny do květináčů a rozmístěny v pravidelných řadách. Pokus byl proveden s různými frekvencemi barevných forem při neměnění se hustotě rostlin. Frekvence žluté formy představující rovnovážný stav v tomto experimentu byla 61%. Tento výsledek se přibližně rovná hodnotě nalezené u 174 přírodních populací (Gigord et al. 2001), což by mohlo být dáno vrozenou preferencí opylovačů pro tuto barvu (Smithson & Macnair 1997).

Ale chování opylovačů není tak jednoduché, jak by se mohlo zdát, proto je velmi obtížné, za předpokladu, že se mechanismus selekce závislé na frekvenci v tomto případě uplatňuje, vyzorovat ho v přírodních populacích. Svou roli mohou hrát i druhy rostlin kvetoucí společně s prstnatcem bezovým a jejich převládající barva by mohla být určující v ovlivnění preferencí pro barvu u opylovačů (Nilsson 1980), kteří mají sklon navštěvovat takové barevné formy, které se nejvíce podobají květům s nektarem, na kterých se nejčastěji zdržují (Heinrich 1979, Gumbert & Kunze 2001, Gigord et al. 2002, Johnson et al. 2003). To znamená, že například opylovač, který je zvyklý létat na žlutě kvetoucí rostliny obsahující nektar, bude směřovat svou další návštěvu na jinou žlutě kvetoucí rostlinu, ale dopředu netuší, že ta mu nic nenabídne. Takto dojde k přenosu pylu mezi žlutými formami prstnatce bezového, dokud se opylovač nenaučí šálivé květy rozpoznávat, nebo se nezaměří na květy červené. Ovšem potravní chování hmyzu může být ovlivněno i faktory, jako jsou hustota a

prostorové rozmístění jak květů obsahujících nektar, tak těch bez něj a svou roli hraje také proces učení (Ferdy et al. 1998).

Víme, že opylovači vyvinuli různé způsoby chování ve snaze vyhnout se šálivým květům. Například zkracují dobu, po kterou se nachází v místě nabízejícím jen malé množství zdrojů (Real 1983, Dukas & Real 1993), dále odlétají na delší vzdálenost (Stephen & Krebs 1986, Smithson & Macnair 1996, 1997, Smithson & Gigord 2003, Kropf & Renner 2005), nebo se těmto rostlinám krátkodobě vyhýbají a jsou schopni dlouhodobého zapamatování si druhů s nektarem (Dukas & Real 1993, Smithson & Macnair 1997). Byly provedeny experimentální pokusy, které dokazují, že míra návštěvnosti šálivých květů klesá s časem a se zvětšující se zkušeností opylovačů s vyhledáváním potravy (Smithson & Macnair 1997) a stejně tak se snižuje při zvyšující se hustotě šálivých květů. Podobně velké nakupení květin produkujících nektar snižuje reprodukční úspěšnost prstnatce bezového, protože tento efekt může opylovače přimět zůstat déle na takovém místě, nemusí vynakládat zbytečně energii na delší přelet. Hustota obou typů rostlin tedy snižuje reprodukční úspěšnost prstnatce bezového (Internicola et al. 2006).

Přestože tedy mechanismus frekvenčně závislé selekce byl v případě tohoto modelového organismu potvrzen v uměle vytvořeném experimentu, stále postrádáme přesvědčivé důkazy o jeho roli v přírodních populacích a prokázat se ho v těchto podmínkách doposud nepodařilo (Pellegrino et al. 2005a, Kropf & Renner 2005). Je také možné, že se projevuje až při velmi velkém vychýlení poměru barevných forem (Jersáková et al. 2006b), ovšem jsou známy i jednobarevné populace, kde se zřejmě uplatňuje genetický drift, protože orchideje bez nektaru mívají malou efektivní velikost populace díky malému reprodukčnímu úspěchu (Tremblay et al. 2005) a dohromady s omezenou výměnou genetického materiálu (pylu) mezi jednotlivými populacemi, je pravděpodobné, že to vede k tomuto jevu. Neměli bychom ani opomenout



efekt hrdla lahve a zakladatele, objevující se v malých populacích a vyskytují se i důkazy o vlivu inbrední deprese na reprodukční zdatnost této orchideje (Juillet et al. 2007).

Jak vyplývá z těchto skutečností, to, co ovlivňuje poměr jednotlivých barevných forem v různých lokálních populacích, nemusí být dáno pouze frekvenčně závislou selekcí a preferencemi a chováním opylovačů, ale celou řadou jiných faktorů. Některé pokusy dokonce nasvědčují, že chování opylovačů nemusí být hlavním faktorem určujícím polymorfismus, a předpokládají existenci reprodukčních bariér po opylení (Pellegrino et al. 2005b), které by mohly hrát roli jak v udržování polymorfismu, tak by mohly být rozhodující ve fenotypovém složení následujících generací.

Přestože o tomto problému bylo zjištěno už poměrně mnoho, stále neznáme všechny souvislosti, kterými bychom uměli popsat změny ve fenotypovém složení různých populací tohoto druhu. Studie Jersákové et al. (2006b), na kterou navazuje tento experiment, se zabývá jednou z dalších možností, jak je barevný polymorfismus udržován, kterou by mohla být rozdílnost v reprodukční úspěšnosti jednotlivých barevných forem, nesouvisející zcela s chováním opylovačů. Z výsledku opylovacího experimentu, který byl proveden na prstnatci bezovém u dvou populací na Vsetínsku bylo zjištěno, že žlutá forma měla menší váhu semeníků i jednotlivých semen, než forma červená, bez ohledu na způsob opylování a že podíl živých a klíčících semen byl průkazně nižší u žlutých rostlin. Z výsledků vyplývá snížená vitalita žlutých rostlin na obou lokalitách, která by mohla vysvětlit převahu červené formy ve vsetínských populacích. Tento výsledek byl ale založen na malém počtu lokalit, na kterých byl experiment proveden, proto jsem se pokusila tento jev znovu ověřit na větším vzorku populací.

Nulová hypotéza, kterou jsem zde testovala, je tedy následující: rozdílné četnosti obou fenotypů v populacích nejsou následkem rozdílné životaschopnosti semen vzniklých křížením mezi oběma barevnými formami.

## 2 Metodika

### 2.1 Charakteristika studovaného druhu

*Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó patří do čeledi *Orchidaceae* je evropský druh s areálem rozšíření od jižní Skandinávie až po horské oblasti Středomoří. Vyskytuje se na plně osluněných trávnicích, na horských loukách nebo ve světlých listnatých lesích, křovinami porostlých stráních a pastvinách, jejichž podloží tvoří karbonátové, neutrální až středně kyselé hlinitopísčité půdy. Z výčtu stanovišť je patrné, že je to druh s velkými nároky na světlo (Jatiová & Šmiták 1996).

Prstnatec bezový je jediným našim druhem rodu, který má hlízy podlouhle vřetenovité, až téměř válcovité. Ze všech našich prstnatic je v průměru nejmenšího vzrůstu, dorůstá obvykle výšky 10-20 cm. Lodyžní listy jsou beze skvrn a nedosahují k bázi květenství, které je husté, zprvu krátce vejčité a posléze krátce a široce válcovité. Větší květy vyrůstají z paždí bylinných kopinatých listenů (Procházka & Velíšek 1983). Šálivé květy této orchideje neobsahují nektar a vykazující polymorfismus v barvě. Obvykle se jedná o žlutě nebo červeně kvetoucí jedince vykvétající časně z jara (konec dubna, začátek května), kteří se neliší ve výšce, počtu listů, počtu květů a jejich velikosti a pokud je známo, tak ani ve vůni (Nilsson 1980, Gigord et al. 2001, 2002, Kropf & Renner 2005, Pellegrino et al. 2005a). Avšak některé experimenty dokazují, že čmeláci opylující tyto šálivé květy stejně upřednostňují jako základní vodítko pro shánění potravy barvu květů před ostatními květními charakteristikami (Gumbert & Kunze 2001). Frekvence barev v rámci jednotlivých populací mohou být velmi různé, od barevně vyvážených až po zcela jednobarevné (Nilsson 1980, Gigord et al. 2001, 2002, Pellegrino et al. 2005a, Kropf & Renner 2005). Pylová zrna vznikají v tetradách, které jsou spojeny v brylku a v tomto útvaru jsou také přenášena. Plodem je tobolka s velkým množstvím malých semen, které jsou rozšiřovány větrem. U tohoto druhu se uplatňuje

poměrně velký podíl mykotrofie na celkové výživě dospělých rostlin (Procházka & Velíšek 1983).

V České republice je prstnatec bezový zařazen celostátně do kategorie silně ohrožených druhů C 2, v moravskoslezské regionu do kategorie ohrožených druhů C 3 (Jatiová & Šmiták 1996).

## 2.2 Popis lokalit

Pokus s prstnatecem bezovým se uskutečnil v květnu roku 2006 na čtyřech lokalitách v Beskydech, z nichž dvě (U Čotků, Hrachovec) se shodovaly s lokalitami vybranými v předešlém experimentu provedeném v roce 2002 (Jersáková et al. 2006b). Všechny tyto lokality se nacházejí mezi 49°16' a 49° 25' severní šířky a 18°07' a 18°11' východní délky v nadmořských výškách od 467 do 745 m n. m. Počty rostlin v jednotlivých populacích se pohybovaly od 164 do 885. V každé populaci byl zjištěn celkový počet jedinců a počet červené a žluté formy. Z jiných druhů kvetoucích na lokalitách v době pokusu byly zaznamenány mezi žlutě kvetoucími rostlinami především *Primula veris* a *Lotus corniculatus*, z fialově kvetoucích *Polygala vulgaris*, *Viola sp.* a *Ajuga reptans*.

## 2.3 Metodika pokusů

### 2.3.1 Opylování

Na 4 lokalitách bylo náhodně vybráno po 10-12 jedincích od každé barvy. Aby se zabránilo přirozenému opylování, byli vybraní jedinci na začátku sezóny (začátek května) zakryti síťkami na drátěné konstrukci. Prstnatec bezový není schopen spontánní autogamie, plody se v přírodě vyvíjí pouze po opylování hmyzem (Jersáková 1998). Na každém jedinci bylo následovně opylováno šest spodních květů: opylování v rámci fenotypu (PP nebo YY; 3 květy) a mezi fenotypy (PY nebo YP; 3 květy), přičemž P znamená červený květ a Y žlutý

květ, první písmeno znamená barvu květu zdroje pylu a druhé barvu opylovaného květu. Opylované květy byly označeny barevnými drátky pro pozdější rozlišení mezi jednotlivými typy opylování. V rámci jednoho květenství se zásahy střídaly. Na opylení jednoho květu byla použita vždy jedna brylka, která byla sebrána ze vzdálenějších jedinců. K opylování bylo použito párátka.

### **2.3.2 Zjištění kvantity a kvality semen**

Po dozrání byly semeníky sebrány a nechaly se volně doschnout v Eppendorf zkumavkách. Poté se z nich vyjmula semena, která jsem zvažila na analytických vahách. Semena byla uchovávána v chladničce při 4°C. Následně jsem počítala semena z jednotlivých semeníků pod stereoskopickým mikroskopem. Část semen ze zkumavky jsem vždy přenesla pomocí pinzety na Petriho misku, kde jsem je počítala ve 4 kategoriích: semena s velkými embryi, semena s malými embryi, semena s abortovanými embryi a semena prázdná. Abortovaná embrya se vyznačují odlišným tvarem, vypadají jako scvrklá a jsou tmavší, zatímco prázdná semena se často jeví pod stereoskopickým mikroskopem jako tenké útvary, v kterých není patrné embryo. Z každého semeníku jsem takto vždy spočítala alespoň 200 semen. Pro ulehčení počítání jsem si předem na Petriho misky nakreslila lihovým fixem mřížku a přenesená semena jsem počítala v jednotlivých čtvercích.

### **2.3.3 Zjištění vitality semen pomocí tetrazoliového testu**

Životaschopnost semen byla posuzována pomocí tetrazoliového barvení (Van Waes & Debergh 1986), na kterém jsem pracovala společně se svou konzultantkou Ivou Schödelbauerovou. Den před pokusem jsem připravila 5%  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ , který rozrušuje testu semen, a 1% Tween-80, který zabraňuje slepování semen. V den pokusu jsem oba připravené roztoky smíchala v poměru 2:1 v kádince, do které jsem ponořila vzorky na 12 hodin. Takto

ošetřená semena jsem umístila na planktonní síťku (5x5 cm) s velikostí ok 50 $\mu$ m, síťku jsem přehnula a vložila do diarámečku. Každé dvě hodiny po vložení vzorků do roztoku je nutné tento roztok promíchat, aby se Ca(OCl)<sub>2</sub> neusazoval na dně. Vzorky jsem po vyjmutí nechala odstát v destilované vodě po dobu 24 hodin. Další den jsem je přemístila do 1% TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chlorid) a nechala působit 24 hodin. Během tetrazoliového barvení byla kádinka se vzorky v termostatu s nastavenou teplotou na 30°C. Následující den jsem vzorky vyjmula z termostatu a 3x promyla destilovanou vodou. Poté jsem odsála přebytečnou vodu a síťku jsem otiskla na Petriho misku předem potřenou vazelínou, na kterou se semena přichytí. Pod stereoskopickým mikroskopem jsem spočítala prázdná, neobarvená, částečně obarvená (světle růžová) a obarvená (červená) semena. Červeně zbarvená semena můžeme označit za plně životaschopná, světle růžová barva signalizuje průměrnou vitalitu a neobarvená semena nejsou vitální (Van Waes & Debergh 1986). Jednotlivé vzorky byly takto připraveny ze všech semeníků. V průměru jsem spočítala na každé misce 364 semen.

## 2.4 Použité statistické metody

Data jsem zpracovávala v programu Statistica 7.

Data o váze semen neměla normální rozdělení, proto jsem je pro přiblížení Gaussově distribuci transformovala logaritmickou transformací. Stejně tak data o podílu semen s velkými embryi a podílu prázdných semen neměla normální rozdělení, tato data jsem transformovala arcsinovou transformací. Data o podílu vitálních semen měla normální rozdělení. Normalitu dat jsem testovala Kolmogorov-Smirnovovým testem.

Vliv typu křížení na hmotnost semen a jejich životaschopnost byl analyzován dvoucestnou analýzou variance (faktoriální ANOVA) s nezávislými proměnnými: lokalita, barevná forma a typ křížení a závislými proměnnými: hmotnost semen, podíl semen s velkými embryi, podíl prázdných semen a podíl vitálních semen. Pro stanovení statistické

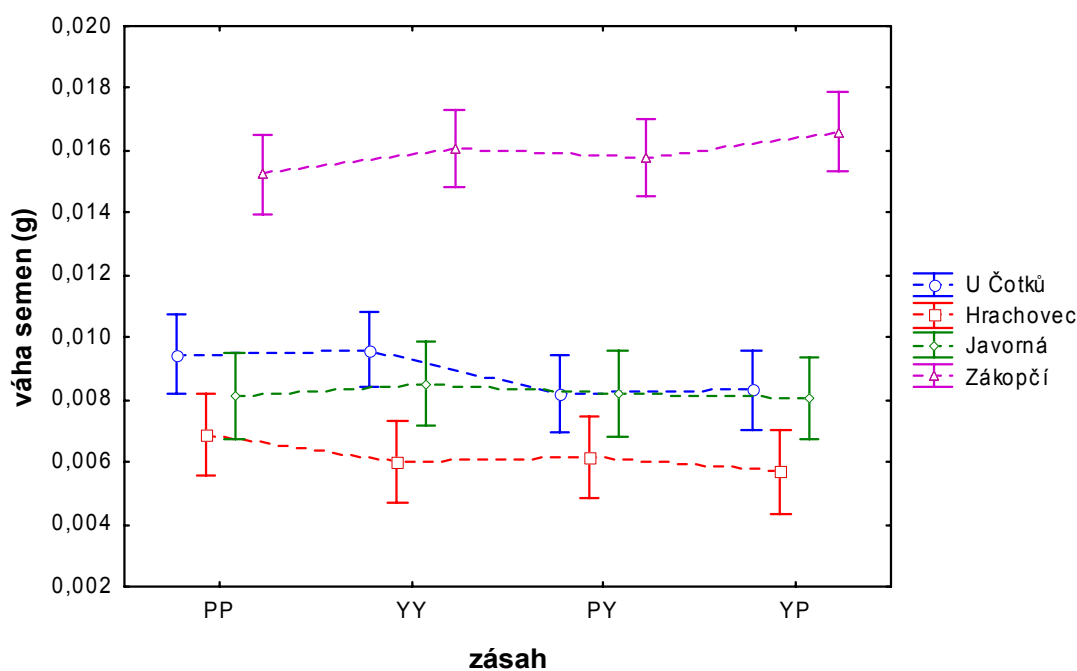
průkaznosti rozdílů mezi vlivem jednotlivých lokalit na výše zmiňované závislé proměnné jsem použila Tukeyho test.

Výsledky testů byly posuzovány na 5% hladině významnosti. Pro tvorbu všech grafů byla použita původní netransformovaná data. Chybové úsečky v grafech ukazují střední chyby průměru.

### 3 Výsledky

#### 3.1 Vliv lokality a způsobu opylení na váhu semen

Nebyl zaznamenán rozdíl ve vlivu jednotlivých křížení barevných forem na váhu semen, zatímco statisticky průkazné jsou rozdíly ve váze semen na jednotlivých lokalitách (tab. 1, obr. 1).



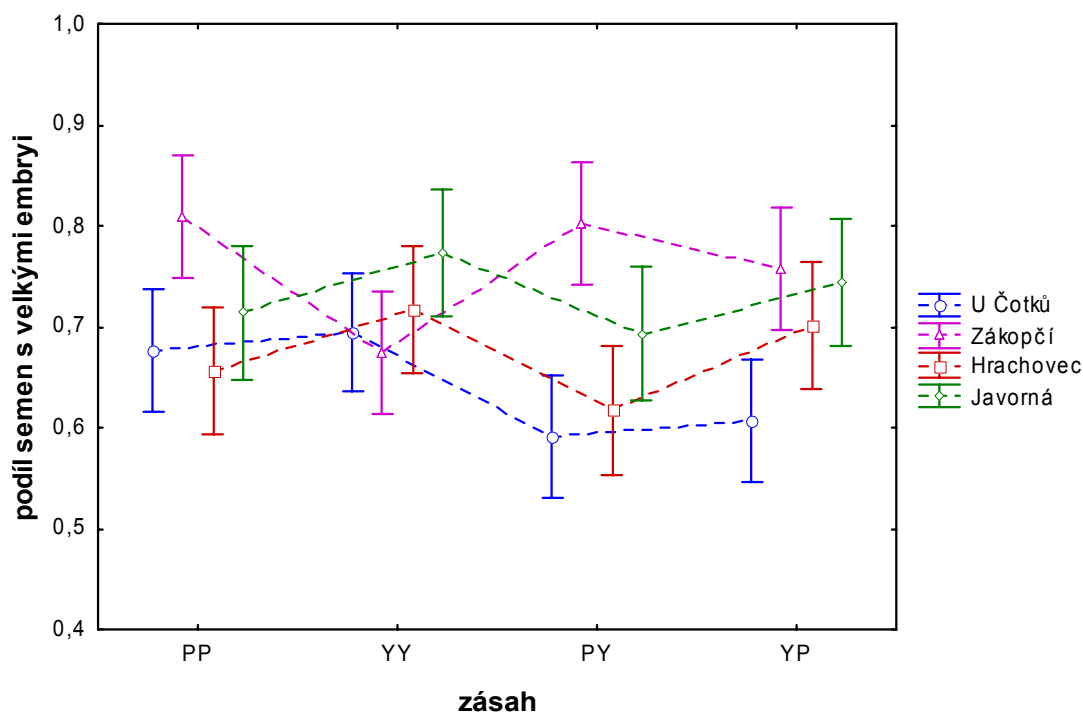
Obr. 1. Závislost váhy semen na lokalitě a zásahu.

Tab. 1. Výsledky z dvoucestné analýzy variance, kterou jsem testovala typ zásahu na hmotnost semen z jednotlivých lokalit. Závislá proměnná: váha semen; nezávislá proměnná: lokalita, zásah a barevná forma rostliny. Statisticky průkazné hodnoty ( $p < 0.05$ ) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální ANOVA: d.f. - stupně volnosti, F - hodnota testového kritéria, p - dosažená hladina významnosti)

Dependent variable		d.f.	F-value	p-level
váha semen	lokalita	3	43.88	< <b>0.001</b>
	barevná forma	1	0.03	0.873
	zásah	1	0.32	0.574
	lokalita x barevná forma	3	0.23	0.878
	lokalita x zásah	3	0.36	0.780
	barevná forma x zásah	1	< 0.001	0.994
	lokalita x barevná forma x zásah	3	0.02	0.996

### 3.2 Vliv lokality a způsobu opylení na podíl semen s velkými embryi a na podíl semen prázdných

Způsob opylení neměl vliv na podíl semen s velkými embryi v populaci, zatímco statisticky průkazný je vliv lokality (tab. 2, obr. 2). Stejně tomu tak je u podílu prázdných semen, kdy statisticky průkazný je opět pouze vliv lokality (tab. 3, obr. 3).

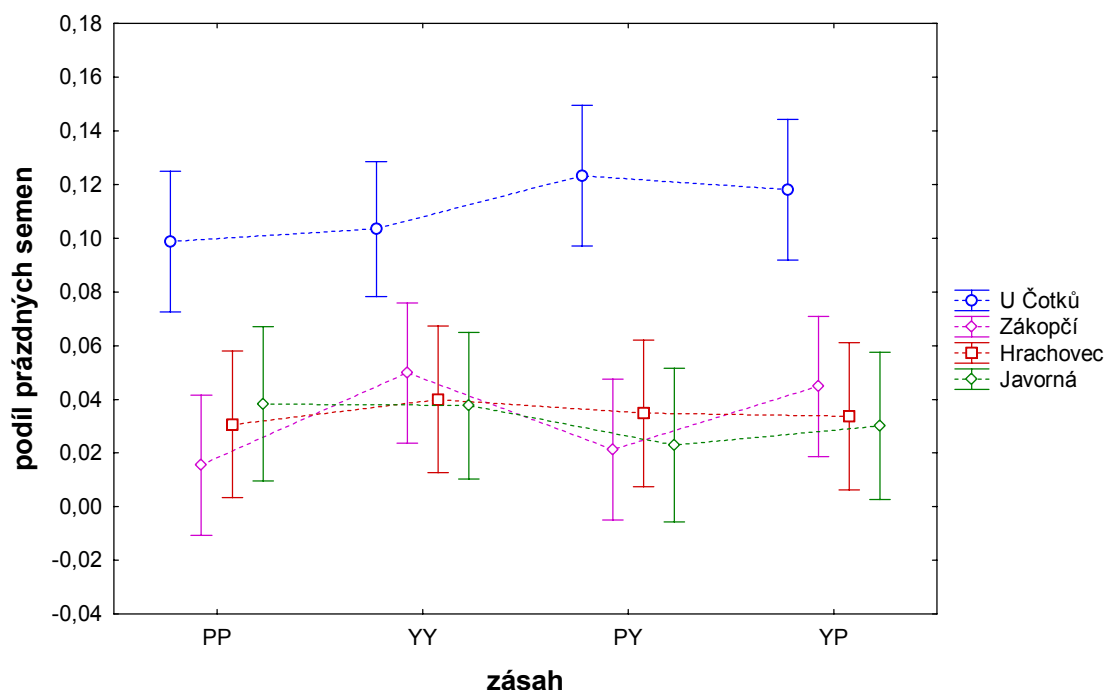


Obr. 2. Podíl semen s velkými embryi v závislosti na lokalitě a způsobu opylení.

**Tab. 2.** Výsledky z dvoucestné analýzy variance, kterou jsem testovala typ zásahu na podíl semen s velkými embryi v jednotlivých lokalitách. Závislá proměnná: podíl semen s velkými embryi; nezávislá proměnná: lokalita, zásah a barevná forma rostliny. Statisticky průkazné hodnoty ( $p < 0.05$ ) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální ANOVA: d.f. - stupně volnosti, F - hodnota testového kritéria, p - dosažená hladina významnosti)

Dependent variable	d.f.	F-value	p-level
podíl semen s velkými embryi			
lokalita	3	2.93	<b>0.035</b>
barevná forma	1	0.08	0.781
zásah	1	0.62	0.434
lokalita x barevná forma	3	1.29	0.279
lokalita x zásah	3	0.62	0.601
barevná forma x zásah	1	0.28	0.601
lokalita x barevná forma x zásah	3	0.16	0.926





Obr. 3. Podíl prázdných semen v závislosti na lokalitě a způsobu opylení.

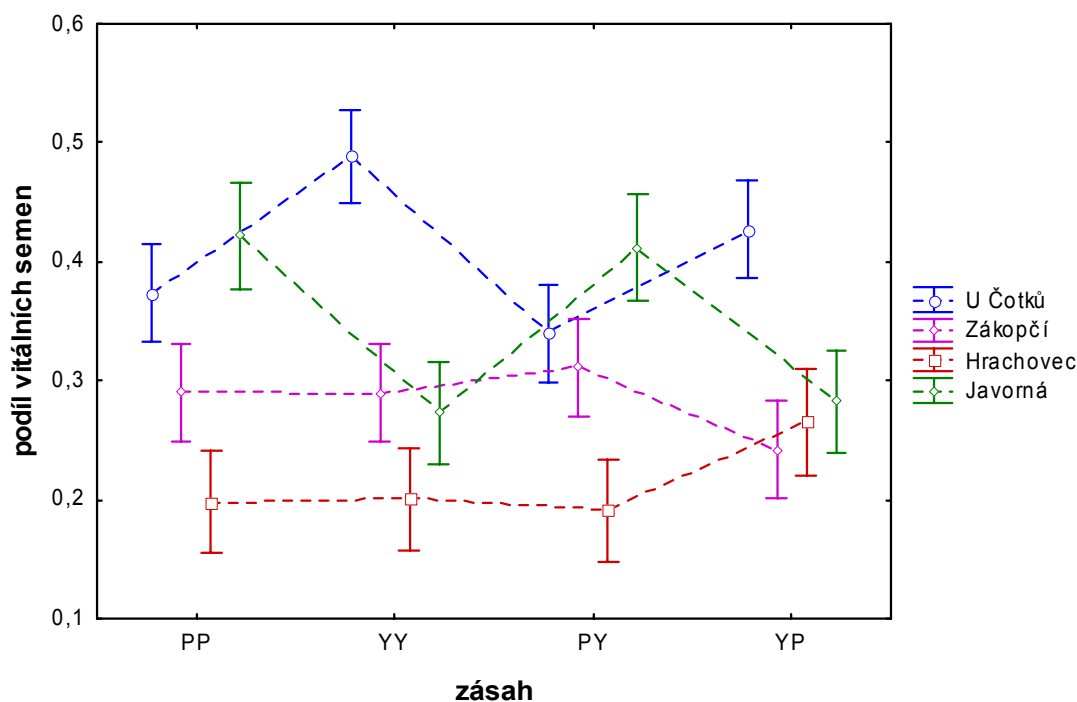
Tab. 3. Výsledky z dvoucestné analýzy variance, kterou jsem testovala typ zásahu na podíl prázdných semen v jednotlivých lokalitách. Závislá proměnná: podíl prázdných semen; nezávislá proměnná: lokalita, zásah a barevná forma rostliny. Statisticky průkazné hodnoty ( $p < 0.05$ ) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální ANOVA: d.f. - stupně volnosti, F - hodnota testového kritéria, p - dosažená hladina významnosti)

Dependent variable	d.f.	F-value	p-level
podíl prázdných semen			
lokalita	3	13.47	< <b>0.001</b>
barevná forma	1	0.71	0.400
zásah	1	0.02	0.878
lokalita x barevná forma	3	1.30	0.275
lokalita x zásah	3	0.31	0.815
barevná forma x zásah	1	0.09	0.766
lokalita x barevná forma x zásah	3	0.10	0.961

### 3.3 Vliv lokality a způsobu opylení na vitalitu semen

Závislost podílu vitálních semen na způsobu opylení a lokalitě je znázorněna na obrázku

4. Statisticky průkazný rozdíl byl zaznamenán u interakce lokalita x zásah, ale dále pouze lokality mají průkazný vliv na vitalitu semen, zatímco vliv způsobu opylení není statisticky průkazný (tab. 4).



**Obr. 4.** Závislost podílu vitálních semen na způsobu opylení a lokalitě.

**Tab. 4.** Výsledky mnohonásobného porovnání z dvoucestné analýzy variance, kterou jsem testovala typ zásahu na podíl vitálních semen v jednotlivých lokalitách. Závislá proměnná: podíl vitálních semen; nezávislá proměnná: lokalita, zásah a barevná forma rostliny. Statisticky průkazné hodnoty ( $p < 0.05$ ) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální ANOVA: d.f. - stupně volnosti, F - hodnota testového kritéria, p - dosažená hladina významnosti)

Dependent variable	d.f.	F-value	p-level
podíl vitálních semen			
lokalita	3	15.77	< <b>0.001</b>
barevná forma	1	0.17	0.682
zásah	1	0.15	0.704
lokalita x barevná forma	3	5.94	<b>0.001</b>
lokalita x zásah	3	0.59	0.623
barevná forma x zásah	1	< 0.001	0.984
lokalita x barevná forma x zásah	3	0.52	0.672

### 3.4 Rozdíly mezi lokalitami

Je patrné, že mezi všemi sledovanými charakteristikami semen se objevují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými lokalitami. Tyto rozdíly jsou přehledně znázorněny v tabulce 5.

**Tab. 5.** Průměrné hodnoty jednotlivých zkoumaných charakteristik (z netransformovaných dat, mean - průměr, SE - střední chyba průměru). Stejná písmena značí statisticky neprůkazné rozdíly ve vlivu lokalit na konkrétní efekt (Tukey test,  $p < 0,05$ ).

	<b>U Čotků</b> mean $\pm$ SE	<b>Hrachovec</b> mean $\pm$ SE	<b>Javorná</b> mean $\pm$ SE	<b>Zákopčí</b> mean $\pm$ SE
<b>váha semen (g)</b>	0,009 $\pm$ 0,001 <b>a</b>	0,006 $\pm$ 0,001 <b>b</b>	0,008 $\pm$ 0,001 <b>ab</b>	0,016 $\pm$ 0,001 <b>c</b>
<b>podíl semen s velkými embryi</b>	0,64 $\pm$ 0,03 <b>a</b>	0,67 $\pm$ 0,03 <b>ab</b>	0,73 $\pm$ 0,03 <b>ab</b>	0,76 $\pm$ 0,03 <b>b</b>
<b>podíl prázdných semen</b>	0,11 $\pm$ 0,01 <b>a</b>	0,03 $\pm$ 0,01 <b>b</b>	0,03 $\pm$ 0,01 <b>b</b>	0,03 $\pm$ 0,01 <b>b</b>
<b>podíl vitálních semen</b>	0,41 $\pm$ 0,02 <b>a</b>	0,21 $\pm$ 0,02 <b>b</b>	0,35 $\pm$ 0,02 <b>ac</b>	0,28 $\pm$ 0,02 <b>bc</b>

## 4 Diskuse

Z výsledků je patrné, že se nepodařilo vyvrátit nulovou hypotézu stanovenou v úvodu a má data tedy nepodporují hypotézu, že se jednotlivé barevné formy prstnatce bezového liší ve svých reprodukčních zdatnostech. Patrný je vliv lokalit na jednotlivé zjišťované charakteristiky. Především váha semen z lokality Zákopčí se zřetelně liší od ostatních - na této lokalitě se vyskytovali na první pohled větší jedinci.

Zásadní otázkou zůstává, proč se nepodařilo dojít k podobným výsledkům jako v experimentu provedeném v roce 2002. Když oba experimenty srovnáme, dojdeme ke zjištění, že především semena z lokality U Čotků se liší ve vitalitě. Z grafu (obr. 4) je vidět spíše opačný trend, než který byl prokázán dříve, a to ve prospěch žlutě zbarvených jedinců. Možným vysvětlením by v tomto případě mohlo být, že každé barevné formě se daří lépe za různých podmínek prostředí, co se týká především srážek, protože v roce 2006 byly oproti roku 2002 o dost deštivější měsíce květen a červen, které hrají roli v dozrání semeníků této orchideje (viz Příloha 1).

Zřejmě ze stejného důvodu se ani v jednom případě nepodařil prokázat vliv typu křížení jednotlivých barevných forem na zkoumané charakteristiky, zatímco v předešlém experimentu žlutá forma vykazovala průkazně nižší vitalitu i váhu semen. Je možné se domnívat, že rozdílná fitness rostlin se projevuje až za zhoršených životních podmínek. V roce 2006 nebyly rostliny z těchto lokalit nijak stresovány suchem, což nemůžeme tvrdit o předešlém experimentu. Pokud by toto tvrzení bylo pravdou, bylo by vhodné pokus zopakovat v tomto roce, popř. v několika dalších letech za sebou, a porovnat s doposud zjištěnými výsledky.

Kromě hypotézy o rozdílné reprodukční zdatnosti bychom také měli vzít v úvahu jiné teorie, které by mohly vysvětlit převahu červené formy prstnatce bezového ve vsetínských populacích.

Určitou roli by mohl hrát genetický drift, který se objevuje v malých populacích, kde je omezená výměna genetického materiálu s jinými populacemi, protože tok pylu mezi jednotlivými populacemi prstnatce bezového je velice malý (Jersáková, nepubl. data). Takto by mohlo dojít ke vzniku populací s nevyváženým poměrem barevných forem. Efekt velikosti populace na odchylku od poměru barevných forem 1:1 byl už testován, ale s negativním výsledkem (Jersáková et al. 2006b).

S populacemi, kde převládá červená forma této orchideje, se setkáváme například také ve Švédsku (Nilsson 1980), zatímco například v jižní Francii (Gigord et al. 2001) převládá forma žlutá a v některých populacích v Německu se dokonce setkáváme s populacemi, kde se nevyskytuje jediný červeně zbarvený jedinec, či jeden až dva na velké množství žlutých (Kropf & Renner 2005). Takto odlišně zbarvené populace by mohly být výsledkem rozdílných preferencí opylovačů v různých zeměpisných oblastech (Smithson & Macnair 1997). Na jedné z lokalit v Beskydech byl sledován pohyb pylu (Máslar 2007), kdy se opylovači nejčastěji pohybovali mezi červenými formami, daleko méně mezi variantami žlutými a malý přesun pylu byl zaznamenán i z červených jedinců na žluté. Tento výsledek by podporoval teorii o preferenci opylovačů pro jednu z barev, ale zároveň vyvrací fungování selekce závislé na frekvenci. Tyto výsledky by bylo vhodné také ještě ověřit, protože je možné, že jsou zkresleny špatným uvolňováním brylek ve žlutých květech, které byly nabarveny barvou, která tento jev mohla zapříčinit.

Další nezanedbatelnou hypotézou je vliv pH půdy. Dalo by se předpokládat, že žlutá varianta bude preferovat stanoviště s nižším pH a naopak červená zásaditější. Tato teorie se zakládá na ovlivňování zbarvení okvětních lístků anthokyanovými pigmenty, kdy se tmavé barvy tvoří v zásaditém prostředí, zatímco světlé v prostředí kyselém, což by mohlo také vysvětlovat výskyt jednobarevných populací v Německu, kde se rostliny nacházejí na kyselých půdách. Tato teorie byla ale vyvrácena v rámci celoevropského projektu (Máslar

2007), vliv pH na frekvenci žluté formy nebyl potvrzen, stejně tak přítomnost stejně barevných shluků v rámci jednotlivých populací na základě rozdílné půdní acidity.

Pokud opomeneme všechny tyto hypotézy, naskytá se tu ještě otázka, zda není četnost barevných forem determinována geneticky bez toho, aby měla evoluční význam. Rozdíly v četnostech barevných forem pak mohou být důsledkem toho, že populace, které si jsou geograficky blízké, si jsou i geneticky podobné, a proto mají i podobnou četnost příslušných květních forem a naopak.

Většinu těchto hypotéz by bylo ještě třeba testovat, abychom se dověděli více o biologii tohoto zajímavého druhu, což by mohlo přispět k porozumění mechanismům, které vedou k udržování polymorfismu v barvě jeho květů, a v budoucnu také k jeho efektivnější ochraně.

## 5 Závěr

Prstnatec bezový je evropský druh orchideje, který je modelovým organismem z hlediska zkoumání mechanismů udržujících polymorfismus v barvě květu. Jednou z hypotéz, která by vysvětlovala různé fenotypové složení populací tohoto druhu, je možnost, že se obě barevné formy liší ve své životaschopnosti. Tuto hypotézu jsem testovala na čtyřech lokalitách v Beskydech, kde byly provedeny opylovací experimenty, z kterých vyplynulo, že jednotlivá křížení barevných forem a barva rostliny neměly vliv na váhu semen, na podíl semen s velkými embryi, na podíl prázdných semen, ani na podíl semen vitálních v jednotlivých populacích.

## 6 Literatura

Dafni, A. (1986): Floral mimicry – mutualism and unidirectional exploitation of insect by plants. In *Insect and the Plant Surface* (Eds. B. Juniper & R. Southwood), pp. 81-90. Edward Arnold Ltd, London.

Dukas, R. & Real L. A. (1993): Effects of recent experience on foraging decisions by bumblebees. *Oecologia* **94**, 244-246.

Dykyjová, D. (2003): *Ekologie středoevropských orchidejí*. Kopp, České Budějovice.

Ferdy, J. B., Gouyon, P. H., Moret, J. & Godelle, B. (1998): Pollinator behaviour and deceptive pollination: learning process and floral evolution. *American Naturalist* **152**, 696-705.

Flegr, J. (2005): *Evoluční biologie*. Academia, Praha.

Gigord, L. D. B., Macnair, M. R. & Smithson, A. (2001): Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6253-6255.

Gigord, L. D. B., Macnair, M. R., Stříteský M. & Smithson A. (2002): The potential for floral mimicry in rewardless orchids: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **269**, 1389-1395.

Gumbert, A. & Kunze, J. (2001): Colour similitary to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**, 419-433.

Heinrich, B. (1975): Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution* **29**, 325-334.



- Heinrich, B. (1979): *Bumblebee economics*. Harvard University Press, Cambridge.
- Heinrich, B. (1983): Insect foraging energetics. In *Handbook of experimental pollination biology* (Eds. C. E. Jones & R. J. Little), pp. 187-214. Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York.
- Internicola, I. A., Juillet, N., Smithson, A. & Gigord, L. D. B. (2006): Experimental investigation of the effect of spatial aggregation on reproductive success in a rewardless orchid. *Oecologia* **150**, 435-441.
- Jatiová, M. & Šmiták, J. (1996): *Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a ve Slezsku*. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky Praha, středisko Brno.
- Jersáková, J., Johnson, S. D. & Kindlmann, P. (2006a): Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**, 219-235.
- Jersáková, J., Kindlmann, P. & Renner, S. S. (2006b): Is the colour dimorphism in *Dactylorhiza sambucina* maintained by differential seed viability instead of frequency-dependent selection? *Folia Geobotanica* **41**, 61-76.
- Jersáková, J. (1998): Srovnání reprodukce deceptivních a nedeceptivních orchidejí. In *Európske vstavačovitité (Orchidaceae)-výskum a ochrana II* (Eds. J. Vlčko & R. Hrivnák), pp. 43-50. Technická univerzita vo Zvolene.
- Johnson, S. D. & Edwards T. (2000): The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution* **222**, 243-269.
- Johnson, S. D., Peter, C. I. & Nilsson, L. A. (2003): Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology* **84**, 2919-2927.
- Johnson, S. D. (2000): Batesian mimicry in the nonrewarding orchid *Disa pulchra*, and its consequence for pollinator behaviour. *Biological Journal of the Linnean Society* **71**, 119-132.

- Juillet, N., Dunand-Martin, S. & Gigord, L. D. B. (2007): Evidence for inbreeding depression in the food-deceptive colour-dimorphic orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Plant Biology* **9**, 147-151.
- Kropf, M. & Renner, S. S. (2005): Pollination success in monochromic yellow populations of the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina*. *Plant Systematics and Evolution* **254**, 185-197.
- Kullenberg, B. (1961): Studies in *Ophrys* pollination. *Zoologiska Bidrag fran Upsala* **34**, 1-340.
- Másler, Z. (2007): Ekologie prstnatce bezového (*Dactylorhiza sambucina* L. Soó), Je barevná polymorfie *Dactylorhiza sambucina* ovlivňována aciditou půdy a vlivem vzdálenosti spolukvetoucích rostlin na reprodukční úspěšnost jeho barevných variant?, maturitní práce. SOŠ a SOU Hořovice, Hořovice.
- Nilsson, L. A., (1980): The pollination ecology of *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae). *Botanical Notiser* **133**, 367-385.
- Nilsson, L. A. (1992): Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution* **7**, 255-259.
- Pellegrino, G., Caimi, D., Noce, M. E. & Musacchio A. (2005a): Effects of local density and flower colour polymorphism on pollination and reproduction in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Plant Systematics and Evolution* **251**, 119-129.
- Pellegrino, G., Bellusci, F. & Musacchio, A. (2005b): Evidence of post-pollination barriers among three colour morphs of the deceptive orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Sexual Plant Reproduction* **18**, 179-185.
- Procházka, F. & Velisek, V. (1983): *Orchideje naší přírody*. Academia, Praha.
- Real, L., Ellner, S. & Harder, L. D. (1990): Short-term energy maximisation and risk-aversion in bumblebees: a reply to Possingham et al. *Ecology* **71**, 1625-1628.

Real, L. (1983): Microbehavior and macrostructure in pollinator plant interactions. In *Pollination ecology* (Ed. L. Real), pp. 287-302. Academic Press, New York.

Ridley, M. (1996): The theory of natural selection. In *The theory of natural selection* (Ed. M. Ridley), pp. 121-123. Blackwell, Cambridge.

Roy, B. A. & Widmer, A. (1999): Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon. *Trends in Plant Science* **4**, 325-330.

Smithson, A. & Gigord, L. D. B. (2001): Are there fitness advantages in being a rewardless orchid? Reward supplementation experiments with *Barlia robertiana*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **261**, 1435-1441.

Smithson, A. & Macnair, M. R. (1996): Frequency-dependent selection by pollinators: Mechanisms and consequences with regard to the behaviour of bumblebees *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Evolutionary Biology* **9**, 571-588.

Smithson, A. & Macnair, M. R. (1997): Negative frequency-dependent selection by pollinators on artificial flowers without rewards. *Evolution* **51**, 715-723.

Stephen, D. W. & Krebs J. R. (1986): *Foraging theory*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Tremblay R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. & Calvo R. N. (2005): Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: A spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**, 1-54.

van der Cingel, N. A. (1995): *An atlas of orchid pollination. European orchids*. A. A. Balkema, Rotterdam.

van Waes, J. M. & Deberg, P. C. (1986): Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* **66**, 435-442

## Příloha 1

Data Českého hydrometeorologického ústavu z meteorologické stanice Holešov (224 m n. m., 49° 19' 07" severní šířky, 17° 34' 24" východní délky).

