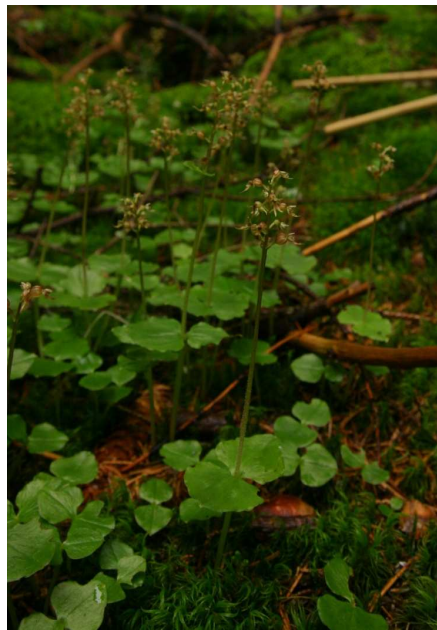


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

## **Je rozšíření orchidejí limitováno jejich mykorrhizními partnery?**



Milan Kotlínek

Školitel: RNDr. Jana Jersáková, PhD.

České Budějovice 2010

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.

### **Anotace**

The first part of this thesis is a review on limitations of orchids by their mycorrhizal symbiosis. The second part presents an outline of my master thesis, which is focused on ecology and mycorrhizal partners of two *Listera* species.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 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 30. dubna 2010.

.....

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří mi během posledních tří let pomáhali při studiu mykorhizy. V první řadě děkuji své školitelce Janě Jersákové za uvedení do tajů mykorhizní symbiózy u orchidejí a množství rad, které mi usnadnily bádání; a Tamaře Malinové za pomoc s řešením všech možných i nemožných problémů a bezmeznou trpělivost během spolupráce v terénu i v laboratoři. Velký dík také patří oběma za pomoc při sepisování této práce.

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 mojí mamince za vzdálenou podporu skrze chutné zásoby jídla. Děkuji také Petře za psychickou podporu během psaní a Ondřejovi za gramatickou korekci tohoto textu.

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 část je součástí mé diplomové práce.

## Obsah

1. Úvod .....	- 1 -
1.1 Mykorhizní symbióza .....	- 1 -
2. Orchideoidní mykorhiza .....	- 3 -
2.1 Základní popis OM .....	- 3 -
2.2 Význam mykorhizy pro orchideje.....	- 4 -
2.3 Houboví partneři.....	- 6 -
3. Fyziologie OM .....	- 7 -
3.1 Přehled stadií klíčení a jejich závislosti na mykorhize .....	- 7 -
3.2 Přenos uhlíku mezi houbou a rostlinou .....	- 8 -
3.3 Přenos dusíku a dalších látek mezi houbou a rostlinou.....	- 9 -
4. Abiotické a biotické faktory ovlivňující klíčení a růst orchidejí.....	- 10 -
4.1 Abiotické faktory .....	- 10 -
4.2 Biotické faktory .....	- 11 -
5. Ekologické důsledky závislosti na mykorhizní symbióze .....	- 12 -
6. Závěr .....	- 14 -
7. Návrh diplomové práce.....	- 15 -
7.1 Úvod.....	- 15 -
7.2 Metodika.....	- 15 -
7.2.1 Popis vybraných druhů:.....	- 15 -
7.2.2 Popis lokalit.....	- 16 -
7.2.3 Vysévací pokus .....	- 16 -
7.2.4 Mykorhizní partneři v dospělosti.....	- 18 -
7.2.5 Metody molekulární identifikace .....	- 18 -
7.2.6 Izotopová analýza .....	- 19 -
7.3 Výsledky .....	- 20 -
7.3.1 Průběh klíčení .....	- 20 -
7.3.2 Mykorhizní partneři v kořenech dospělých rostlin.....	- 20 -
7.3.3 Izotopová analýza .....	- 20 -
7.4 Diskuse .....	- 23 -
8. Literatura .....	- 25 -
Přílohy .....	- 31 -

# 1. Úvod

## 1.1 Mykorhizní symbióza

Mykorhizní symbióza je druh soužití mezi houbou a rostlinou, při kterém vznikají specifické orgány zvané mykorhizy. Mykorhizní symbióza je v přírodě široce rozšířena a odhaduje se, že asi 90 % všech rostlin je běžně spojeno s půdními houbami (Wang a Qiu 2006). Jedná se tak o důležitou součást terestrických ekosystémů. V klasickém pojetí mykorhizní symbiózy dodává houba rostlině minerální látky a vodu, rostlina naopak poskytuje houbě asimiláty. Jedná se tak o vztah mutualistický.

Houby, vyskytující se v mykorhizách, zahrnují několik skupin pravých hub (Eumycota), a to Ascomycota, Basidiomycota, a Glomeromycota (Smith a Read 2008). Tyto houby kolonizují hlavně kořenovou pokožku (rhizodermis) a kořenovou kůru, která zpravidla tvoří několik vrstev pod rhizodermis (Gryndler a kol. 2004). Mykorhizy rozdělujeme podle způsobu kontaktu mezi houbou a kořenem. U endomykorhizního typu pronikají houbová vlákna do buněk hostitelské rostliny, u ektomykorhizy se houbová vlákna nacházejí jen v mezibuněčných prostorech. Pokud mykorhiza kombinuje znaky obou výše uvedených typů, nazýváme ji ektendomykorhiza (Gryndler a kol. 2004).

Endomykorhiza se dále rozděluje na několik dalších typů (Gryndler a kol. 2004):

- Arbuskulární mykorhiza (AM) je v přírodě nejrozšířenější, vyskytuje se přibližně u 80% rostlin (Smith a Read 2008) zahrnujících krytosemenné a nahosemenné rostliny, kapradiny, plavuně a přesličky. AM tvoří houby ze skupiny Glomeromycota. Tato mykorhiza je charakterizována mezibuněčnými i vnitrobuněčnými hyfami a keříčkovitými útvary nazývanými arbuskuly, nacházejícími se uvnitř buněk kořene.
- Erikoidní mykorhiza (ER) se vyskytuje hlavně u řádu Ericales a vyznačuje se charakteristickými smotky hyf uvnitř buněk. Nejvíce jsou při ní kolonizovány buňky rhizodermis.
- Orchideoidní mykorhiza (OM) se vyskytuje u rostlin z čeledi a je charakterizována Orchidaceae vytvářením klubíček hyf (pelotonů) uvnitř buněk kořenové kůry, skrz rhizodermis houbová vlákna jen pronikají (najdou se ale i výjimky u některých tropických druhů (Martos a kol. 2009) u kterých jsou kolonizovány i buňky rhizodermis).

Ektomykorhiza (ECM) je charakterizována hyfovým pláštěm obalujícím zkrácené kořínky rostlin a Hartigovou sítí tvořenou houbovými vlákny v mezibuněčných prostorech; vlákna zároveň nepronikají do vnitřních prostorů buněk hostitele. Tato mykorhiza se vyskytuje téměř výlučně u dřevin (Gryndler a kol. 2004).

Mezi méně známé druhy mykorhizy patří arbutoidní, monotropoidní a pyroloidní mykorhiza. Při arbutoidní mykorhize obaluje houba kořeny rostliny hyfovým pláštěm a vniká do buněk rhizodermis. Tuto mykorhizu můžeme pozorovat u některých rostlin z čeledi Ericaceae. Další dva typy, monotropoidní (čeleď Monotropaceae<sup>\*</sup>) a pyroloidní (čeleď Pyrolaceae<sup>\*</sup>) mykorhiza, jsou si velice podobné. Kořen je při nich obalován hyfovým pláštěm a v mezibuněčných prostorech je vytvářena Hartigova síť, podobně jako při ECM. Do vnitřních prostorů buněk zasahují hyfy jen krátkými výrůstky nazývanými kolíčky (Gryndler a kol. 2004). Ve všech třech případech se jedná o ektendomykorhizy.

Na mykorhizní symbiózu však nelze nahlížet jako na ideální mutualismus, spíše se jedná o kontinuum mutualistických až parazitických interakcí, v závislosti na druhu houby, rostliny a podmínkách prostředí. Dále je mnoho rostlin známo svojí závislostí na houbové výživě během klíčení a počátečního vývoje, později se však stávají autotrofními. Mezi tyto tzv. počáteční mykoheterotrofy řadíme některé kapradiny (např. *Botrychium*, *Ophioglossum*) a plavuně (např. *Lycopodium*, *Huperzia*), všechny autotrofní druhy orchidejí a pravděpodobně i některé zástupce čeledi Gentianaceae. Výjimku představují plně mykoheterotrofní (MH) rostliny, které zůstávají na houbové výživě závislé celý život a stávají se tak parazity (Björkman 1960).

MH rostliny se vyvinuly nezávisle na sobě u několika rostlinných čeledí: Monotropaceae, Gentianaceae, Petrosaviaceae, Triuridaceae, Burmanniaceae, Corsiaceae a Orchidaceae. Zatím bylo popsáno přibližně 400 druhů plně MH rostlin, z nichž 200 náleží do čeledi Orchidaceae (Leake 1994). U těchto rostlin došlo během vývoje ke ztrátě chlorofylu.

Jako typ výživy kombinující autotrofii (AO) a MH byla u rostlin popsána částečná mykoheterotrofie neboli mixotrofie (MX). Mixotrofie byla poprvé popsána u řas, později byla rozpoznána u orchidejí (Selosse a kol. 2004, Julou a kol. 2005). V nedávné době byla také popsána u některých rostlin čeledi Pyrolaceae (Tedersoo a kol. 2007). Předpokládaný evoluční vývoj probíhal ve směru od AO přes MX k MH (Selosse a Roy 2009).

Pro všechny tyto skupiny, jejichž členové jsou alespoň po část vývoje závislí na houbové výživě, jsou charakteristická malá semena obsahující minimum zásobních látek a

---

\* V současné době jsou již čeledi Monotropaceae a Pyrolaceae řazeny do čeledi Ericaceae.

dobře se šířící větrem, často velmi redukováný kořenový systém, schopnost klíčit s relativně úzkým spektrem mykorrhizních hub a dlouhá období dormance, během nichž dospělé rostliny netvoří nadzemní orgány.

## **2. Orchideoidní mykorrhiza**

### **2.1 Základní popis OM**

Orchidaceae představují jednu z největších rostlinných čeledí s odhadovaným počtem druhů 20 000 až 35 000 (Dressler 1993 a 2004, Malberley 1997, Cribb a kol. 2003). Některými autory je považována za největší vůbec (Cribb a kol. 2003). Jedná se o izolovanou vývojovou větev řádu Asparagales, která vznikla před 76 až 84 mil. let (Ramírez a kol. 2007). Orchideje jsou rozšířeny především v tropech, ale vyskytují se prakticky po celé zeměkouli, a to až po boreální pásmo. Můžeme najít jak terestrické, tak i epifytické a litofytické růstové formy. U orchidejí se také vyvinul specifický druh mykorrhizy, který má pro rostlinu zásadní význam – ta je na ni zcela adaptovaná a nedokáže bez ní v přírodních podmínkách vyklíčit (např. Rasmussen 1995, Gryndler a kol. 2004, Smith a Read 2008). Zároveň není známo, že by se tento typ mykorrhizy vyskytoval i v jiných čeledích rostlin (Gryndler a kol. 2004). Houby vytvářející OM rozdělujeme do dvou skupin. První tvoří saprotrofické houby ze skupiny rhizoctonia, druhou skupinou jsou houby běžně tvořící ECM.

První poznatky o závislosti orchidejí na mykorrhize pocházejí z počátku 20. století (Bernard 1909, Burgeff 1909). V té době byl také popsán první typ OM, a to tolipofágní forma (Bernard 1909). Druhým typem je ptyofágní forma (Burgeff 1932).

Tolipofágní forma je mnohem běžnější a byla popsána u drtivé většiny orchidejí. Nalezneme ji u všech vývojových stádií, od protokormu po dospělou rostlinu. Protokorm je specifický klíčící útvar orchidejí a odpovídá hypokotylu a kořenovému základu u ostatních rostlin. Vzniká z embrya a později se diferencuje v jednotlivá pletiva.

K průniku houbových vláken do protokormu dochází skrz suspenzorové buňky nebo skrze vlášení pokožky; u dospělých rostlin je to skrz rhizodermis (Rasmussen 1995, Gryndler a kol. 2004). Mykorrhizní houba se poté šíří jen ve vnější části kořenové kůry a nezasahuje do středního válce (Rasmussen 1995); existují ale i výjimky. Martos a kol. (2009) popsal u dvou MH tropických orchidejí kolonizaci střední a vnitřní části kořenové kůry, kdy zároveň byly kolonizovány i buňky rhizodermis.

Kolonizované buňky se dají rozlišit na několik skupin. Nejblíže k povrchu kořene leží vrstva buněk, kterými houba jen prorůstá. Prorůstání je výhradně symplastické, to jest přímo z buňky do buňky (Gryndler a kol. 2004). Blíže ke střednímu válci se nachází vrstva hostitelských a stravovacích buněk. V hostitelských buňkách jsou houbou vytvářeny pelotony. Ty zůstávají v periplazmatickém prostoru a jsou obklopeny vchlípenou plazmatickou membránou (Rasmussen 1995, Smith a Read 2008). Prostor mezi plazmatickou membránou rostliny a buněčnou stěnou houby je vyplněn cytoplazmou a hraje důležitou roli v přenosu živin. Na obou stranách tohoto prostoru je zaznamenávána aktivita ATPás (Smith a Read 2008). V další (stravovací) fázi buněk nastává lyze pelotonů, které jsou postupně degradovány. Lyze pelotonů je považována za obranu reakci rostliny (Smith a Read 2008) a předpokládá se, že hraje roli ve výživě rostliny (Rasmussen a Whigham 2002); tomu odpovídá i aktivita ATPás, která byla při lyzi zaznamenána jen na plazmatické membráně rostlinné buňky (Smith a Read 2008). Zatím se však během lyze nepodařilo prokázat enzymatickou aktivitu rostlinných buněk, která by odpovídala aktivnímu stravování pelotonů, takže je stále ještě možný scénář ve kterém je degradace hyf považována za autolýzu hyf samotných (Gryndler a kol. 2004). Zároveň v orchideových hlízách, kořenech i listech byly objeveny látky s fungicidním účinkem nazývané fytoalexiny (např. orchinol a hircinol), které patrně slouží ke kontrole a potlačování houbové kolonizace v rostlinných buňkách (Rasmussen 1995, McCormick a kol. 2006). Během lyze zůstává plazmatická membrána rostlinné buňky nepoškozena a buňka tak může být houbou znovu kolonizována (Smith a Read 2008).

Druhý typ OM, ptyofágní forma, je daleko méně prozkoumána a byla zatím popsána jen u několika nezelených tropických orchidejí. Hlavní rozdíl je v lyzi hyf. Narozdíl od lyze pelotonů u tolipofágní formy, při ptyofágní formě jsou stravovány jednotlivé hyfy prorůstající do buněk kořene (Gryndler a kol. 2004).

## **2.2 Význam mykorhizy pro orchideje**

Orchideje vytváření miniaturní semena bez endospermu a s minimem energetických zásob. Nedostatek živin způsobuje závislost na symbiotické houbě během klíčení a vývoje protokormu. Tato závislost trvá až do vyvinutí vlastního fotosyntetického aparátu, případně celý život u MH rostlin. Během tohoto období je rostlina považována za parazita na houbě. Semena také nemohou bez přítomnosti symbiotické houby využít vlastní energetické zásoby,

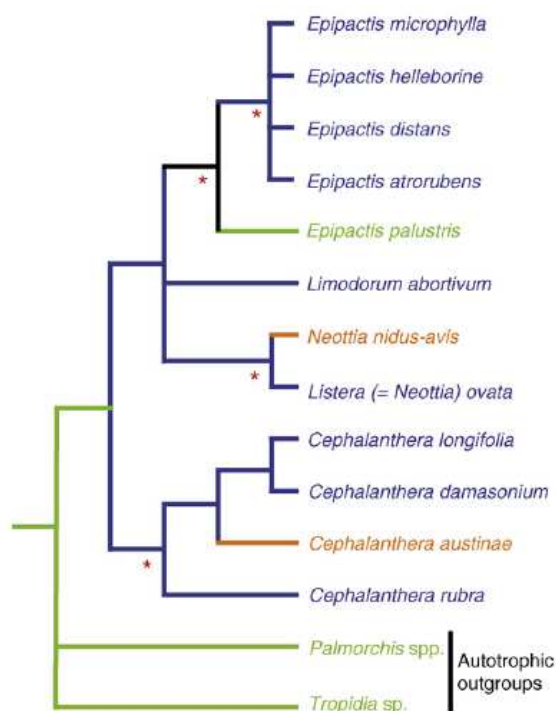


patrně kvůli nepřítomnosti glyoxysomu a nízké koncentraci endogenních sacharidů (Smith a Read 2008).

Později, po vyvinutí vlastního asimilačního aparátu, je rostlina již schopna sama si syntetizovat organické sloučeniny a stává se autotrofní. Zůstává však na houbě celoživotně závislá při získávání minerálních látek a vody (Rasmussen 1995). Zároveň i v dospělosti může rostlina od houby získávat některé organické sloučeniny (Cameron a kol. 2006, 2008). Dlouho byla sporná otázka, zda rostlina v dospělosti poskytuje část asimilátů houbě: převládá názor že nikoliv, a orchideje tak byly považovány za parazity (např. Rasmussen 1995). Poslední výzkumy však přesun asimilátů do houby prokázaly (Cameron a kol. 2006 a 2008, Látalová a Baláž 2010). Podle těchto výsledků se tak jedná o symbiózu v pravém smyslu slova, zároveň však o symbiózu mnohem méně stabilní než u jiných druhů mykorrhizy (Smith a Read 2008).

Mixotrofie byla u orchidejí nově popsána před několika lety (Selosse a kol. 2004), a zatím je známa pouze u tribu Neottieae a do něj náležejících rodů *Epipactis* a *Cephalanthera* (Selosse a kol. 2004, Julou a kol. 2005, Abadie a kol. 2006). U těchto rostlin, rostoucích na lesních stanovištích, byla odhalena kombinace AO a MH. Rostliny s nedostatkem světla, listové plochy či chlorofylu si tak vypomáhají získáváním organických sloučenin z mykorrhizních hub. Pomocí izotopových analýz bylo zjištěno, že tyto rostliny získávají 7 až 85 % uhlíku (Selosse a kol. 2004) a 61 až 77 % dusíku (Bidartondo a kol. 2004) od svého mykorrhizního partnera. Zároveň bylo zjištěno, že se MX druhy pojí s druhy hub typickými pro ECM. Prostřednictvím těchto hub vytvářejících jak OM, tak ECM mohou MX i MH rostliny získávat asimiláty z okolních stromů (Bruns 1995, McKendrick a kol. 2000). Tento vztah je také někdy nazýván epiparazitizmus (Björkman 1960).

Mykoheterotrofie se u orchidejí vyvinula asi dvacetkrát nezávisle na sobě. Tyto rostliny jsou po ztrátě chlorofylu doživotně závislé na výživě prostřednictvím mykorrhizy. U převážně



**Obr. 1.** Fylogeneze tribu Neottieae ukazující vývoj od autotrofie přes mixotrofii k plně mykoheterotrofii. Oranžová - mykoheterotrofie; modrá, mixotrofie - zelená, autotrofie - černá, neznámý způsob výživy. Převzato ze Selosse a Roy (2009).

většiny těchto rostlin byly jako mykorrhizní partneři rozpoznány ECM houby vázané na okolní stromy (McCornick a kol. 2000, Bidartondo 2005, Selosse a Roy 2009). Výjimku tvoří některé tropické druhy vázané na saprotrofické houby z řádů Agaricales (Martos a kol. 2009) a Tricholomatales (Ogura-Tsujita a kol. 2009).

Zajímavým zjištěním provedeným u MX druhů je schopnost přežít albinotických jedinců trpících ztrátou chlorofylu, což ukazuje na posun od MX k plné MH. Na základě těchto pozorování byl odvozen vznik MH u orchidejí ve třech krocích (Julou a kol. 2005, Selosse a Roy 2008): 1) přesun k ECM houbám dovolí MX; 2) specializace jen na několik mykorrhizních druhů hub; 3) přechod k plné MH a ztráta barviva. Poslední dva kroky mohly proběhnout i v opačném pořadí. Této představě odpovídá i fylogeneze tribu Neottieae (obr. 1).

## 2.3 Houboví partneři

Většina orchidejí se pojí se saprotrofickými houbami ze skupiny rhizoctonia, která patří mezi Basidiomycota. Rhizoctonia je uměle vytvořená polyfyletická skupina popsána na základě anamorfních stadií, která byla kultivována a umožnila rozčlenit skupinu do několika rodů, z nichž se s orchidejemi pojí hlavně rody *Epulorhiza*, *Ceratorhiza* a *Moniliopsis* (Rasmussen 1995, Gryndler a kol. 2004, McCormick a kol. 2004). Po vyvinutí nového způsobu kultivace se podařilo vyprovokovat tvorbu telemorfních stadií, 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). Kultivace jsou však zatíženy kontaminacemi a možností chyby. Proto se v poslední době místo kultivací používají k identifikaci symbiotických hub hlavně molekulární metody, které umožňují daleko přesnější určení druhu s menším rizikem kontaminace. Molekulární metody je vhodné doplnit transmisí elektronovou mikroskopií (TEM). Pozorování slouží k prověření, zda izolovaná houba opravdu tvoří OM, či zda se jedná o kontaminaci (např. endofyty).

Zvláštní postavení mezi rhizoctoniemi má řád Sebacinales, jehož zástupci jsou považováni za všudypřítomné a jsou často izolováni z OM (McKendrick a kol. 2002, Selosse a kol. 2002, Taylor a kol. 2003, Selosse a kol. 2004, Julou a kol. 2005, Bourgoire a kol. 2005), ER (Selosse a kol. 2007) a ECM (Selosse a kol. 2002, Urban a kol. 2002, Avis a kol. 2003, Moyersoen 2006, Tedersoo a kol. 2006). Tento řád, původně vytvořený na základě znaků telemorfních stadií, byl po molekulárních analýzách rozdělen na dvě skupiny, A a B, které se navzájem liší ekologií (Weiss a kol. 2004). Skupina A byla nejprve izolována

z některých MH druhů orchidejí (McKendrick a kol. 2002, Selosse a kol. 2002, Taylor a kol. 2003), později i z MX druhů (Selosse a kol. 2004, Julou a kol. 2005). Zároveň členové skupiny A vytvářejí ECM (Selosse a kol. 2002, Urban a kol. 2002, Avis a kol. 2003, Moyersoen 2006, Tedersoo a kol. 2006). Skupina B je tvořena saprotrofními druhy a je charakteristická pro zelené AO orchideje (Weiss a kol. 2004, Bougoure a kol. 2005). Zároveň obsahuje některé endofytické druhy (Peškan-Berghöfe a kol. 2004) a druhy vytvářející ER (Selosse a kol. 2007) a mykorrhizu s některými druhy jatrovek (Kottke a kol. 2003).

Druhou skupinu hub často nacházenou v OM tvoří houby běžně vytvářející ECM se stromy. Tyto houby jsou některými druhy využívány jako zdroj asimilátů, hlavně při nedostatku světla (Selosse a kol. 2004, Julou a kol. 2005) a jsou jakýmsi prostředníkem epiparazitizmu orchidejí na okolních stromech (Gardes 2002). Z ECM hub jsou v orchidejích nacházeni jak zástupci Basidiomycota (např. *Cortinarius* [Selosse a kol. 2004, Bidartondo a kol. 2004, Julou a kol. 2005], *Russula* [Girlanda a kol. 2006], *Inocybe*, *Tremela*, *Hymenogaster* [Bidartondo a kol. 2004]), tak i Ascomycota (např. *Tuber* [Selosse a kol. 2004, Bidartondo a kol. 2004]).

Pravděpodobnými důvody vysvětlujícími posunu k ECM partnerům by mohly být: 1) horší dostupnost rhizoctonií v lese (Selosse a kol. 2004); 2) výhodný přístup ke stromovým produktům fotosyntézy skrze ECM (Selosse a kol. 2004); 3) stabilnější zdroj uhlíku od ECM hub než od saprotrofních hub (Selosse a kol. 2004, Julou a kol. 2005, Martos a kol. 2009). Posun k ECM houbám se také pokládá za predispozici k plné MH (Julou a kol. 2005, Selosse a Roy 2008). Zároveň ale MH druhy vyskytující se v tropických oblastech jsou asociovány se saprotrofními druhy hub, což je patrně způsobeno omezeným výskytem ECM v tropech a rychlejším obratem živin (Martos a kol. 2009, Ogura-Tsujita a kol. 2009).

### **3. Fyziologie OM**

#### **3.1 Přehled stadií klíčení a jejich závislosti na mykorrhize**

Orchideje tvoří miniaturní semena s embryem bez diferencovaných pletiv. Během klíčení každé semeno nejprve projde asymbiotickou fází, během které absorbuje vodu a dochází k jeho nabobtnání, může dojít i k prasknutí testy (Smith a Read 2008). Semeno ale není schopné užít své energetické rezervy (pravděpodobně pro nepřítomnost glyoxisomu a nízkou koncentraci endogenních sacharidů), dokud není kolonizováno symbiotickou houbou – ta stimuluje glukoneogenezi a umožňuje mobilizaci zásobních látek (Smith a Read 2008). Zatím

nebyl rozpoznán žádný druh signálu mezi houbou a semenem, který by indukoval klíčení, často je ale uvažován chemický signál houby – ethylen nebo růstové hormony. Vliv těchto látek nebyl dosud v přírodě prokázán (Rasmussen a Rasmussen 2009), ač *in vitro* stimulují u některých druhů klíčení (Rasmussen 2002).

Při interakci semene s houbou může nastat několik možností: 1) mykorhizní interakce s následnou tvorbou pelotonů; 2) parazitování houby na semeni a následné zničení semene; 3) rezistence nebo odmítnutí houby. Při laboratorních pokusech rozhoduje o výsledku interakce i druh substrátu poskytnutého houbě – stejný druh houby se v závislosti na druhu substrátu chová jako symbiont nebo jako parazit, a to vždy při interakci se stejným druhem orchideje (Rasmussen 1995).

Embryo je houbou většinou kolonizováno přes buňky suspenzoru, případně přes epidermální vlášení (Rasmussen 1995, Smith a Read 2008). Po proniknutí do buňky hyfa invaginuje plazmatickou membránu a je obklopena tenkou vrstvou cytoplazmy. Kolonizované buňky mají hypertrofované jádra a dochází v nich k rozkládání škrobových zrn (Hadley a kol. 1971). Po kolonizaci dochází na bazální straně embrya k vytvoření protokormu a na apikální straně k vytvoření funkčních meristémů (Rasmussen 1995). Stádium protokormu trvá až do vytvoření růstového vrcholu s primordií, růst protokormu je monopodiální.

K rozlišení na zřetelné tkáň dochází v přírodních podmínkách velmi pomalu. Po vyvinutí asimilačních orgánů jsou již rostliny autotrofní, ale do té doby jsou plně závislé na mykorhizní houbě, toto období může trvat i několik let. U druhu *Dactylorhiza sambucina* toto období trvá 2 roky, u druhu *Listera ovata* 4 roky. První kvetení pak nastává po 13 až 15 letech (*Listera ovata*) (Procházka 1980).

### **3.2 Přenos uhlíku mezi houbou a rostlinou**

Naše znalosti o přenosu látek v orchidejích jsou zatím velmi omezené. V laboratorních pokusech na dospělých rostlinách se přenos uhlíku až donedávna nedařilo prokázat v ani jednom směru (houba→rostlina; rostlina→houba) (Hadley a Purves 1974, Alexandr a Hadley 1985) a předpokládá se jen přenos uhlíku z houby do rostliny (Rasmussen 1995). V poslední době byl však přenos uhlíku u dospělých rostlin prokázán pomocí izotopů.

Nejprve byl prokázán přenos uhlíku u MH rostlin duhu *Colarorhiza trifida*. Během laboratorních pokusů bylo prokázáno, že *C. trifida* získává uhlík od okolních stromů prostřednictvím asociované ECM houby (McKendrick a kol. 2000).

Později byl u AO rostlin druhu *Goodyera repens* prokázán jak přenos uhlíku z houby do rostliny, tak i přenos zpět (Cameron a kol. 2006) a množství uhlíku předané houbě rostlinou bylo asi pětkrát větší (Cameron a kol. 2008). Přenos byl prokázán v laboratorních podmínkách pomocí radioaktivního izotopu uhlíku a bylo při něm zjištěno, že rostlina předá houbě asi 2,6 % z celkového množství asimilovaného uhlíku. Toto množství stačí k prokázání mutualistické asociace (Cameron a kol. 2006), i když se OM zdá méně mutualistickou než ostatní druhy mykorhiz – 6,6 až 8,9 % asimilovaného uhlíku je do houby přeneseno u AM (Leake a kol. 2006) a 20 % u ECM (Smith a Read 2008). Přes tyto výsledky je přenos uhlíku dále debatován a někteří autoři nepovažují tyto výsledky za prokazatelné (Rasmussen a Rasmussen 2009). Hlavním důvodem je malé množství (2,6 %) asimilátů předané rostlinou houbě (Cameron a kol. 2006 a 2008). Nejnovější poznatky, získané během výzkumu prováděného na dospělých druhu *Serapias strictiflora* asociovanými s houbou rodu *Epulorhiza* ukázají, ukazují, že houba může získat asi 70 % uhlíku od orchideje a jen 30 % uhlíku ze substrátu (Látalová a Baláž 2010). Tyto výsledky jsou již daleko méně zpochybnitelné.

Po biochemické stránce je uhlík přenášen hlavně ve formě cukrů a aminokyselin přes neporušené plazmatické membrány rostliny a houby (Smith a Read 2008). Cukrem trehalózou jsou vyživovány hlavně heterotrofní semenáčky a rostlina si trehalózu přeměňuje na sacharózu v dosud neznámé reakci. Přeměna trehalózy na sacharózu probíhá patrně těsně po přenesení trehalózy do rostlinné buňky, případně v cytoplazmě ležící mezi houbovou buněčnou stěnou a rostlinou plazmatickou membránou (Cameron a kol. 2006, Smith a Read 2008). Dalšími cukry, jejichž prostřednictvím by mohl být uhlík přenášen, jsou fruktóza a glukóza (Ponert a Lipavská 2009). Aminokyseliny jsou přenášeny kotransportem se sodíkem; a to jak do semenáčků, tak do dospělců (Smith a Read 2008).

### **3.3 Přenos dusíku a dalších látek mezi houbou a rostlinou**

Na dodávkách dusíku houbou je rostlina celoživotně závislá. Předpokládá se, že je přenášen při transportu aminokyselin spolu s uhlíkem, případně ještě nějakou další, dosud neobjevenou cestou (Smith a Read 2008). U dospělých rostlin jde o mutualistický vztah, kdy je výměnou za uhlík přenášený z rostliny do houby přenesen v opačném směru dusík (Cameron a kol. 2006) a fosfor (Cameron a kol. 2007). Mezi další látky, poskytované houbou rostlině patří voda a minerální látky, kterých si rostlina díky málo vyvinutému kořenovému systému nedokáže obstarat potřebné množství. Předpokládá se také přenos některých vitamínů a

růstových faktorů důležitých hlavně u semenáčků, ale pro tento přenos zatím neexistují přímé důkazy (Smith a Read 2008).

## **4. Abiotické a biotické faktory ovlivňující klíčení a růst orchidejí**

Většina abiotických a biotických faktorů, ovlivňujících růst orchidejí v době klíčení a vývoje semenáčku, byla zjišťována na základě pozorování *in vitro* a jen velmi málo jich bylo zjišťováno přímo na lokalitách výskytu (Rasmussen 1995).

### **4.1 Abiotické faktory**

Z abiotických faktorů jsou pro vývoj semenáčků nejdůležitější teplota, vlhkost, světlo a atmosférické podmínky (Rasmussen 1995), důležitým faktorem je také druh půdního substrátu a obsah živin v půdě (Batty a kol. 2001, Diez 2007).

TEPLOTA A VLHKOST spolu úzce souvisí. Největší úmrtnost semenáčků orchidejí je pozorována v důsledku vysušení – při působení vysokých teplot a následném nedostatku vlhkosti. Toto vysušení nastává hlavně v mělkých půdách (Rasmussen 1995).

Při pozorování *in vitro* byla zjištěna optimální teplota pro růst většiny temperátních druhů orchidejí mezi 20 a 29 °C. Zároveň bylo zjištěno, že při nedostatku vlhkosti nebo při vysokých teplotách dochází k odumírání kořenů. Další důsledek vysokých teplot, pozorovaný *in vitro* je změna funkce mykorhizní houby z mutualistické na parazitickou, či případné odumření houby (Rasmussen 1995).

Při teplotách nižších, asi tak 12 až 15 °C, je menší přírůstek rostlinné hmoty, ale rychlost vývoje zůstává stejná a semenáčky mohou mít menší úmrtnost. Nízké teploty jsou také nutné pro stratifikaci, což je období, během něž dochází k ukončení fyziologické dormance semen. Dále chladné období, odpovídající podzimním teplotám, indukuje růst kořenů. Naopak studené období, odpovídající zimním teplotám, indukuje vývoj listů. (Rasmussen 1995).

SVĚTLO je pro fotosyntetické rostliny limitující faktor, při vývoji protokormu je však nežádoucí. Vyvíjející se protokorm je velmi citlivý na světlo a vyžaduje naprostou tmou po prvních několik měsíců; v případě osvětlení byla pozorována velká úmrtnost (až 85%) (Rasmussen 1995, Rasmussen a Whigham 2002). Rovněž kořeny rostou jen ve tmě; a tmavá

perioda poskytne rostlině čas k přechodu na autotrofní výživu. Jinak je tomu u epifytických druhů, u kterých probíhá prakticky celý vývoj na světle.

V pozdějším vývoji již světlo podporuje rozvoj růstového vrcholu, vytvoření kořenů a následný posun k autotrofii. U rostlin v tomto stadiu vývoje byl zjištěn pozitivní gravitropismus (Rasmussen 1995). Dospělé rostliny již nutně potřebují světlo ke svému životu, a jeho nedostatek je pravděpodobně jeden z důvodů vzniku MX (Selosse a kol. 2004, Julou a kol. 2005).

ATMOSFÉRIKÉ PODMÍNKY byly pozorovány pouze *in vitro* a zahrnovaly zjišťování hladin O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> vhodných pro růst semenáčků. Bylo zjištěno, že optimální koncentrace, vhodná pro růst semenáčků, je u O<sub>2</sub> 8-11 % a u CO<sub>2</sub> 2-3 %; tyto hodnoty zároveň odpovídají hodnotám běžně zjišťovaným v půdě. Vyšší koncentrace CO<sub>2</sub> (6-10 %) již růst semenáčků inhibuje (Rasmussen 1995).

Vhodné PŮDNÍ PODMÍNKY byly zkoumány pokusy *in situ* (Batty a kol. 2001, Diez 2007) a bylo zjištěno, že růst je podporován vyšší půdní vlhkostí, vyšším obsahem organických látek a nižším pH. Půdní struktura neměla na růst výraznější vliv. Některé druhy půdních substrátů zároveň mohou u semen indukovat klíčení. Jedná se patrně o asociaci k substrátům vhodným pro růst jejich symbiotických hub (Rasmussen 2002).

K důležitým půdním podmínkám také patří obsah biotických prvků. Mírné zvýšení obsahu dusíku a fosforu může zvyšovat klíčivost semen (Batty a kol. 2001, Diez 2007), zatímco na vysoký obsah dusíku, draslíku a fosforu již orchideje reagují negativně (Rasmussen 2002). Zdá se však, že rostliny nereagují přímo na vysoký obsah látek v půdě, ale na zvýšení intenzity růstu konkurenčních rostlin (McKendrick 1996, Baláž a Kyjovská 2009).

## 4.2 Biotické faktory

Vhodné biotické podmínky závisí hlavně na přítomnosti symbiotické houby vhodné pro klíčení. Při pokusech *in vitro* bylo zjištěno, že ne všechny houby izolované z kořenů dospělých rostlin podporují klíčení (např. Rasmussen 2002, McCormick a kol. 2004), což může být způsobeno izolací endosymbiotických hub či povrchových kontaminantů. Podmínky *in vitro* pokusů jsou také odlišné od přirozených podmínek, proto by se pro správné pochopení vztahů při klíčení měly používat hlavně výsledky pokusů *in situ* (Rasmussen 2002).

Pokusy s klíčením semen ukazují, že některé houby podporují jen vývoj protokormu či pouze indukují klíčení a neumožňují celý vývoj rostliny. Dále bylo při pokusech s klíčením

zjištěno, že semena na médiu s více houbami klíčí rychleji, zároveň ale byl v protokormu nalezen vždy jen jeden druh symbiotické houby (McCormick a kol. 2006). Vhodná symbiotická houba zároveň umožňuje rostlině přežít při velkých výkyvech počasí; toto je patrně problém některých vzácných druhů orchidejí, vázaných na omezenou skupinu hub s nižší ekologickou valencí a neumožňujících přežít při velkých výkyvech počasí (McCormick a kol. 2006). Přítomnost vhodné symbiotické houby se tak jeví jako klíčový faktor omezující rozšíření orchidejí.

O rozšíření symbiotických hub však máme jen velmi omezené znalosti. Největší hustota hub vhodných pro klíčení je zjišťována v nejbližším okolí dospělých rostlin do vzdálenosti 1 m (Batty a kol. 2001, McKendrick a kol. 2002, Diez 2007). Zároveň bylo zjištěno, že rozložení hub na stanovištích je velmi nerovnoměrné (Diez 2007), což způsobuje mozaikovitě klíčení (McKendrick a kol. 2002). Rozdíl je také mezi jednotlivými skupinami hub. Zatímco saprotrofní houby jsou v přírodě rozšířeny relativně rovnoměrně, ECM houby jsou vázány na vhodná lesní stanoviště, a omezují tak rozšíření druhů na ně vázaných. U orchidejí vázaných na ECM partnery bylo také zjištěno, že přítomnost dospělého jedince jen minimálně ovlivňuje klíčivost. Předpokládá se tedy, že pro klíčení těchto rostlin je důležitá přítomnost ECM kořenových špiček vytvářených vhodnou houbou (McKendrick a kol. 2000).

Mezi biotické faktory ještě můžeme zahrnout poškozování rostlin fytofágy a patogeny, stejně jako vliv okolního porostu. Zastínění stromy se předpokládá jako důvod vzniku MX umožňující rostlinám vyrovnat se s nedostatkem světla. Na lučních lokalitách se zase jedná o konkurenci dalších rostlin; orchideje jsou konkurenceschopné hlavně na živinami chudých lokalitách, kde je zvýhodňují jejich mykorhizní houby. Na eutrofizovaných lokalitách jsou vytlačeny okolními rostlinami (McKendrick 1996, Baláž a Kyjovská 2009).

## **5. Ekologické důsledky závislosti na mykorhizní symbióze**

Už Darwin (1862) se divil malému počtu semenáčků vzhledem k obrovskému počtu semen produkovaných orchidejemi. Velké množství semen, adaptovaných k roznášení větrem, je vykoupeno jejich minimálními energetickými zásobami způsobujícími závislost klíčení na přítomnosti vhodné symbiotické houby. Tato závislost je hlavní faktor omezující klíčení a následně rozšíření orchidejí v krajině.

Zatím bylo publikováno jen velmi málo studií pracujících s omezeným počtem druhů. Tyto studie naznačují, že navzdory poměrně velké klíčivosti se méně než 1 % semen vyvine



do životaschopné rostliny (Batty a kol. 2001). To je ovlivněno následujícími faktory: 1) asi 50 % semen se dostane do semenné banky (Baskin a Baskin 1998); 2) méně než 10 % semen se dostane na vhodné stanoviště a vyhne se predaci (Batty a kol. 2001); 3) v důsledku bottlenecku se jen část vyklíčených semen vyvine do dospělé rostliny.

Bottleneck v tomto případě představuje výrazné zmenšení spektra hub vhodných k celému vývoji rostliny. K bottlenecku u orchidejí dochází ve dvou fázích: poprvé během vývoje protokormu, podruhé při přechodu k autotrofní výživě (např. Rasmussen 2002, McCormick a kol. 2006). Bottleneck je důsledkem následujících bodů (Bidartondo a Read 2008): 1) semena mají k dispozici jen omezený výběr hub dané lokality; 2) mnohé z těchto hub jsou schopné iniciovat klíčení; 3) mnohem méně hub umožňujících klíčení zároveň umožňuje další vývoj semenáčku.

Několikanásobně větší naději na nalezení vhodné houby mají semena dopadající do okolí dospělých rostlin (McKendrick a kol. 2002, McCormick a kol. 2006), kam ale také většina semen ve skutečnosti dopadne a jen minimum semen je přeneseno na velké vzdálenosti (Jersáková a Malinová 2007).

Velkým omezením je také vysoká specializace některých druhů neumožňující často najít vhodného partnera a vyklíčit, naopak rostliny s malou specializací se mohou stát dokonce invazními, např. druh *Disa bracteata* v Austrálii (Bonnardeaux a kol. 2007).

Specializace je pravděpodobně způsobena komplexnějším rozpoznávacím mechanismem u specializovaných druhů (Bonnardeaux a kol. 2007). Mezi jednotlivými druhy orchidejí je ve specializaci velký rozdíl (Girlanda a kol. 2006, Smith a Read 2008) a předpokládalo se, že největší variabilitu v partnerech nalezneme u AO druhů orchidejí (Girlanda a kol. 2006). McCormick a kol. (2004) ale zjistili, že ve stádiu protokormu je rozmanitost partnerů u AO orchidejí stejná nebo dokonce nižší než u MH druhů. Rovněž u některých tropických MH druhů asociovaných se saprotrofními druhy hub byla zjištěna velmi malá specifita (Martos a kol. 2009).

Velká specializace se také předpokládala u druhů vázaných s ECM houbami. I zde jsou však velké rozdíly mezi druhy. Některé druhy jsou schopny klíčit na mnoha lokalitách s využitím místních druhů hub (*Epipactis helleborine* [Bidartondo a Read 2008]), zatímco jiné jsou vázány na omezenou skupinu Ascomycota (*Epipactis microphyla* [Selosse a kol. 2004]) či Basidiomycota (*Cephalanthera longifolia* [Abadie a kol. 2006]).

Výhodou specializace je menší ztrátovost semenáčků po vyklíčení, kdy u druhů s nízkou specializací dochází k velkým úhynům protokormů kvůli nedostatku preciznosti v rozpoznávacím procesu při klíčení (Bonnardeaux a kol. 2007). Zároveň ale velká

specializace znamená: a) nemožnost změnit mykorhizního partnera v případě jeho ztráty během vývoje – to je hlavní důvod úhynu u specializovaných druhů; b) obtížnější vyhledávání vhodného mykorhizního partnera (McCormick a kol. 2006).

Specializace většinou probíhá na rodové úrovni hub, jen velmi výjimečně dochází ke specializaci na úrovni druhové (Rasmussen 2002). Dostatek hub, potřebných ke klíčení také může mít vliv na schopnost orchidejí tolerovat disturbance a enviromentální změny.

Semena zůstávající v půdě vytvářejí semennou banku, o jejíž trvanlivosti máme jen velmi omezené znalosti. Whigham a kol. (2005) při pokusech *in situ* zjistili, že největší počet klíčících semen je nalezen v prvních pěti letech, zároveň ale po pěti letech bylo ještě 30-70 % semen (v závislosti na druhu) životaschopných ač už nebylo nalezeno žádné klíčící. Velký rozdíl je mezi jednotlivými druhy. Zatímco luční druhy, které se pojí se saprotrofními houbami, vytvářejí jen krátkodobou semennou banku (Øien a kol. 2008), druhy vázané s ECM partnery vytvářejí naopak dlouhodobou semennou banku umožňující jim počkat na partnera vhodného pro klíčení (Whigham a kol. 2005).

## 6. Závěr

Ve zkoumání mykorhizní symbiózy ještě stále zůstává mnoho nezodpovězených otázek, bez jejichž vyřešení není možná efektivní ochrana orchidejí, jedné z nejohroženějších rostlinných skupin (Swarts a Diwon 2008). Dají se tak formulovat otázky k dalšímu výzkumu OM.

V jaké formě jsou přenášeny látky z houby do rostliny a naopak?

Jaký je princip přenosu látek?

Je u MX orchidejí přenášen uhlík z rostliny do houby a v jakém množství?

Jak rostlina rozpozná houbu vhodnou pro klíčení, a jak houba rostlinu?

Je počátek klíčení iniciován houbou?

Jakým způsobem rostlina reguluje houbovou infekci?

Jaká je distribuce hub vhodných pro OM ve volné přírodě?

Jaká je míra specializace u jednotlivých druhů orchidejí?

Jaká je trvanlivost a velikost semenné banky u orchidejí?

## 7. Návrh diplomové práce

### 7.1 Úvod

Proto, abych zjistil, do jaké míry jsou orchideje limitovány svými mykorhizními partnery, jsem si vybral dva modelové druhy rodu *Listera* – *L. ovata* a *L. cordata* charakteristické svou odlišnou ekologickou valencí. Rod *Listera* spadá do tribu Neottieae, u kterého je známý výskyt epiparazitických druhů, zároveň je to sesterský rod k MH rodu *Neottia* (Obr. 1, Selosse a Roy 2009). Díky tomu by se dalo předpokládat spojení modelových druhů s ECM houbami. Na základě izolace kultur hub z kořenů a jejich morfologické identifikace se však usuzuje, že se druh pojí s houbami ze skupiny rhizoctonia běžnými pro luční orchideje (Downie 1959, Rasmussen a kol. 1991). *L. ovata* je také charakteristická širokou nikou, sahající od lučních společenstev po světlé lesy. Zároveň se ale vyhýbá silně zastíněným stanovištím charakteristickým pro většinu rostlin z rodu Neottieae. Druh *L. cordata* zatím nebyl podrobně prozkoumán, a o jeho mykorhizních asociacích proto nevíme nic (Rasmussen 1995). Vzhledem k jeho výskytu na stinných lokalitách zrašelinělých horských smrčín se dá předpokládat jeho posun k MX a ECM houbám charakteristickým pro okolní jehličnany. Oba dva druhy se také nikdy nevyskytují na stejném stanovišti.

Na základě výzkumu těchto druhů bychom mohli lépe porozumět faktorům limitujícím výskyt orchidejí, a to hlavně limitaci mírou specifity, ekologií a rozšířením vhodných druhů hub. Dalším cílem výzkumu je porovnat mykorhizní partnery během různých ontogenetických stadií a potvrdit tak předpokládané zužování spektra houbových partnerů během růstu orchidejí (bottleneck, Bidartondo a Read 2008).

Pro můj výzkum jsem si tak stanovil následující otázky:

- 1) Je klíčení obou druhů omezeno jejich mykorhizními partnery nebo je omezováno jinými abiotickými či biotickými faktory?
- 2) Se kterými houbami se oba druhy pojí? Liší se spektrum houbových symbiontů na různých lokalitách?
- 3) Mění se spektrum symbiotických hub během vývoje rostliny?
- 4) Liší se modelové druhy od ostatních druhů orchidejí v míře mykoheterotrofie?

### 7.2 Metodika

#### 7.2.1 Popis vybraných druhů:

*Listera ovata* (L.) R. Br. – je jeden z nejběžněji se vyskytujících druhů orchidejí v Čechách. Má rozsáhlý euroasijský areál rozšíření, můžeme ho najít v celé Evropě s výjimkou severní

Skandinávie a oblasti Mediteránu. *L. ovata* má širokou ekologickou valenci a v Čechách se vyskytuje od nížin po podhorské oblasti na loukách i v různých typech světlých lesů. Nikdy se neroste v silně zastíněném podrostu (Procházka 1980).

*Listera cordata* (L.) R. Br. – jedná se o vzácný druh, který je ve střední Evropě striktně vázaný na horské rašelinné smrčiny. Druh má cirkumpolární rozšíření a můžeme ho najít v horských oblastech Evropy, ve Skandinávii i v nižších polohách. O jeho mykorhizních asociacích zatím nebyly publikovány žádné poznatky (Procházka 1980).

### 7.2.2 Popis lokalit

Pro pokus byly vytipovány vhodné lokality nacházející se v oblasti Šumavy a ve Smrčinách (jedna lokalita *L. cordata*). Bylo vybráno šest lučních a šest lesních lokalit s populací *L. ovata* a šest lokalit *L. cordata* (přehled viz příloha 1).

### 7.2.3 Vysévací pokus

Pro výzkum schopnosti semen modelových druhů klíčit na mateřských a sesterských lokalitách jsem použil rámečkovou metodu vyvinutou Rasmussen a Whighamem (1993), při které jsou semena vložena do jemné síťoviny uzavřené do diarámečku. Hustota síťoviny (48 $\mu$ m) umožňuje vstup mykorhizním houbám a mikroorganismům. Poté je rámeček zahrabán do země. Tato metoda umožňuje klíčení semen v takřka přírodních podmínkách a následné snadné vyjmutí z půdy.

Semena použitá pro výsev jsem získal ze zralých semeníků rostlin sebraných na vybraných lokalitách. Ze semen jsme poté vytvořily tři směsné vzorky – lesní *L. ovata*, luční *L. ovata* a *L. cordata*. Semena *L. cordata* byla v samostatném rámečku, semena *L. 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 směsí jsou uvedeny v tabulce I; množství a druhy rámečků zahrabaných na jednotlivých lokalitách jsou uvedeny v tabulce II. Malé množství rámečků se semeny *L. cordata* vysazovaných během roku 2008 bylo způsobeno nedostatečným množstvím semen sebraných na jednotlivých lokalitách. Proto bylo vysazování opakováno i v roce 2009. Ze stejného důvodu byly vysazovány nerovnoměrné počty rámečků a některé lokality byly vynechány.

Rámečky se semeny obou druhů byly poté zasazeny společně, na některé vybrané lokality *L. ovata* byly sazeny pouze rámečky tohoto druhu. Tento design nám umožní porovnat klíčivost obou druhů na mateřských i sesterských lokalitách a odhalit důvody limitace rozšíření; zda je limitace způsobena rozšířením vhodné mykorhizní houby nebo jiným biotickým či abiotickým faktorem. Na vybraných lokalitách bylo také zasazeno několik

zkušebních rámečků (Tab. II), které budou postupně vyjímány a slouží ke sledování pokroku v klíčení.

V roce 2009 bylo vytaženo po jednom rámečku od každého druhu na lokalitách Javorník les a Javorník louka; celkem tedy čtyři rámečky. Semena byla zkontrolována pod binolupou, spočtena a rozdělena do následujících kategorií: 1) neklíčící – neprojevují žádnou známku klíčení, 2) klíčící – obsahují nemykorhizní embrya kulovitého tvaru, 3) mykorhizní – rané stádium protokormu, počátek diferenciacie pletiv 4) protokorm – embryo výrazně diferencováno.

**Tab. I.** 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>L. cordata</i>	78,5	60 ( $\pm$ 5,9)	96,4	135 ( $\pm$ 11,1)
<i>L. ovata</i> louka	97,2	86 ( $\pm$ 13,8)	97,5	194 ( $\pm$ 16,7)
<i>L. ovata</i> les	95	86 ( $\pm$ 13,8)	96,8	174 ( $\pm$ 28,4)

**Tab. II.** Počty rámečků zahrabaných 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 Kepy; NC Nicov; NB Nebe; JL Javorník louka; LO *L. ovata*; LC *L. cordata*; ZLO a ZLC zkušební rámečky.

Rok	2008			Rok	2009					
Lokalita	LO	LC	ZLO	Lokalita	LO	LC	ZLO	ZLC	Celkem	
<i>L. cordata</i>	ZR	16	4	0	ZR	14	10	4	4	52
	ZS	18	4	6	ZS	14	10	0	0	52
	PN	18	4	6	PN	14	10	4	4	60
	NM	12	4	0	NM	14	10	0	0	40
	BO	18	4	6	BO	14	10	0	0	52
	JS	12	4	0	JS	14	10	0	0	40
<i>L. ovata</i> louka	MD	12	0	0	MD	14	7	0	0	33
	VB	12	0	0	VB	14	7	0	0	33
	VK	12	0	0	VK	14	0	0	0	26
	LH	18	4	6	LH	14	0	0	0	42
	LL	18	4	6	LL	14	7	4	4	57
	JK	18	4	6	JK	14	7	0	0	49
<i>L. ovata</i> les	VS	12	0	0	VS	14	0	0	0	26
	SP	12	0	0	SP	14	0	0	0	26
	KP	12	0	0	KP	14	7	0	0	33
	NC	18	4	6	NC	14	7	0	0	49
	NB	17	4	5	NB	14	7	4	4	55
	JL	18	4	6	JL	14	7	0	0	49
Součet	273	48	53	Součet	252	116	16	16	774	

## 7.2.4 Mykorhizní partneři v dospělosti

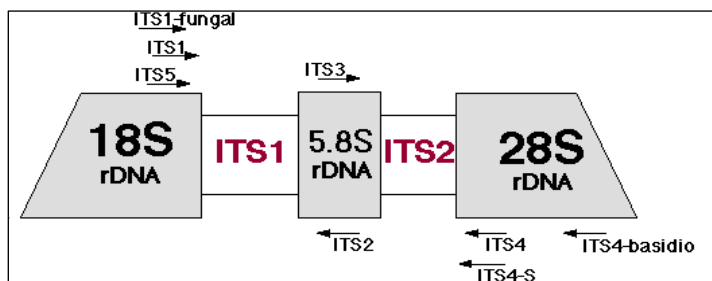
Pro zjištění mykorhizních partnerů u dospělých rostlin byly provedeny odběry kořenů. U druhu *L. cordata* jsem odebíral vzhledem k velikosti rostliny celé jedince, a to vždy tři z jedné lokality. U jedinců *L. ovata* jsem odebral po třech kořenech z pěti rostlin na každé lokalitě, kvůli minimalizaci poškození rostliny. Kořeny byly po odběru očištěny, vloženy do 60% ethanolu a převezeny do laboratoře, kde byly rozřezány po 0.5 cm. Byla zjišťována přítomnost a kvalita houbové infekce. Z infikovaných částí byly nařezány 2mm 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.

Zatím byly analyzovány řezy z lokalit Vinice les (4 rostlin), Javorník les (4 rostlin), Javorník louka (4 rostlin), Lštění (4 rostlin) a Ztracenný rybník (3 rostliny).

## 7.2.5 Metody molekulární identifikace

Pro izolaci DNA jsme použili Invisorb spin Plant Mini Kit (INVITEK GmbH) a postupovali jsme dle pokynů výrobce. Jediný rozdíl byl v přidání PVPP (Polyvinylpyrrolidon) během rozdrčení vzorku pro odstranění sekundárních metabolitů.

Během následné PCR byly amplifikovány úseky ITS1, 5,8S, ITS2 a 28S rDNA (Obr. 2). Při přípravě směsi pro PCR jsem používal Plain PP Master Mix (Top-Bio) a složení reakce bylo následující: 10 µl Master Mixu; 2,4µl 5' primeru (2,5 pmol), 2,4 µl 3' primeru (2,5 pmol), 4 µl DNA a 1,2 µl ddH<sub>2</sub>O (výsledný objem 20 µl). Při amplifikaci jsem používal několik různých primerů, abych podchytil veškerou diverzitu hub v kořenech orchidejí. Použil jsem následující primery: ITS1-F (univerzální pro



**Obr. 2.** Schéma sekvenovaného úseku rDNA. ITS1-OF leží na stejném místě jako ITS1-F (fungal); ITS3-Seb leží na místě ITS3; ITS4-OF, ITS4-Asco a ITS4-Tul leží mezi ITS4 a ITS4-B; TW13 leží na úseku 28S za ITS4-B (basidio). Převzato z The Bruns Lab (<http://plantbio.berkeley.edu/~bruns/>).

všechny Eumycota kromě rodu *Tulasnella*; Gardes a Bruns 1993), ITS4-B (univerzální pro Basidiomycota s výjimkou některých druhů rodů *Tulasnella* a *Sebacina*; Gardes a Bruns 1993), ITS1-OF a ITS4-OF (univerzální pro Basidiomycota pojící se s orchidejemi; Taylor a McCormick 2008), ITS4-Asco (univerzální pro Ascomycota; Nikolcheva a Bärlocher 2004), 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

Eucaryota; White a kol. 1990), ITS4 (univerzální pro Eucaryota; White a kol. 1990) a TW13 (univerzální pro Eucaryota; O'Donnell 1993). Pro primerové kombinace ITS1-OF+ITS4-OF, ITS1-F+ITS4-Asco, ITS1+ITS4-Tul, ITS1+ITS4-B jsme použili následující cyklus: 5 min. počáteční denaturace při 95 °C, následovaná 32 nebo 35 cykly denaturace 1 min. při 95 °C, annealing 1 min. při 52 °C a elongace 1 min. a 30 s při 72 °C; konečná 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 smíchán s barvivem GelRed (Biotium) a nanesen na 1,5% agarózový gel v 1x TBE pufru. Jako standart byl použit 100 bp DNA Ladder (NEB).

Produkt PCR byl purifikován pomocí enzymu ExoSAP-IT (USB Corporation). Při jednosměrné sekvenaci, provedené jihokorejskou firmou Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>), byly použity primery ITS1 (při PCR kombinace primerů začínající ITS1 a ITS1-OF), ITS1-F (ITS1-F) a ITS3-Seb (ITS3-Seb). Získané sekvence jsem upravil pomocí programů Finch TV 1.4.0 (Geospiza Inc.) a ChromasPro 1.42 (Technelysium Pty. Ltd.) a nakonec identifikoval porovnáním s databází GenBank u NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) pomocí metody BLAST (Altschul a kol. 1997).

### 7.2.6 Izotopová analýza

Pro izotopovou analýzu byly vybrány čtyři lokality: dvě lesní lokality *L. ovata* (Javorník les a Nicov) a dvě lokality *L. cordata* (Ztracená slat' a Ztracený rybník). Na každé lokalitě bylo odebráno po pěti listových vzorcích ze zkoumaných orchidejí, dále pak listové vzorky z okolních autotrofních rostlin a vzorky plodnic z nalezených ECM a saprotrofních druhů hub. Listy byly odebírány pokud možno ve stejné výšce nad zemí (30 cm). Sebrané vzorky byly vysušeny a z každého vzorku bylo odebráno 10 mg (rostlina) nebo 20 mg (houba) sušiny, ta byla rozemleta na kulovém mlýnku a připravené vzorky byly odeslány na analýzu obsahu stabilních izotopů  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  do INRA Centre de Nancy ve Francii.

## 7.3 Výsledky

### 7.3.1 Průběh klíčení

Na lokalitě Javorník les bylo zjištěno poměrně velké procento klíčících semen druhu *L. ovata* (60 % u luční směsi a 64 % u lesní směsi). Na luční lokalitě bylo množství klíčících semen daleko menší (4 % u luční směsi a 7 % u lesní směsi). Nebylo však nalezeno ani jedno klíčící semeno u druhu *L. cordata* (Tab. IV). Zároveň byly nalezeny jen malé protokormy na počátku svého vývoje. Pro další analýzy jsou však nutné protokormy plně vyvinuté. Proto byly experimentální rámečky zatím ponechány v půdě a vyjmutí první skupiny rámečků ze země se předpokládá až na podzim roku 2010 (opět po prohlédnutí několika zkušebních rámečků). Bude se jednat o rámečky zahrabané na podzim 2008, rámečky zahrabané v roce 2009 se budou pravděpodobně vyndávat až v roce 2011.

**Tab. III.** Klíčení semen ve zkušebních rámečcích. 0-neklíčí, 1-klíčící, 2-mykorhizní, P-protokorm.

lokalita	typ semen	0	1	2	P
Javorník les	<i>L. ovata</i> louka	19	30	1	0
	<i>L. ovata</i> les	14	36	6	0
	<i>L. cordata</i>	37	0	0	0
Javorník louka	<i>L. ovata</i> louka	75	3	0	0
	<i>L. ovata</i> les	82	6	0	0
	<i>L. cordata</i>	49	0	0	0

### 7.3.2 Mykorhizní partneři v kořenech dospělých rostlin

Ve všech dosud analyzovaných rostlinách jsem našel houby ze skupiny rhizoctonia běžné u lučních orchidejí (Tab. IV). Nejčastěji nalezenou houbou u obou druhů byla *Sebacina vermifera*, která byla zjištěna u 18 z 19 zkoumaných rostlin. U *L. ovata* byla na většině lokalit zjištěna i *Tulasnella calospora*. Dále jsem vyizoloval několik dalších druhů hub ze skupiny Basidiomycota (např. *Tylospora* sp.) i Ascomycota (např. *Alternaria* sp.) a několik druhů hub tvořících ECM (např. *Tylospora* sp., *Meliniomyces* sp.).

### 7.3.3 Izotopová analýza

Analýza stabilních izotopů ukázala jen minimální rozdíly v obsahu  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  mezi modelovými druhy a okolními autotrofními rostlinami (Tab. V a Obr. 3). U *L. ovata* bylo zjištěno zvýšení obsahu  $^{13}\text{C}$  na lokalitě Nicov o 0,06 ‰ a na lokalitě Javorník les o 1,05 ‰. Tento rozdíl je nedostatečný pro prokázání mixotrofie, jelikož nepřesahuje běžnou chybu měření. Rozdíl je také vidět při porovnání s MX druhem *Epipactis helleborine* na lokalitě



**Tab. IV.** Druhy hub izolovaných z kořenů dospělých rostlin. <sup>a</sup> v závorce je počet studovaných rostlin na lokalitu; <sup>b</sup> v závorce je počet rostlin, ze kterých byla daná houba izolována; <sup>c</sup> A-oddělení Ascomycota, B-oddělení Basidiomycota; <sup>d</sup> předpokládaná trofická strategie, ECM-ektomykorhizní, P-parazitické nebo endofytní, S-saprophytické, R-rhizoctonie.

Lokalita	Druh orchideje <sup>a</sup>	Druh zjištěné houby <sup>b</sup>	Oddělení <sup>c</sup>	Ekologický status <sup>d</sup>
Vinice les	<i>L. ovata</i> (4)	<i>Sebacina vermifera</i> (3)	B	R
		<i>Tulasnella calospora</i> (1)	B	R
		<i>Cudoniella clavus</i> (1)	A	S
		<i>Tetracladium</i> sp. (1)	A	P
Lštění	<i>L. ovata</i> (4)	<i>Sebacina vermifera</i> (4)	B	R
		<i>Tulasnella calospora</i> (1)	B	R
		<i>Leptosphaerulina trifolii</i> (1)	A	P
Javorník louka	<i>L. ovata</i> (4)	<i>Sebacina vermifera</i> (4)	B	R
		<i>Tulasnella calospora</i> (1)	B	R
		<i>Cadophora</i> sp. (1)	A	P
Javorník les	<i>L. ovata</i> (4)	<i>Sebacina vermifera</i> (4)	B	R
		<i>Alternaria</i> sp. (1)	A	P
		<i>Pezizomycotina</i> (1)	A	P/S
		<i>Tricholomataceae</i> (1)	B	ECM
Ztracený rybník	<i>L. cordata</i> (3)	<i>Sebacina vermifera</i> (3)	B	R
		<i>Meliniomyces</i> sp. (1)	A	ECM/P
		<i>Phialophora</i> sp. (2)	A	S/P
		<i>Tylospora</i> sp. (1)	B	ECM
		<i>Cladosporium</i> sp. (1)	A	P

Nicov, u něž byl zjištěn o 1,74 ‰ vyšší obsah <sup>13</sup>C oproti okolním autotrofním rostlinám, i když i tato hodnota je pro MX rostliny velmi nízká.

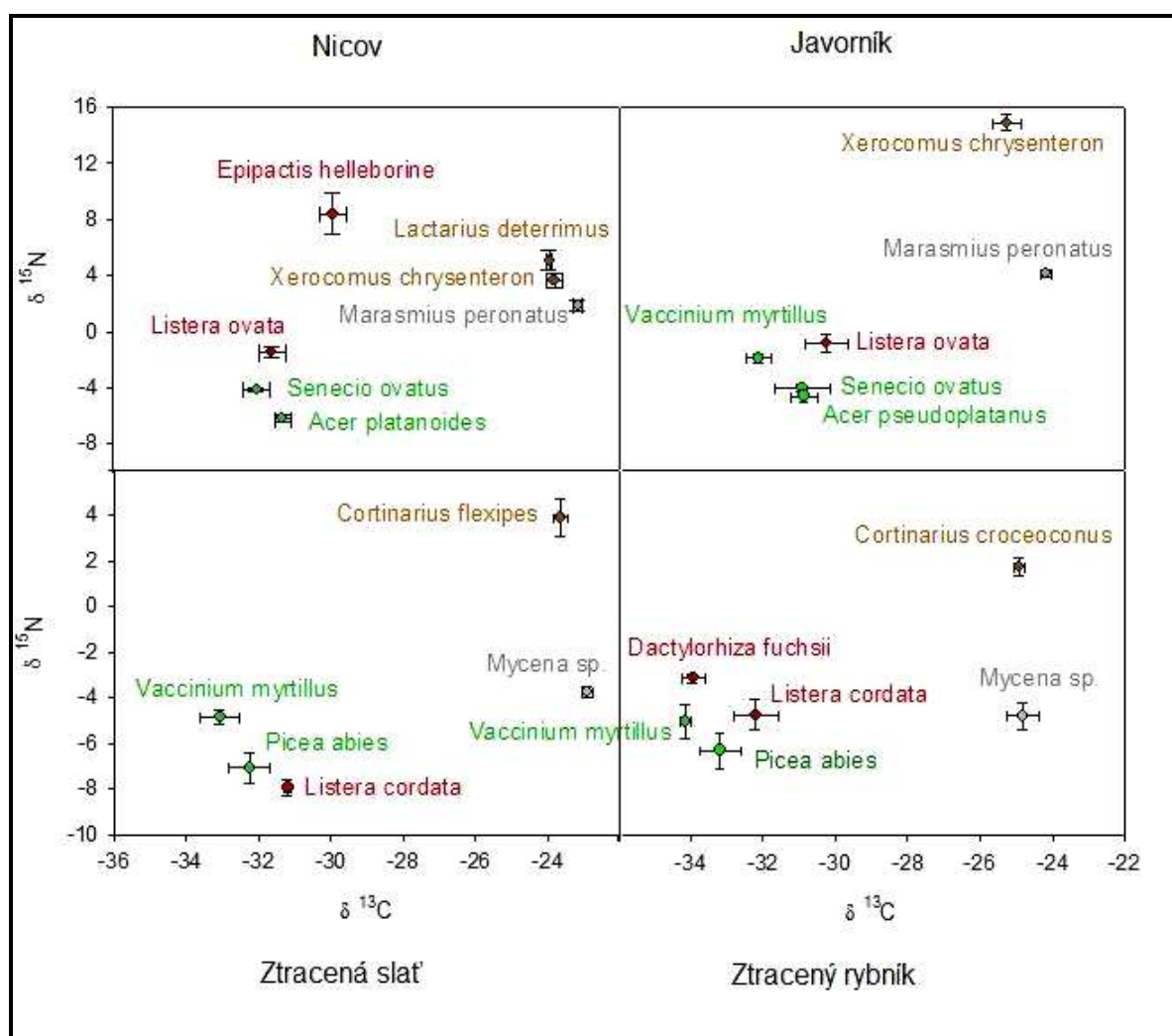
Ani u *L. cordata* nebylo zjištěno významné obohacení izotopem <sup>13</sup>C, i když rozdíly byly větší než u *L. ovata*: 1,42 ‰ na lokalitě Ztracená slat' a 1,46 ‰ na lokalitě Ztracený rybník. Zajímavý je rozdíl zjištěný mezi *L. cordata* a *Dactylorhiza fuchsii* na lokalitě Ztracený rybník, kdy obsah izotopu <sup>13</sup>C byl u *L. cordata* o 1,73 ‰ větší u *D. fuchsii*, naopak *D. fuchsii* byla oproti *L. cordata* obohacena o 1,62 ‰ v obsahu <sup>15</sup>N.

Významnější rozdíl v obsahu <sup>15</sup>N byl zjištěn pouze u druhu *L. ovata*: 3,67 ‰ na lokalitě Nicov a 2,71 ‰ na lokalitě Javorník. MX druh *E. helleborine* byl výrazně obohacený izotopem <sup>15</sup>N vůči AO rostlinám: 13,52 ‰.

Na AO výživu obou modelových druhů ukazuje i pozice vůči ECM a saprotrofním houbám. V případě mixotrofie by izotopový signál zkoumaných druhů měl být více podobný signálu ECM hub (Obr. 3).

Tab. V. Průměrný obsah stabilních izotopů  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  ve zkoumaných rostlinách.

Lokalita	Vzorek	$^{13}\text{C}$ (‰)		$^{15}\text{N}$ (‰)	
		průměr	±SD	průměr	±SD
Nicov	AO rostliny	-31,67	±0,7	-5,15	±1,2
	<i>L. ovata</i>	-31,61	±0,8	-1,47	±0,9
	<i>E. helleborine</i>	-29,93	±0,9	8,37	±3,3
Javorník	AO rostliny	-31,31	±1,2	-3,53	±1,4
	<i>L. ovata</i>	-30,25	±1,3	-0,82	±1,5
Ztracený rybník	AO rostliny	-33,66	±1,0	-5,64	±1,8
	<i>L. cordata</i>	-32,20	±1,8	-4,72	±2,0
	<i>D. fuchsii</i>	-33,93	±0,7	-3,12	±0,5
Ztracená slat'	AO rostliny	-32,62	±1,2	-6,07	±1,6
	<i>L. cordata</i>	-31,19	±0,2	-7,95	±0,8



Obr. 3. Výsledky izotopové analýzy. Zelené - autotrofní rostliny, červené – orchideje, hnědé – ECM houby, šedé – saprofytické houby.

## 7.4 Diskuse

Ze 744 zahrabaných rámečků obou druhů byly zatím vyjmuty jen 4; což nám dává jen velmi omezené informace. Jejich analýza ukázala, že semena obou skupin *L. ovata* jsou schopna klíčit na lesních i lučních lokalitách. Zároveň na lesní lokalitě klíčí semena podstatně lépe. Naopak u *L. cordata* nebylo nalezeno ani jedno klíčící semeno, což může být důsledek pomalého klíčení tohoto druhu, či nepřítomnosti vhodné houby přímo na místě, kde byly rámečky zahrabány. Vzhledem k izolaci velmi podobných druhů symbiotických hub z dospělců obou druhů by na lokalitě semena klíčit měla. Mozaikovitě klíčení je však při podobných pokusech běžné (McKendrick a kol. 2002) a je nejspíš důsledkem nerovnoměrného rozložení mykorhizních hub na stanovišti (Diez 2007). Dalším důvodem může být jiný abiotický či biotický faktor limitující rozšíření druhu *L. cordata*.

V kořenech dospělých rostlin obou druhů byla nalezena řada různých hub, ale mykorhizní asociaci se zkoumanými rostlinami vytváří pravděpodobně jen *Sebacina vermifera* a *Tulasnella calospora*; což by se dalo ověřit transmisní elektronovou mikroskopií (TEM). Ostatní druhy hub byly izolovány jen výjimečně a jedná se nejspíš o endofyty či parazity. Zajímavější je jen izolace tří druhů potencionálně tvořících ECM, což by mohlo naznačovat spojení s okolními stromy. To je však vzhledem k malému počtu izolovaných ECM druhů a výsledkům izotopové analýzy málo pravděpodobné. Pokud k zisku uhlíku od ECM partnerů dochází, tak se jedná jen o velmi malá množství.

Navzdory velmi rozdílným biotopům jednotlivých lokalit byla z drtivé většiny rostlin izolována *S. vermifera* a tvoří tak asi hlavního mykorhizního partnera obou modelových druhů. Nebyla izolována jen u jediné rostliny z lokality Vinice les; z této rostliny byla izolována *T. calospora*. Nepřítomnost *S. vermifera* v této rostlině však může být také důsledkem malé části kořenového systému použité pro analýzu hub. *T. calospora* byla izolována ještě ze dvou dalších rostlin společně se *S. vermifera*. To ukazuje, že rostliny *L. ovata* jsou v dospělosti schopny tvořit mykorhizu s několika druhy hub najednou. Izolace obou druhů hub potvrzuje předchozí výsledky izolací kultur z kořenů rostliny *L. ovata*, během nichž byly izolovány houby ze skupiny rhizoctonia (Downie 1959, Rasmussen a kol. 1991). *S. vermifera* i *T. calospora* patří mezi saprotrofické druhy ze skupiny rhizoctonia a zvláště *T. calospora* je často izolována z AO druhů orchidejí rostoucích na lučních stanovištích (např. Kristiansen a kol. 2001, Shefferson a kol. 2005). Naopak *S. vermifera* byla izolována z několika australských druhů orchidejí (Bonnardeaux a kol. 2007), a z evropských orchidejí

bývá izolována jen ojediněle (Dearnaley 2007). *L. ovata* a *L. cordata* tak svou asociací se *S. vermifera* tvoří výjimku.

U obou druhů rodu *Listera* se také nepodařilo prokázat mixotrofní způsob výživy. Selosse a Roy (2009) předpokládali MX u druhu *L. ovata* kvůli jeho blízké příbuznosti k MH druhu *Neottia nidus-avis*. *L. ovata* tak měla tvořit evoluční mezistupeň k plné MH u *N. nidus-avis*. MX se také předpokládala u druhu *L. cordata* vzhledem k jeho výskytu na silně zastíněných stanovištích, ale ani v tomto případě nebyla prokázána.

Během izotopových analýz prováděných dříve byl u *L. ovata* vypočítán různý zisk uhlíku z mykorhizní houby, a to od 20 % (Tedersoo a kol. 2007) po 27 % (Gebauer a Meyer 2003). Tato množství však nebyla považována za dostatečná k prokázání MX (Gebauer a Meyer 2003, Tedersoo a kol. 2007) a tomu odpovídají i naše výsledky. Gebauer a Meyer (2003) pokládali za prokazatelný pouze zisk 85 % u druhu *Cephalanthera domasonium* (u jiného 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*. Předpoklady Selosse a Roy (2009) se tak zdají chybné a *L. ovata* je v dospělosti autotrofní.

Rozdíl mezi MX a AO rostlinami je částečně patrný na údajích z lokality Nicov (Obr. 2), kde byl analyzován MX druh *Epipactis helleborine* a z grafu je jasně patrný rozdíl zvláště v obsahu izotopu  $^{15}\text{N}$ . Naopak zisk  $^{13}\text{C}$  zjištěný během našich měření neodpovídal ani u tohoto druhu průkazné MX, což může být způsobeno větší mírou autotrofie díky dostatku světla. Zajímavý je rozdíl v zisku  $^{13}\text{C}$  mezi *L. cordata* a *Dactylorhiza fuchsii*, přestože se oba druhy pojí se stejnou skupinou mykorhizních hub.

Pro zjištění limitace rozšíření obou zkoumaných druhů budou důležité výsledky pokusu s klíčením semen. Protože se dospělci obou druhů pojí se saprotrofickými druhy hub běžnými pro luční orchideje a nalezenými zatím na všech zkoumaných lokalitách, měla by semena obou druhů klíčit na všech lokalitách, ačkoliv není vyloučeno, že se semena budou pojít s jinými houbami, či užším spektrem hub, než bylo nalezeno u dospělců. Zároveň u obou druhů byla prokázána AO, a tak by měly být oba schopné růst na lučních i světlých lesních lokalitách. Jelikož ale *L. cordata* má velmi omezené rozšíření, přestože se pojí se všeobecně rozšířenou *Sebacina vermifera*, dá se u tohoto druhu předpokládat limitace jiným faktorem než mykorhizní houbou. V úvahu připadá např. složení půdy, půdní vlhkost, či konkurence ostatních rostlin.

## 8. Literatura

- Abadie J.-C., Püttsepp Ü., Gebauer G., Faccio A., Bonfante P. and 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.
- Alexander C. and Hadley G. 1985. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br.. *New Phytologist* 101: 657-665.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Avis P. G., McLaughlin D. J., Dentinger B. C. and Reich P. B. 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.
- Baláž M. a Kyjovská Z. 2009. Efekt simulované eutrofizace na kompetici *Serapias lingua* a *Plantago lanceolata*. Konference ČBS, Praha, 28.-29. listopadu 2009.
- Baskin C. C., Baskin J. M. 1998. Seeds ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego, USA.
- Batty A. L., Dixon K. W., Brundrett M. and Sivasithamparam 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.
- Bidartondo M. I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T. D. and Read D. J. 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.
- Bidartondo M. I. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist* 167: 335-352.
- Bidartondo M. I. and Read D. J. 2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* 17: 3707-3716.
- 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. and 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. J., Bougoure D. S., Cairney J. W. and Dearnaley J.D. 2005. ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and *Pterostylis* (Orchidaceae) in southeastern Queensland. *Mycological Research* 109: 452-460.
- Bruns T. D. 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.
- Cribb P. J., Kell S. P., Dixon K. W. and Barrett R. L. 2003. Orchid conservation: a global perspective. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Malaysia. pp 1–24.
- Cameron D. D., Leake J. R. and Read D. J. 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 D. D., Johnson I., Leake J. R. and Read D. J. 2007. Mycorrhizal acquisition of mineral phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany* 99: 831–834.
- Cameron D. D., Johnson I., Read D. J. and Leake J. R. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* 180: 176-184.
- 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 J. D. W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486.
- Diez M. J. 2007. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of ecology* 95: 159-170.
- Downie D. G. 1959. *Rhizoctonia solani* and orchid seed. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh* 37: 279.
- Dressler R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland, USA.
- Dressler R. L. 2004. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Gardes M. and Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gardes M. 2002. An orchid-fungus marriage-physical promiscuity, conflict and cheating. *New Phytologist* 154: 4-6.

- Gebauer G. and Meyer M. 2003.  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  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., Selosse M.-A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., Loreto F., Cozzolino S. and Perotto S. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorun abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* 15(2): 491-504.
- Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J. a Vosátka M. 2004. Mykorhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin, ACADEMIA, Praha, ČR.
- Hadley G., Jhnsn R. P. C. and John D. A. 1971. Fine structure of the host-fungus interface in orchid mycorrhiza. *Planta* 100: 191-199.
- Hadley G. and Purves S. 1974. Movement of  $^{14}\text{C}$  from host to fungus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 73: 475-482.
- Huynh T. T., Thomson R., McLean C. B. and Lawrie A. C. 2009. Functional and genetic diversity of mycorrhizal fungi from single plants of *Caladenia formosa* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 104: 757-765.
- Jersáková J. and Malinová T. 2007. Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176: 237-241.
- Julou T., Burghardt B., Gebauer G., Berveiller D., Damesin C. and 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.
- Kottke I., Beiter A., Weiß M., Haug I., Oberwinkler F. and Nebel M. 2003. Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatics: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. *Mycological Research* 107: 957-968.
- Kristiansen K. A., Taylor D. L., Kjoller R., Rasmussen H. N., Rosendahl S. 2001. Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. *Molecular Ecology* 10: 2089-2093.
- Látalová K. and Baláž M. 2010. Carbon nutrition of mature green orchid *Serapias strictiflora* and its mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp.. *Biologia Plantarum* 54(1): 97-104.
- Leake J. R. 1994. The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytologist* 127: 171-216.
- Leake J. R., Ostle N. J., Rangel-Castro J. I. and Johnson D. 2006. Carbon fluxes from plants through soil organisms determined by field  $^{13}\text{CO}_2$  pulse-labelling in an upland grassland. *Applied Soil Ecology* 33: 152-175.
- Mabberley D. J. 1997. The plant book. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Martos F., Dulormne M., Pailler T., Bonfante P., Faccio A., Fouvel J., Dubois M.-P. and Selosse M.-A. 2009. Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* 184: 668-681.
- McCormick M. K., Whigham D. F. and O'Neill J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163: 425-438.
- McCormick M. K., Whigham D. F., Sloan D., O'Malley K. and Hodkinson B. 2006. Orchid-fungus fidelity: A marriage meant to last? *Ecology* 87(4): 903-911.
- McCormick M. K., Whigham D. F., O'Neill J. P., Becker J. J., Werner S., Rasmussen H. N., Bruns T. D. and Taylor D. L. 2009. Abundance and distribution of *Corallorhiza odontorhiza* reflect variations in climate and ectomycorrhizae. *Ecological Monographs* 79(4): 619-635.
- McKendrick S. L. 1996. The effect of fertilizer and root competition on seedlings of *Orchis morio* and *Dactylorhiza fuchsii* in chalk and clay soil. *New Phytologist* 134: 335-342.
- McKendrick S. L., Leake J. R. and Read D. J. 2000. 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 S. L., Leake J. R., Taylor D. L. and Read D. J. 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.
- Moyersoen B. 2006. Pakaraimaea dipterocarpacea is ectomycorrhizal, indicating an ancient Gondwanaland origin for the ectomycorrhizal habit in Dipterocarpaceae. *New Phytologist* 172: 753-762.
- Nikolcheva L. G. and Bärlocher F. 2004. Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycological Progress* 3(1): 41-49.
- O'Donnell K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds D. R., Taylor J. W. and eds. *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CAB International, Wallingford, USA. pp 225-233
- Ogura-Tsujita Y., Gebauer G., Hashimoto T. Umata H. and 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 J. P., Whigham D. F. and McCormick M. K. 2007. Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid *Dactylorhiza lapponica* (Orchidaceae). *Annals Botanici Fennici* 45: 161-172.
- Peškan-Berghöfer T., Shahollari B., Giong P. H., Hehl S., Markert C., Blanke V., Kost G., Varma A. and 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.



- Ponert J. a Lipavská H. 2009. Role sacharidů v orchideoidních mykorrhizách. Konference ČBS, Praha, 28.-29. listopadu 2009.
- Procházka F. 1980. Naše orchideje. Krajské muzeum východních Čech, Pardubice, ČR.
- Ramírez S. R., Gravendeel B., Singer R. B., Marchall A. R. and Pierce N. E. 2007. Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature* 448: 1042-1045.
- Rasmussen H. N., Johansen B. and Andersen T. F. 1991. Symbiotic *in vitro* culture of immature embryos and seeds from *Listera ovata*. *Lindleyana* 6: 134-139.
- Rasmussen H. N. and Whigham D.F. 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 H. N. 1995. *Terrestrial Orchid: From seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rasmussen H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149-163.
- Rasmussen H. N. and Whigham D. F. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist* 154: 797-807.
- Rasmussen H. N. and Rasmussen F. N. 2009. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118: 334-345.
- Selosse M.-A., Weiß M., Jany J. L. and 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. and 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., Franck R., Xianhua He and Simard S. W. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology and Evolution* vol.21 No.11: 621-628.
- Selosse M.-A., Setaro S., Glatard F., Richard F., Urcelay C. and Weiss M. 2007. Sebaciales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174(4): 864-878.
- Selosse M.-A. and Roy M. 2009. Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in plant science* 14(2): 64-70.
- Setaro S., Weiss M., Oberwinkler F. and Kottke I. 2006. Sebaciales form ectendomycorrhizas with *Cavendishia nobilis*, a member of the Andean clade of Ericaceae, in the mountain rain forest of southern Ecuador. *New Phytologist* 169: 355-365.
- Shefferson R. P., Weiß M., Kull T. and Taylor D. L. 2005. High specificity generally characterises mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. *Molecular Ecology* 14: 613-626.

Smith S. E. and Read D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, third edition. Academic Press, New York, USA.

Swartz N. D. and Dixon K. W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* 104: 543-556.

Taylor D. L., Bruns T. D., Szaro T. S. and Hodges S.A. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a non-photosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany* 90: 1168-1179.

Taylor D. L. and McCormick M. K. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 117(4): 1020-1033.

Tedersoo L., Suvi T., Larsson E. and 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. and Selosse M.-A. 2007. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understory Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* 151: 206-217.

Urban A., Weiß M. and Bauer R. 2003. Ectomycorrhizae involving sebacinoid mycobionts. *Mycological Research* 107: 3-14.

Wang B. and Qui Y.-L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.

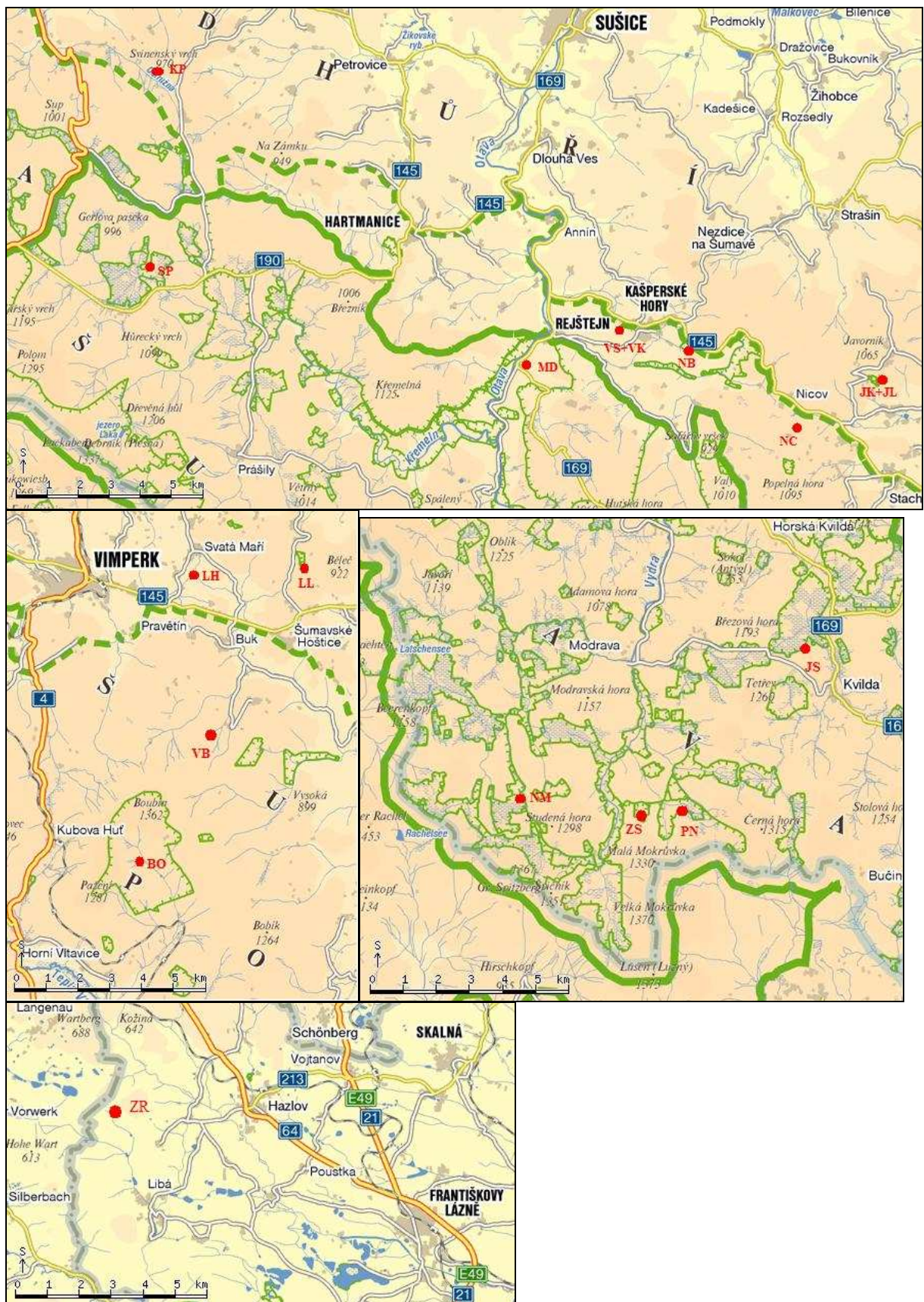
Weiss M., Selosse M.-A., Rexer K.-H., Urban A. and Oberwinkler F. 2004. Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research* 108 (9): 1003-1009.

Whigham D. F., O'Neill J. P., Rasmussen H. N., Caldwell B. A. and McCormick M. K. 2006. Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent in situ seed banks. *Biological Conservation* 129: 24-30.

White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, USA. pp 315–322.

# Přílohy

Rozmístění lokalit (Zdroj map www.mapy.cz)



## Seznam lokalit

### *Listera 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'

### *Listera 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

### *Listera 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'