

# Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



Přírodovědecká fakulta

*Magisterská práce*

## **Mykorhizní asociace orchideje *Corallorhiza trifida* na dvou různých typech stanovišť.**

**Bc. Gabriela Říhová**

**Školitelka: RNDr. Jana Jersáková, Ph.D.**

**České Budějovice, 2010.**

**Říhová G. (2010):** Mykorhizní asociace orchideje *Corallorhiza trifida* rostoucí na dvou různých typech stanovišť.

[Mycorrhizal association of *Corallorhiza trifida* growing in two different habitats. Mgr. Thesis, in Czech]. – magisterská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Česká republika, 46 p.+ přílohy 8 p.

### **Annotation**

The aim of this thesis was to detect whether achlophyllous orchid *Corallorhiza trifida* associates different fungal taxa in different habitats. Our analyses were conducted using molecular and phylogenetic methods based on DNA sequencing.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů 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 Přírodovědeckou fakultou v elektronické podobě ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2010

## **Poděkování**

Můj velký vděk patří všem, kteří se podíleli na vytvoření této práce. Nechci na někoho zapomenout, proto nebudu nikoho konkrétně jmenovat. Prostě vám všem moc děkuji, byli jste skvělí!

Tento projekt byl financován z grantu AV ČR č. IAA 600870802 RNDr. Jany Jersákové, Ph.D.

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Společní myceliální síť.....	2
1.2. Mykoheterotrofie.....	3
1.3. Orchideoidní symbioza.....	5
1.4. Regulace růstu hub hostitelskou rostlinou.....	7
1.5. Houby tvořící orchideoidní mykorhizní symbiózu.....	7
1.6. Specifita orchideoidní mykorhizní symbiózy.....	8
1.7. Ekologie mykorhizní symbiózy.....	9
1.8. <i>Corallorhiza trifida</i> .....	10
1.9. Thelephoraceae.....	11
1.10. Cíle práce.....	12
<b>2. Metodika</b> .....	<b>13</b>
2.1. Odběr vzorků.....	13
2.2. Molekulární analýzy.....	15
2.2.1. Izolace DNA z kořenů a nadzemních částí.....	15
2.2.2. Identifikace houbových symbiontů.....	15
2.2.3. Identifikace genotypů druhu <i>C. trifida</i> .....	16
2.3. Fylogenetické analýzy.....	17
2.3.1. Analýza houbových symbiontů.....	17
2.3.2. Analýza genotypové variability <i>C. trifida</i> .....	19
2.4. Ekologické preference <i>C. trifida</i> .....	19
2.5. Půdní analýzy.....	20
<b>3. Výsledky</b> .....	<b>21</b>
3.1. Molekulární analýzy a fylogenetické analýzy.....	21
3.1.1. Identifikace mykorhizních hub z druhu <i>C. trifida</i> .....	21
3.1.2. Analýza vlastních sekvencí hub z kořenů druhu <i>C. trifida</i> - alignment 1.....	22
3.1.3. Výsledky fylogenetických analýz.....	22
3.1.4. Porovnání jednotlivých metod sestavování fylogenetických stromů.....	24
3.1.5. Dobře podpořené skupiny z alignmentu 1.....	24
3.1.6. Analýza vlastních sekvencí hub společně se staženými sekvencemi z GeneBank- alignment 2.....	25
3.1.7. Výsledky fylogenetických analýz-alignment 2.....	25
3.1.8. Dobře podpořené skupiny z alignmentu 2.....	25
3.2. Analýza genotypové variability druhu <i>C. trifida</i> pomocí ISSR.....	29
3.3. Ekologické preference druhu <i>C. trifida</i> .....	31
3.4. Půdní analýzy.....	33
<b>4. Diskuze</b> .....	<b>34</b>
4.1. Limitace rozšíření mykoheterotrofních rostlin – abiotické vs. biotické faktory.....	34
4.2. Specifita houbových partnerů rodu <i>Corallorhiza</i> .....	34
4.3. Mykorhizní asociace <i>C. trifida</i> ve dvou kontrastních typech biotopů.....	35
4.4. Genotypová variabilita <i>C. trifida</i> .....	36
4.5. Ekologické preference druhu <i>C. trifida</i> .....	37
<b>5. Závěr</b> .....	<b>39</b>
<b>6. Seznam použité literatury</b> .....	<b>40</b>

# 1. Úvod

Mykorhizní symbióza je vzájemně výhodná asociace mezi kořeny vyšších rostlin a hub, která vznikla pravděpodobně v období ordoviku přibližně před 460 milióny let (Redecker *et al.*, 2000). Tento druh mutualismu bývá označován jako vzájemně vyvážený parazitismus založený na výměně látek (Bidartondo *et al.*, 2005). Mykorhizní symbióza je charakterizována tvorbou unikátních houbových struktur v buňkách a mezi rostlinnými buňkami. Co se týče výměny látek, tak houba obvykle poskytuje rostlině vodu, dusík, fosfor a minerální látky a rostlina dává houbě fotosyntetické asimiláty a růstové látky. Tento typ vztahu je obecně rozšířený a jen několik rostlinných čeledí vyšších rostlin má tvorbu mykorhiz značně omezenou nebo jsou zcela nemykorhizní (Brundrett, 2009). Jedná se například o čeledi brukvovité (Brassicaceae), sítinovité (Juncaceae), šáchorovité (Cyperaceae), okřehkovité (Lemnaceae), hvozdíkovité (Caryophyllaceae) a merlíkovité (Chenopodiaceae).

Mezi houby žijící v mykorhizní symbióze patří různé druhy hub z oddělení Glomeromycota, Ascomycota a Basidiomycota, jejichž plodnice jsou jak viditelné pouhým okem, tak i mnohem méně nápadné skrývající se v půdě. Tento vztah považovaný za mutualismus je tak těsný, že většina mykorhizních hub, zvláště pak oddělení Glomeromycota by bez své hostitelské rostliny pravděpodobně vyhynula. Totéž platí pro mnoho hostitelských rostlin, které by se také neobešly bez mykorhizních hub.

Typy mykorhizních symbióz se dělí na endomykorhizu a ektomykorhizu. Endomykorhiza se vyznačuje pronikáním mycelia mykorhizní houby do vnitřního prostoru buněk hostitelova kořene. Za endomykorhizu je považována arbuskulární, erikoidní a orchideoidní mykorhizní symbióza. Ektomykorhiza je charakteristická tím, že se mykorhizní houba nachází pouze v intercelulárním prostoru a vyskytuje se téměř výlučně u dřevin. Přečodnou formou mezi ektomykorhizou a endomykorhizou je ektendomykorhiza, pro kterou je charakteristické to, že se při normální ektomykorhize dostávají hyfy také dovnitř buněk kořenové pokožky či kůry. Ektendomykorhiza se vyskytuje u některých dřevin a u arbutoidní a monotropoidní mykorhizní symbiózy (Gryndler, 2004).

Mycelium mykorhizní houby nezasahuje do celého kořene, ale orientuje se jen na některá pletiva, a to na kořenovou pokožku (rhizodermis) a na kořenovou (primární) kůru, což je zpravidla několik dalších vrstev buněk pod kořenovou pokožkou. Mycelium mykorhizních hub nikdy neproniká do kořenového středního válce, který obsahuje cévní svazky. Mykorhizní symbióza je typická pro cévnaté rostliny, které mají dobře vyvinuté kořeny, ale byly zaznamenány mykorhizy i u rhizoidů bezcévných rostlin.

Mykorhizní houby se nevyskytují v půdě náhodně, ale jejich výskyt závisí na tom, jaké půdní

horizonty osidlují (Dickie *et al.*, 2002). Mykorhizní houby se obecně nejvíce vyskytují na povrchu půdy (Gryndler, 2004).

Očekávalo by se, že v jednom rostlinném druhu bude jeden typ mykorhizy, ale nemusí tomu tak být vždy; u druhů *Quercus agrifolia* (Egerton-Warburton a Allen, 2001) a *Helianthemum nummularium* (Read *et al.*, 1977) byly zjištěny dva různé typy mykorhizní symbiózy, a to arbuskulární mykorhiza a ektomykorhiza. U topolu *Populus tremuloides* bylo pozorováno na jednom kořenovém systému, že houby tvoří dva různé typy mykorhiz tvořenými různými druhy hub, jejichž distribuce se liší v závislosti na hloubce půdy (Neville *et al.*, 2002).

Pokud se podíváme, jaké typy mykorhiz tvoří jednotlivé skupiny rostlin, tak krytosemenné rostliny se účastní všech typů mykorhizních symbióz. Nahosemenné rostliny tvoří ektomykorhizy a ektendomykorhizy, méně často arbuskulární mykorhizy, které se dají nalézt např. u tisu červeného (*Taxus baccata*). Arbuskulární mykorhizní symbióza je typická pro cykasy (Cycadaceae) a pro rostliny z čeledi blahočetovité (Araucariaceae). Kaprad'orosty, které mají vyvinutá vodivá pletiva, tvoří ve velké většině arbuskulární mykorhizy (Read, 2000). Nacházíme je jak u sporofytů, tak i u prvoklíčků (Harley a Harley, 1987). Velmi často mykorhizní jsou také zástupci čeledi plavuňovitých (Lycopodiaceae) a jazykovitých (Ophioglossaceae). Kromě arbuskulární mykorhizy byla zřídka zaznamenána i ektomykorhizní symbióza například u *Dryopteris filix-mas* (kaprad' samec). Mechorosty, pokud tvoří mykorhizní symbiózu, tak vesikulo-arbuskulární (Smith a Read, 2008)

## 1.1. Společná myceliální síť

Ve většině rostlinných společenstev dominují mykorhizní rostliny. To se týká především savan, luk, boreálních, temperátních a tropických lesů. Většina mykorhizních hub není specifická a tedy jeden druh houby dokáže kolonizovat více rostlin najednou. Vytváří se tedy jakási společná myceliální síť propojující jednotlivé rostliny téměř nezávisle na jejich druhu. V neporušených ekosystémech získávají rostliny více než 80% dusíku a více než 90% fosforu od mykorhizních hub (van der Heijden *et al.*, 2009). Kromě získávání limitujících látek poskytuje mykorhizní síť rostlinám i další výhody. Jde především o zvýšenou odolnost vůči stresu, suchu a patogenům. Mezi hlavní funkce myceliálních sítí patří příjem živin a prevence jejich vymývání, podpora klíčení semen, recyklace živin a usnadňování disperze bakterií (van der Heijden *et al.*, 2009). Mykorhizní asociace se osvědčují především na stanovištích chudých na živiny, kde pozitivně stimulují růst rostlin. V místech chudých na živiny je mykorhizní houba schopna transportovat uhlík získaný od jedné hostitelské rostliny k rostlině druhé (Smith a Read, 2008). Tento fakt je však nutné brát s rezervou. Při vysoce úživné půdě nemá přítomnost mykorhizních hub buď žádný efekt nebo lehce negativně ovlivňuje růst rostlin z důvodu odebírání části jejich asimilátů houbou. Dalšími funkcemi

myceliální sítě jsou obohacování půdního prostředí organickými látkami získanými při fotosyntéze (Wu *et al.*, 2002) či stabilizace půdních agregátů.

Mimokořenové mycelium hraje velmi důležitou roli při přijímání živin rostlinou, při rozšiřování se na místa bohatá na živiny a pravděpodobně i při kompetici s ostatními půdními mikroorganismy. U všech hub je známo, že přijímají anorganické látky, nicméně bylo zjištěno, že houby tvořící ektomykorhizu a erikoidní mykorhizní symbiózu mohou přijímat i organický dusík a fosfor, a tím významně přispívat k zásobování rostliny dusíkem a k jeho koloběhu v ekosystému.

## 1.2. Mykoheterotrofie

Rostliny jsou běžně autotrofní organismy, které získávají své živiny výhradně z abiotického prostředí. Mezi výjimky patří poloparazité, kteří sice asimilují, ale berou si část asimilátů z jiných rostlin. Některé rostliny jsou také schopné část své potřeby organického uhlíku pokrýt díky asociaci s mykorhizní houbou a část získat fotosyntézou. Takové rostliny jsou nazývány mixotrofní.

Mezi mixotrofní druhy se řadí mnozí zástupci z tribu Neottieae, například rod *Cephalanthera* či *Epipactis* (Selosse *et al.*, 2004).

Někdy ale rostlina získává organické látky pouze pomocí mykorhizní houby a sama vůbec není schopná fotosyntézy. V počáteční fázi klíčení semen či spor se úplná závislost na příjmu uhlíku od mykorhizních hub týká asi 30000 druhů rostlin, což představuje asi 10% druhů celé rostlinné říše (zejména čeledi Orchidaceae, Monotropaceae) (Leake, 2005). Tento jev se pravděpodobně vyvinul během evoluce mnohokrát nezávisle na sobě (Leake, 1994).

Ve studii (Gebauer a Meyer, 2003) bylo zjištěno, že více než 80 % uhlíku poskytnutého některým mixotrofním orchidejím pocházelo od houby. U těchto rostlin je také známo, že jejich houby tvoří ektomykorhizu s okolními stromy, které jim slouží jako zdroj uhlíku, žijí tedy v trojstranné symbióze (Selosse *et al.*, 2004, Julou *et al.*, 2005). Jde především o několik druhů lesních orchidejí, které rostou na stinných místech. Během evoluce došlo k přechodu na mixotrofii u několika lesních rostlin, které žily v podrostu a sdílely houbu se stromy ze dvou důvodů; aby vyvážily málo světla a zapříčinily vznik mykoheterotrofních rostlin (Bidartondo *et al.*, 2004, Selosse *et al.*, 2004).

Některé rostliny však zůstanou závislé na organickém uhlíku přijímaném od houby po celý život. Tato úplná celoživotní závislost rostliny se týká více než 400 druhů cévnatých rostlin taxonomicky zařazených do 87 rodů. Rostliny, které jsou takto závislé, jsou souhrnně nazvány jako mykoheterotrofní (dále jen MH rostliny). MH rostliny se mohou pojít s ektomykorhizními, arbuskulárními, saprofytickými i parazitickými houbami (Leake, 2005). Obvykle přijímají organický uhlík ve formě trehalózy (Gryndler, 2004). Dříve se předpokládalo, že tyto rostliny

přijímají organické látky přímo z organické hmoty, a tudíž byly mylně považovány za saprotrofní, tento fakt byl však vyvrácen (Leake, 2005). Mezi nejvýznamnější čeledi MH rostlin patří čeledi Pyrolaceae, Monotropaceae, Burmanniaceae, Polygalaceae, Petrosaviaceae, Triuridaceae a Orchidaceae. Zástupci MH rostlin, které se řadí do čeledi Orchidaceae, se nejčastěji řadí do podčeledí Epidendroideae, Orchidoideae a Vanilloideae.

MH rostliny stojí na jednom extrému specifity ke svým mykorhizním houbám. Jsou pravděpodobně jediné, které jsou považovány za úplně parazitické rostliny v mutualisticko-parazitickém kontinuu, kdy se jako jediné plně spoléhají na uhlík získaný od mykorhizní houby. Jsou tudíž považovány za přímé parazity hub. O tom co houby stojí, aby se asociovaly s mykohetrotrofní rostlinou není nic známo. Pro houbu z tohoto vztahu neplyne žádná výhoda. Možné vysvětlení proč houba v tomto parazitickém vztahu přetrvává je, že buď nenašla mechanismy obrany proti parazitismu rostliny, nebo jí to nevadí, protože při jejich efektivitě získávání organického uhlíku jej má v přebytku se dostane dost i na mykohetrotrofy (Smith a Read, 2008). Jejich úzkou specifitu lze dokázat například na studii provedené na dvou různých druzích rostlin, které rostou na stejném stanovišti, ale každý z druhů rostlin se asociuje s jiným rodem houby a vzájemně nedochází k překryvu těchto mykorhizních preferencí (Bidartondo a Bruns, 2001).

Protože MH rostliny mají omezenou možnost výběru vhodného mykobionta díky své vysoké specifitě, která zřejmě souvisí s lepším přenosem živin, jsou semena produkována ve velkých množstvích a mají prodlouženou dormanci, což jim umožňuje prostorové a časové hledání partnera. Semena MH rostlin mají velmi málo zásobních látek, tudíž je jejich přežití a vyklíčení závislé na přítomnosti mykorhizní houby. Nejmenší zaznamenané semeno v rostlinné říši bylo popsáno u mykotrofního druhu *Voyria tenella*, jejíž semeno se stává jen ze tří buněk a má průměr 50 $\mu$ m (Maas, 1986).

Všichni zástupci čeledi Orchidaceae (přibližně 25000 druhů) jsou v ranných stádiích svého vývoje obligátními parazity hub. Jde o jednostranný vztah s výhodou pro rostlinu. I když většina z nich si v dospělosti vybuduje fotosyntetický aparát, část z nich v parazitickém vztahu zůstane a nemají chlorofyl.

U mykohetrotrofních rostlin došlo během evoluce k mnoha morfologickým modifikacím (Leake, 1994). Míra modifikace nadzemních částí souvisí s mírou mykoheterotrofie. Došlo k modifikaci stonku, zredukovaly se listy, aby uhlík investován do produkce semen a ne do tvorby listů. Typické mykoheterotrofní rostliny jsou byliny a obsahují malé množství floémových a xylémových cévek. Z dřevnatělé tkáně chybí. V některých případech, například u orchidejí, jsou rozvinuty dužnaté a křehké tkáně například u *Rhizantella gardneri* nebo u *Epipogium aphyllum*. Pro mykohetrotrofní rostliny obecně platí, že buňky stonku obvykle obsahují tenkostěnný parenchym bez škrobu a pár



ztlustlých zpevňujících tkání. Střední válec u stonků je redukován na malý počet cévních svazků (6-8), dochází k redukci průměru stonku. Většina mykoheterotrofních rostlin má velmi tenký nit'ovitý stonek, který je nejvíce patrný u Gentianales a vyskytuje se také u některých rodů v čeledi Orchidaceae (*Corallorhiza*, *Epipogium*). Naopak, čeleď Monotropaceae tvoří silné stonky mající průměr i přes 1cm. Listy mohou být stálozelené a kožovité u Ericaceae, až po hnědavé šupiny nacházející se např. u některých druhů rodu *Sarcodes* či *Pterospora*. Průduchy se u mykoheterotrofních rostlin nacházejí buď ve velmi malém počtu či úplně chybí. Absence průduchů je výhodná, protože se ztrácí méně vody z rostliny. Ztráta fotosyntetického aparátu pro MH rostliny znamená omezený evoluční potenciál (Rasmussen a Rasmussen, 2009).

Některé mykoheterotrofní rostliny se účastní trojstranné symbiózy, při které mimokořenové mycelium spojuje mykoheterotrofní rostlinu a ektomykorhizní strom jako svého sekundárního hostitele. Tyto rostliny tak obvykle rostou na velmi zastíněných místech, kde není dostatečná intenzita světla pro fotosyntézu, což bývá často v lesním podrostu v zapojených biotopech. Ektomykorhizní strom žije s houbou v mutualistickém soužití, kdy jí poskytuje živiny a ta předává jejich část mykoheterotrofní rostlině. Pro houbu plyne z tohoto svazku to, že ze stromu získává, zatímco ze svazku s heterotrofem tratí. Důvody proč se houba účastní trojstranné symbiózy jsou nejasné. Trojstranná symbióza byla zjištěna například u mykoheterotrofní játrovky *Cryptothallus mirabilis*, která se přes mykorhizní houby asociuje s *Betula pendula* (Read *et al.*, 2000) anebo u *Sarcodes sanguinea*, která se přes *Rhizopogon ellenae* pojí s *Abies magnifica* (Bidartondo a Bruns, 2005). MH rostliny vykazují v některých případech specifitu i vůči svým sekundárním autotrofní hostitelům (McKendrick *et al.*, 2000). Ve vztahu rostliny a houby je to parazitismus, který vykazuje specifitu. To je možné dokázat například na patogenech nadzemních částí rostlin, kde byla opakovaně pozorována úzká genetická kontrola specificity (Smith a Read 2008). Vysoká specifita se vyvinula během dynamického evolučního procesu, ve kterém si rostlina vyvine odolnost vůči parazitu, zatímco houba se snaží tuto odolnost překonat. Takto dochází k extrémní specifitě často na úrovni druhu parazita a rostliny. O genetice interakcí mezi MH rostlinou a parazitovanou houbou není dosud nic známo.

### 1.3. Orchideoidní symbioza

Orchideoidní mykorhiza je typická jen pro členy čeledi Orchidaceae a je spolu s nimi rozšířena po celém světě. Zástupci čeledi Orchidaceae rostou jak na stanovištích extrémně chudých na živiny, tak i na živných humózních půdách. Jde tedy o velmi mnohotvárný typ symbiózy. Rostliny pojící se s mykorhizními houbami jsou na nich závislé pouze při klíčení, avšak houby asociované s orchidemi jsou schopny existovat bez nich (Rasmussen a Rasmussen, 2009). V rámci čeledi

vstavačovitých existuje široké rozmezí závislosti orchidejí na mykorrhizních houbách od plně autotrofních druhů, přes druhy mixotrofní až po druhy, které nejsou schopny fotosyntetizovat. V početné čeledi Orchidaceae je jen asi 170 druhů nezelených rostlin (Leake, 1994). Semena orchidejí jsou velmi malá, jedno semeno nepatrných rozměrů v řádech mikrometrů váží několik tisíc miligramů, které obsahuje 4 až 200 buněk (McKendrick *et al.*, 2000). Semena jsou produkována ve velmi velkých množstvích čítajících několik desítek tisíc pro střeoevropské orchideje. Mají malé nediferencované embyro a minimální objem zásobních látek. Díky této strategii se snaží maximalizovat plodnost a efektivitu roznosu větrem a zároveň omezit co nejvíce investic do nich.

Typické struktury tvořící orchideoidní mykorrhizní symbiózu jsou třírozměrné struktury zvané pelotony, což jsou hyfové smotky, které se vyvíjejí v buňkách parenchymu v těsném propojení s vchlípenou buněčnou plazmalemou. Houby kolonizující buňky kořenové kůry nejsou nikdy v přímém kontaktu s rostlinnou cytoplazmou, ale jsou obklopeny vchlípenou cytoplazmatickou membránou hostitelských buněk nazývanou perifungální membrána (Peterson *et al.*, 1998). Mezi buněčnou stěnou houby tvořící peloton a perifungální membránou se nachází prostor, který hraje důležitou roli v přenosech látek mezi hostitelem a houbou. Všechny látky, které mají být transportovány z hostitelských buněk či naopak, musí být transportovány přes tento mezilehlý prostor. V něm byly nalezeny produkty hostitelské buňky, například pektiny, celulóza či  $\beta$ -1,3-glukany (Nieuwdorp, 1972). Tyto látky jsou ve větším množství nalézány až po zahájení procesu degenerace smotku.

Mykorrhizní infekce trvá od dvou dnů až po jeden měsíc (Burgess, 1939 *in* Gryndler, 2004). Buňky hostitelské rostliny jsou kolonizovány i vícekrát. Nový smotek je vytvářen rychlým prorůstáním hyf chráněných před lyzí fenolickými látkami, které jsou obsaženy v jejich buněčné stěně. Tyto hyfy se dostanou do hostitelské buňky současně s prvním pelotonem. Je možná až trojitá rekolonizace hostitelských buněk, takže je možné nalézt v jedné buňce až čtyři generace smotků (Senthilkumar a Krishnamurthy 1998). Korové buňky hostitele obsahující pelotony i buňky s nimi sousedící mají zvětšená jádra s dvou- až čtyřnásobným obsahem DNA a větší počet jadérek (Hadley a Williamson 1972).

K průniku hyf do pletiv kořene dochází přímo z půdního prostředí. Do protokormů se dostává mykorrhizní infekce přes buňky suspensoru na bazální části klíčícího semene nebo přes vlášení pokožky. Ještě před infikováním houbou se v buňkách suspensoru tvoří inhibiční fenolické látky a slouží k potlačení tvorby pelotonů v této oblasti (Rasmussen, 1990). Dospělé rostliny jsou kolonizovány přes kořenovou pokožku včetně kořenových vlásků, kde je kutikula slabá nebo chybí. Mnoho orchideoidních endofytů produkuje degradativní enzymy sloužící k rozpuštění buněčné stěny rostliny (Rasmussen, 1995).

Houba nikdy nezasahuje do středního válce a šíří se pouze parenchymatickými buňkami kořenové

kůry, které se mohou funkčně, tvarově a anatomicky lišit. Nejbliže k povrchu se nacházejí vrstvy průchozích buněk, které tvoří pelotony. Hyfy prorůstají přímo z jedné buňky do druhé přes plazmodezmy. Blíže ke střednímu válci nacházíme buňky hostitelské a stravovací. Ve stravovacích buňkách dochází k opětovné kolonizaci a tvorbě pelotonů. Posledním typem buněk primární kůry jsou buňky zásobní, kam nepronikají hyfy hub. Nachází se zde škrobová zrna. V endodermis kolonizace nikdy neprobíhá (Gryndler, 2004).

Na základě způsobu stravování hyf byly popsány dvě různé formy orchideoidní mykorrhizy a to tolypofágní a ptyofágní (Smith a Read 2008). Tolypofágní forma je převládající forma orchideoidní mykorrhizy, která dá se nalézt jak u protokormů, tak i u dospělých orchidejí. Při stravování je výsledkem lýze smotku jeden větší shluk amorfního houbového materiálu. Ptyofágní forma je méně častá a známá jen u několika druhů nezelených tropických orchidejí. Hlavní rozdíl od tolypofágní formy je ten, že je méně hustá a že lýzi podléhají jen jednotlivé hyfy a výsledkem lýze jednotlivých hyf jsou izolované, menší shluky měchýřků.

Jsou možné tři způsoby přenosu uhlíku z houby do rostliny; biotrofní přenos přes rozhraní hostitelské buňky a aktivního hyfového smotku; nekrotrofní výživa, spočívající v sorpci živin uvolněných z hyfových smotků po jejich aktivním usmrcení hostitelskou buňkou a třetím typem přenosu je přímá sorpce živin uvolněných rozkladem z půdy. Jako nejvíce pravděpodobný způsob přenosu se ukázala výživa nekrotrofní (Taylor *et al.*, 2004)

#### **1.4. Regulace růstu hub hostitelskou rostlinou**

Orchideje jsou schopny různými způsoby omezovat až eliminovat růst houby ve svých pletivech. U terestrických orchidejí jsou kořeny a výběžky dělených hlíz pravidelně kolonizovány kořeny, zatímco nedělené kořenové hlízy a báze dělených kořenových hlíz kolonizovány nejsou. Jedním ze způsobů je mechanická rezistence, která spočívá v tloušťce buněčných stěn rhizodermálních buněk a zevních vrstev korových buněk kořene (Burges, 1939 in Gryndler, 2004). Mnohem častěji se rostliny však brání chemicky. Jde například o fytoalexiny nebo o termolabilní fungicidní látky orchinol, hircinol či gastrodianiny (Wang *et al.*, 2001), které se nacházejí jak v hlízách, tak v nadzemních částech rostlin.

#### **1.5. Houby tvořící orchideoidní mykorrhizní symbiozu**

Převážnou většinu hub tvořících OrM můžeme rozdělit do dvou skupin podle jejich trofických strategií, a to (i) saprofytické a (ii) ektomykorrhizní houby (Smith a Read 2008). Do první skupiny

řadíme zástupce uměle vytvořené polyfyletické skupiny rhizoctonia z oddělení Basidiomycota. Tyto houby se typicky pojí se zástupci lučních orchidejí, které jsou v dospělosti plně autotrofní, ale i se zástupci některých tropických nezelených MH orchidejí (Martos *et al.*, 2009, Ogura-Tsujita *et al.*, 2009). Jejich mycelium je typické svými moniliodními buňkami a tvoří jak perfektní, tak imperfektní stádia, která nesou různé názvy (Gryndler, 2004). Zástupce skupiny rhizoctonia v současnosti dělíme do tří vzájemně nepřibuzných linií a to Ceratobasidiales (Taylor *et al.*, 2003), Sebaciniales (Weiss *et al.*, 2004) a Tulesnellales (Bidartondo *et al.*, 2003). Charakteristickým znakem saprotrofních orchideoidních mykorhizních hub je jejich výrazná enzymová aktivita, hlavně celulolytická, pektinolytická či fenoloxidázová (Marchisio *et al.*, 1985). Tyto aktivity ukazují na schopnost využívat jako zdroje uhlíku a energie široké spektrum organických látek.

Druhou skupinu mykorhizních partnerů orchidejí tvoří ektomykorhizní basidiomycety, a vzácně i askomycety (např. Selosse *et al.*, 2004; Bidartondo *et al.*, 2004). Tyto houby nalézáme u většiny MH a mixotrofních orchidejí v temperátu a u některých nezelených tropických orchidejí (Roy *et al.*, 2009). Tyto houby umožňují existenci tzv. epiparasitismu. Mezi hlavní čeledě hub pojících se s orchidejemi patří například holubinkovité (Russulaceae), plesňákovité (Thelephoraceae) či lanýžovité (Tuberaceae).

Je známo, že většina mykohetrotrofních orchidejí se pojí s ektomykorhizními houbami, saprotrofními druhy žijícími na dřevě, trusu či listovém opadu, ale i také s patogeny rostlin. Typickým příkladem je *Gastrodia elata*, významná v čínské medicíně, která se asociuje se saprotrofní a patogenní houbou *Armillaria mellea* (Xu *et al.* 1989).

## 1.6. Ekologie orchideoidní mykorhizní symbiozy

V rámci vztahu orchideje a houby existuje jistá forma trade-off mezi délkou života koho? a vitalitou mykobionta. Dlouhověké druhy orchidejí se pojí s ekologicky dominantními druhy hub vedoucí sice k vysoké mortalitě semen, ale zajišťující dlouhodobé přežití dospělců. Naopak krátce žijící druhy orchidejí se pojí s méně agresivními druhy hub a tím zajišťují lepší přežití semenáčků, ale horší podmínky pro přežití dospělců. Abundance vhodných houbových partnerů má za následek velice nerovnoměrné rozmístění orchidejí (Diez, 2007). Abiotické (srážky a teplota) (McCormick, 2009) a biotické co (přítomnost dospělých rostlin stejného druhu) silně ovlivňují přítomnost orchideoidních hub na lokalitě a tím pádem klíčení a růst orchidejí (Jersáková a Malinová, 2007). Vybírání vhodného partnera probíhá za pomoci chemických signálů. Signální molekuly jsou produkovány vhodným houbovým symbiontem, který stimuluje růst a klíčení MH rostlin (Smith a Read, 2008). Nevhodné mykorhizní houby tyto signální molekuly neprodukují buď vůbec anebo v tak malých množstvích, že nevyvolají žádnou reakci na semeno. Nan (1997) zjistil, že látky

koniferin a koniferyl alkohol hrají roli při prvotních interakcích semene s myceliem houby.

Orchideje dokážou být velice specializované při výběru svého partnera, ale dokážou se pojit i se širokou škálou hub patřících do několika různých rodů. Mezi tyto nevyhraněné zástupce patří například *Tipularia discolor* či *Piperia yadonii* (McCormick *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007). Orchideje dokážou diskriminovat velmi jemně za použití neznámých mechanismů hyfy v jejich blízkosti nejen při prvním kontaktu, ale průběžně (Rasmussen a Rasmussen, 2009).

## 1.7. Specifita orchideoidní mykorhizní symbiozy

Pojem specifita postihuje míru důslednosti, s jakou se oba partneři v mykorhizní symbióze vybírají a zda-li je jeden hostitel schopen ve svých kořenech hostit jednu či více mykorhizních hub a naopak, zdali je jedna houba schopna kolonizovat kořeny jednoho či více druhů hostitelských rostlin. Dříve byla orchideoidní mykorhizní symbióza považována za velmi vysoce specifickou, kdy měl jeden druh orchideje tvořit mykorhizy jen s jedním druhem houby a naopak, ale tato domněnka však byla vyvrácena (Gryndler, 2004).

Poznatky týkající se specifity se dají získat jednak izolací hub z kořenů, jednak testy klíčivosti, kdy je zjišťována kompatibilita hostitele a symbionta v laboratorních podmínkách. Při těchto experimentech však není možné rozlišit, zda se jedná o specifitu fyziologickou (určujícím faktorem je, zda jsou partneři schopni soužití za kontrolovaných podmínek) či o specifitu ekologickou (určujícím faktorem je schopnost soužití v konkrétních podmínkách prostředí). Je-li možno dosáhnout symbiotického soužití v laboratorních podmínkách, neznamená to, že stejné soužití je možné i v přírodě. Stupeň ekologické specifity je vždy nižší než stupeň specifity fyziologické (Gryndler, 2004).

Na základě izolace hub z kořenů orchidejí bylo zjištěno, že specifita vztahu orchideje a mykorhizní houby je ovlivněna ekologickými podmínkami dané lokality nebo také genetickou podobností druhů orchidejí. Ekologická specifita byla zjištěna např. u *Epipactis helleborine*, který se v borových lesích asocioval pouze s rodem *Wilcoxina*, zatímco v jiných typech lesů se asocioval hlavně s rody *Tuber* a *Hydnotrya* (Ogura-Tsujita a Yukawa, 2008).

Podobně Taylor a Bruns (1999) zjistili, že populace *C. maculata* rostoucí v na lokalitách s duby měly jiné asociované houby než populace rostoucí v jehličnanových lesích.

Nicméně v případě druhů *C. maculata* a *C. mertensiana* bylo zjištěno, že ač oba druhy rostou na společných lokalitách, pojí se každá s jinými druhy hub čeledě *Russulaceae* a není mezi nimi žádný překryv. Genetické rozdíly rostlin tak mohou kontrolovat kompatibilitu s houbami. To dokládá fakt, že specializace je velmi dynamická a relativně recentního původu (Taylor a Bruns, 1999).

Preference k jednotlivým mykorhizním houbám se může během ontogeneze měnit, kdy se orchideje

mohou pojit v raných stádiích s jiným druhem houby než v dospělosti. Dobrým příkladem je již zmíněná *Gastrodia elata*, která se v ranných stádiích pojí s *Mycena osmundicola* a po překročení stádia protokormu se pojí s *Armillaria mellea* (Xu *et al.* 1989). Tato směna může být zapříčiněna tím, že *A. mellea* poskytuje orchideji lepší přísun organického uhlíku.

Dalším příkladem je *Galeola altissima*, která se pojí v raných stádiích s *Erythromyces crocicreas* a po dosažení stádia protokormu se jejími mykobiony stanou druhy *Ganoderma australe* a *Lentinus elodes* (Umata, 1998). Míra specifity se může lišit také v delším časovém horizontu; např. u rodu *Cypripedium* zřejmě došlo během evoluce k jejímu zúžení (Shefferson *et al.*, 2007). Bidartondo a Read (2008) dokonce našli zúžení specifity (bottleneck) během ontogeneze, kdy se studované orchideje pojily ve stádiu protokormu s větším spektrem hub než v dospělosti.

Studie na severoamerickém druhu *C. maculata* objevila kryptické druhy na základě jejich asociací s mykorhizními houbami za využití analýz jejich ITS sekvencí (Taylor *et al.*, 2004).

## 1.8. Korálice trojklanná

Korálice trojklanná (*Corallorhiza trifida* Chatelain) je drobná mykoheterotrofní orchidej, která je zakotvena v kyprém lesním humusu pomocí korálovitě větvených a silně ztlustlých oddenkových útvarů. Obnovovací pupeny raší na konci každé ztlustlé části oddenku (Dykyjová, 2003). Jedná se o fakultativně autogamní druh, brylky snadno spadnou na lepidivou bliznu. O opylovačích tohoto druhu není nic známo. I když je tato orchidej ve způsobu výživy velice specializovaná, má velmi široký areál. *C. trifida* vystupuje v Alpách do výše více než 2000 m a nejseverněji byla nalezena ve východním Grónsku na 66° severní šířky. Jinak obvykle roste v cirkumpolárních oblastech od Islandu a Skotska do Skandinávie, jihozápadní hranice jejího rozšíření sahá v Evropě do Pyrenejí, jižní hranice jejího rozšíření probíhá přes Alpy a Apeniny do zemí bývalé Jugoslávie a Bulharska, na Krym a Kavkaz. Z evropské části Ruska je rozšířena do Sibíře, její areál výskytu sahá až do Japonska a severní Ameriky, kde je její vývojové centrum (Procházka, 1980).

*C. trifida* roste ve střední Evropě převážně na dvou zcela odlišných typech stanovišť; vyskytuje se jednak v humózních bučinách a dubohabřinách na bazickém podloží a jednak v podmáčených či zrašelinělých smrčinách, březinách, vrbinách a olšinách. Často vyhledává místa bez vegetace pouze s listovým opadem nebo porosty mechorostů (Dykyjová, 2003).

*C. trifida* se účastní trojstranné symbiózy s druhy stromů z rodu *Picea*, *Populus*, *Salix* a *Thuja*. Zelmer a Currah (1995) potvrdili ve svém pokusu s inokulovanými kořeny, že *C. trifida* se asociuje s *Pinus contorta* skrze našedlé mycelium mykorhizní houby. McKendrick *et al.* (2000) ve své studii potvrdila přímý přenos uhlíku také z *Betula pendula* do MH rostliny. Zároveň zjistila jistou specifitu na sekundární hostitele tím, že *C. trifida* netvořila trojstrannou symbiózu s *Pinus*

*sylvestris*.

I když se předpokládá, že *C. trifida* je úplně mykoheterotrofní, byla zjištěna přítomnost genů kódujících syntézu chlorofylu (Barrett a Freudenstein, 2008) a chlorofyl byl nalezen ve významném množství (Cameron *et al.*, 2009). Druh *C. trifida* získává kolem 52% celkového dusíku a 77% celkového uhlíku pomocí svých mykorhizních hub (Zimmer *et al.*, 2007). Zimmer *et al.* (2008) a McKendrick *et al.*, (2000) prokázali pomocí molekulárních metod i výše zmíněným experimentálním přenosem živin, že *C. trifida* se pojí s ektomykorhizními basidiomycetami z rodů *Tomentella* a *Thelephora*.

## 1.9. Thelephoraceae

Čeleď Thelephoraceae (Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes) sestává z 8 rodů: *Amaurodon*, *Hydnellum*, *Polyozellus*, *Pseudotomentella*, *Sarcodon* (lošák), *Thelephora* (plesňák), *Tomentella* a *Tomentellopsis*. Koljalg *et al.* (2000) vyděluje houby mající resupinatní plodnice na tzv. tomentelloidní houby, do které zahrnuje rody *Amaurodon*, *Pseudotomentella*, *Tomentella* a *Tomentellopsis* čítající dohromady 70 druhů. Sesterský rod *Thelephora* čítá asi 40 druhů.

Tyto houby jsou rozšířené po celém světě, jejich největší diverzita je v jehličnatých a listnatých lesích mírného pásma (Koljalg, 1996). Několik studií vydaných v nedávné době ukázalo, že tyto houby hrají důležitou roli v ektomykorhizním společenstvu jako mykobionti jehličnanů (Bradbury, 1998, Bradbury *et al.* 1998, Danielson a Pruden 1989, Danielson *et al.* 1984).

Plodnice je gymnokarpní krustothecium nejčastěji hydneloidní, stereoidní či korticioidní. Hymenofor je ostnitý, řidčeji rourkatý, bradavčitý nebo může i chybět. Hyfový systém je monomitický. Jde o vývojově odvozenější skupinu hub s homogenními charakteristikami. Klíčení bazidiospor je vždy pomocí hyfy. Při klíčení nikdy nevznikají kvasinkovité útvary, sekundární spory či mikrokonidie. Sekundární mycelium vzniká pouze somatogamickou kopulací buněk primárního mycelia. Hyfy mají vytvořené přezky a dolipóry s perforovaným parentozomem. Bazidie jsou vždy nedělené, obvyklý počet bazidiospor je 4 (Kalina a Váňa 2005).

## 1.10. Cíle práce

- Jaké jsou ekologické nároky druhu *C. trifida* na stanoviště a složení vegetace?
- Které druhy hub se s tímto druhem asociují?
- Liší se jeho spektrum mykorhizních hub v závislosti na typu stanoviště?
- Mohou být rozdíly v symbiontech korelovány s různými genotypy či dokonce kryptickými druhy *C. trifida*?



## 2. Metodika

### 2.1. Odběr vzorků

Odběr vzorků proběhl na 13 českých, 5 slovenských, 2 norských a 1 francouzské lokalitě (detailní popis lokalit Tabulka 1) ve vegetační sezóně 2008 a 2009. Na většině lokalit byly odebrány následující vzorky: 1cm kořene (kvůli minimalizaci narušení rostliny) z 1-3 rostlin a nadzemní část ze 2-5 rostlin. Za účelem zjištění, zda je kořenový systém *C.trifida* kolonizován pouze jediným či několika různými mykorhizními partnery byly na 3 lokalitách odebrány celé kořenové systémy ze 4 rostlin. Vzorky kořenů byly opláchnuty vodou, uchovány v 60% etanolu a později zamraženy při -20°C nebo vysušeny v silikagelu. Vzorky nadzemních částí byly odebrány do silikagelu. Dále byly na všech českých a většině slovenských lokalit odebrány 3 půdní vzorky (z hloubky 5-10cm) a byl zapsán fytoecologický snímek (4x4m, Braun-Blanquetova škála). Podrobný přehled studovaných lokalit a počet analyzovaných vzorků je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1. Popis jednotlivých lokalit a přehled analyzovaných vzorků. FS – byl zapsán fytoecologický snímek, Vzorky kořenů a natě – počty analyzovaných vzorků, \* - počet případů, kdy byl odebrán celý kořenový systém, pH (H<sub>2</sub>O) – půdní reakce (průměr ze tří vzorků), PAJ- počet analyzovaných jedinců

Název lokality	Kód	Souřadnice	FS	PAJ	Vzorky natě	pH (H <sub>2</sub> O)
CHKO Moravský kras, PR Pavlovské mokřady Olomoucký kraj, okres Prostějov	Bela	49°31'47.2"N	x	2	x	5
		16°47'22.8"E				
NP a CHKO Šumava, Dobrá na Šumavě Jihočeský kraj, okres Prachatice	Dobra	48°53'0.3"N	x	1+1*	x	4,3
		13°51'58.6"E				
NP Podyjí, Hardegg, Jihomoravský kraj, okres Znojmo	Hardegg	48°51'23.8"N	x	2		7,1
		15°52'16.6"E				
NP Krkonoše, Lánov-Peklo Královéhradecký kraj, okres Trutnov	Krk-Peklo	50°38'5.9"N	x	2	x	7,3
		15°39'56"E				
NP Krkonoše, Lánov- bučina u lomu Královéhradecký kraj, okres Trutnov	Krk-lom	50°38'5.9"N	x	2		7,5
		15°39'56"E				
NP a CHKO Šumava, Zhůří-okraj cesty Plzeňský kraj, okres Klatovy	Zhuri 2	49°5'14"N	x	2		5,1
		13°32'52.2"E				
CHKO Jeseníky, Vidly-okraj cesty Moravskoslezský kraj, okres Bruntál	Vidly	50°5'28.8"N	x	2	x	3,9
		17°16'34.5"E				
NP a CHKO Šumava, ryb. Olšina Jihočeský kraj, okres Č. Krumlov	Olsina	48°47'24"N	x	2	x	5,3
		14°6'30.4"E				
CHKO Český ráj, PR Bučiny u Rakous Liberecký kraj, okres Liberec	Rakousy	50°37'15.4"N	x			7,5
		15°11'1.4"E				
CHKO Litovelské Pomoraví, NPR Špraněk Olomoucký kraj, okres Olomouc	Spranek	49°39'54.6"N	x			5,3
		16°54'56.6"E				
NP a CHKO Šumava, Zhůří Plzeňský kraj, okres Klatovy	Zhuri 1	49°4'54.1"N	x	1+2*	x	4,6
		13°33'16.7"E				
CHKO Slavkovský les, NPR SOOS Karlovarský kraj, okres Cheb	SOOS	50°9'10.5"N	x	2		5,2
		12°24'25.1"E				
CHKO Jeseníky, NPR Rejvíz Olomoucký kraj, okres Jeseník	Rejvíz	50°13'30"N	x	2	x	5,2
		17°18'06"E				
Bánská Bystrica, Podlavické výmole Banskobystrický kraj, okres Bánská Bystrica	BB-Vymole	48°45'50"N	x			
		19°5'43"E				
Bánská Bystrica, Hviezdáreň Banskobystrický kraj, okres Bánská Bystrica	BB-Hviezdaren	48°43'47"N	x	1		
		19°09'12"E				
CHKO Strážovské vrchy, ŠPR Súľovské skály Žilinský kraj, okres Bytča	Sulov	49°10'30"N	x	1+1*	x	6,3
		18°35'6.3"E				
CHKO Strážovské vrchy, PR Omšenská Baba Trenčínský kraj, okres Trenčín	Omsenie	48°54'44.3"N	x	2		7,5
		18°14'18.7"E				
Malá Fatra, Klačno Trenčínský kraj, okres Ilava	Klačno	48°55'41"N	x	2	x	
		18°10'11"E				
Střední Norsko Sølendet okres Røros, region Sør-Trøndelag	Norsko 1	62°40'50"N		2		
		11°49'59"E				
Střední Norsko, Nordmarka okres Rindal, region Møre og Romsdal	Norsko 2	63°04'33"N		1		
		09°08'00"E				
SV Francie, Rochesson kraj Lorraine, okres Vosges	Francie	48°1'21.4"N		2	x	

## 2.2. Molekulární analýzy

### 2.2.1. Izolace DNA z kořenů a nadzemních částí

Mykorhizní infekce byla pozorována pod binolupou. Kousky kořenů u rostlin, ze kterých byl odebrán celý kořenový systém, byly rozděleny na 5 úseků, ze kterých pak byly udělány řezy. V případě, kdy byl odebrán jen jeden kus kořene, tak byl z něj odříznut jen jeden řez. 1mm mykorhizní řezy byly dále použity na extrakce DNA. Houbovou a rostlinnou DNA jsem vyextrahovala z kořenových řezů či odebraných natí pomocí kitu Invisorb spin plant mini kit ([www.invitex.de](http://www.invitex.de)) podle přiloženého návodu. Takto získaná houbová a rostlinná DNA byla uskladněna při -20°C.

### 2.2.2. Identifikace houbových symbiontů

K amplifikaci byl zvolen úsek jaderné ribozomální DNA (nrDNA) zahrnující konzervativní úseky 18S, 5.8S a 28S a variabilní nekódující úseky ITS1 a ITS2. Porovnávání ITS sekvencí je široce využíváno v taxonomii a v molekulární fylogenetice, s velmi dobrým využitím pro houby, protože se dá dobře namnožit i z malého, silně zředěného množství degradované DNA a má velkou variabilitu na úrovni blízce příbuzných druhů (Gardes, 1993). Úseky ITS jsou rovněž velmi dobře zastoupeny ve veřejných databázích sekvencí, takže umožňují jednoduchou a poměrně spolehlivou determinaci většiny environmentálních vzorků hub.

Pro amplifikaci houbové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) jsem použila různé primery univerzálního houbového primeru ITS1F (Gardes a Bruns, 1993, 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'), univerzálního eukaryotního primeru ITS4 (O'Donnell, 1993, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), specifického primeru pro mykorhizní houby orchidejí ITS1OF (Taylor, 2008, smíchán ze 2 primerů ITS 1OFa 5'-AACTCGGCCATTTAGAGGAAGT-3', ITS1OFb 5'-AACTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3'), a univerzálního eukaryotního primeru TW13 (O'Donnell, 1993) 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'). Použila jsem primerové páry ITS 1F+TW13, ITS 1OF+TW13 s cílem získat dostatečně dlouhou sekvenci pro fylogenetickou analýzu obsahující jak variabilní, tak konzervativní úseky DNA. Primerový pár ITS1F + ITS4 jsem použila jen ojediněle u vzorků, u kterých se vyskytly obtíže s vytvořením části konsenzuální sekvence. Celková reakce na 1 vzorek měla objem 20 µl a skládala se z 10 µl 2x koncentrovaného Plain PP master mixu (1U Taq DNA polymeráza, 0.02 % Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dNTP, 150 mM Tris-HCl (pH 8.8), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Top-Bio), 1,2 µl forward 5 pmol primeru; 1,2 µl reverse 5 pmol primeru a 3.6 µl PCR vody a 4 µl DNA. Cyklus použitý pro namnožení DNA

měl tyto kroky; počáteční denaturace 94°C 4 min, 35 krát opakovaný cyklus denaturace 94°C 30 s, nasedání primerů při 53°C 30 s a elongace při 72°C 30 s, následované finální elongací 10 min při 72°C. PCR proběhla buď v termobloku značky Biometra T3000 nebo TC-XP Bioerg.

Každý PCR produkt jsem smíchala s nanášecím barvivem v poměru 5:1 a nanasla na 1.5% agarózový gel (Serva). Fragmenty migrovaly 30-45 min při napětí 80-100 V v 1x TBE pufru. Jako nanášecí barvivo jsem použila Loading buffer obsahující GelRed (Biotium Corp., USA) nebo SybrGreen I (BioChemica, USA). Výsledný gel jsem vyfotila fotodokumentačním systémem Gel Imager (CFW 1310M) v komoře fotodokumentačního zařízení se zdrojem UV světla za pomoci softwaru ScionVisiCapture. Pro zjištění délky a intenzity fragmentů jsem použila 100 bp DNA Ladder (12 fragmenů, New England Biolabs).

Vzorky určené na sekvenaci jsem purifikovala pomocí enzymu EXO-SAP (USB corporation, USA), kdy jsem do 15 µl vzorku přidala 2µl EXO-SAP. Vzorky jsem nechala sekvenovat s primery ITS1 a TW13 v Laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR a v Macrogen Inc. v Korei.

### 2.2.3. Identifikace genotypů druhu *C. trifida*

Pro zjištění existence kryptických druhů jsem použila metodu ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) založenou na PCR, při které se využívá mikrosatelitových sekvencí jako primerů o délce 16-25 bp. Amplifikuje se náhodný úsek genomu, který obsahuje mikrosatelitní sekvenci.

Nejdříve jsem vybrala vhodné polymorfní primery. Šest vzorků jsem amplifikovala neznáčenými primery 814 (5'-CTCTCTCTCTCTCTCTCTA-3'), 840 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYT-3'), OW1 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3'), OW2 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'), OW4 (5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYT-3'), Dat (5'-GAGAGAGAGAGAGARC-3') stejným postupem jako v případě amplifikace fluorescenčně značenými primery. Výsledný PCR produkt jsem smíchala s Loading buffer s příměsí SybrGreen I v poměru 4:1 a nanasla na 1.2% agarózový gel. Fragmenty se nechaly migrovat 6 hodin při 80 V v 1x TBE pufru. Jako marker jsem použila 100bp DNA ladder o 12 fragmentech. Na základě úspěšnosti amplifikace DNA a podle schopnosti primeru detekovat variabilitu jsem vybrala tři fluorescenčně značené primery, se kterými byly analyzovány všechny sebrané natě: primer 840 (barvivo VIC), OW1 (barvivo VIC) a Dat (barvivo PET). Celková reakce na jeden vzorek měla objem 10 µl a skládala se z 5 µl 2x koncentrovaného Plain PP master mixu (Top-Bio, složení viz výše), 2,4 µl forward 5 pm primeru, 2,4 µl reverse 5 pm primeru, 2,2 µl PCR vody a 0.4 µl DNA. Pro namnožení

DNA byla použita touchdown PCR. Pro primer 840 jsem použila následující cyklus: počáteční denaturace 94°C 3 min, 5 cyklů, ve kterých trvala denaturace 1 min při 94°C, nasedání primerů 1 min při snižování teploty o 1°C v rozmezí 57-53°C a elongace 30 s při 72°C. Za nimi následovalo 32 cyklů, ve kterých denaturace trvala 1 min při 94°C, nasedání primerů 1 min při 52°C a elongaci 2 min při 72°C; finální elongace trvala 10 min při 72°C. Pro primery OW1 a Dat jsem použila stejný cyklus jako pro primer 840 s tím rozdílem, že rozmezí annealingových teplot bylo 61-57°C. Úspěšnost amplifikace před fragmentační analýzou jsem zkontrolovala na agarózovém gelu za podmínek uvedených výše s tím rozdílem, že jsem fragmenty nechala migrovat pouze 2 hodiny.

Vzorky na fragmentační analýzu jsem připravila v celkovém objemu 11µl. Do 10µl deionizovaného formamidu jsem přidala 0.5µl velikostního standardu GeneScan 1200 LIZ Size Standard (Applied Biosystems, USA) a 0.5 µl PCR produktu. Díky různým značícím barvám bylo možno smíchat stejné vzorky namnožené primery OW1 a Dat do jednoho vzorku. Fragmentační analýza proběhla v Laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR.

## 2.3. Fylogenetické analýzy

### 2.3.1. Analýza houbových symbiontů

Chromatogramy jednotlivých sekvencí jsem vizualizovala v programu FinchTV v. 1.4.0 ([www.geospiza.com/finchTV](http://www.geospiza.com/finchTV)), kde jsem odstranila nespolehlivé úseky nacházející se na začátku a na konci sekvence. Spojení sekvencí do konsensu jsem vytvořila a manuálně opravila v programu ChromasPro 1.41 (Technelysium, 2007). Na základě konsenzuálních sekvencí jsem identifikovala jednotlivé druhy- Osekvenované organismy jsem identifikovala pomocí Basic Alignment Search Tool.

Kromě vlastních sekvencí, jsem pro vytvoření fylogenetických stromů použila ještě další sekvence stažené z databáze GeneBank (Altschul *et al.*, 1997) a databáze UNITE (Koljalg *et al.*, 2005). Sekvence z databází byly vybrány tak, abych měla sekvence morfologicky determinovaných plodnic z herbářových položek, co nejlépe druhově pokrývající rody z komplexu *Thelephora-Tomentella*; dále jsem zahrнула zajímavé sekvence, které byly v databázích nejpodobnější mým vlastním (například různé environmentální vzorky a sekvence ektomykorhiz) a také sekvence Thelephoraceae nalezené v dalších druzích orchidejí a v druhu *C. trifida* opublikované v jiných pracích. Většina sekvencí dostupných v databázích však zahrnovala ITS 1, 5.8S, ITS 2, a malou část 28S (tedy cca 600 bp) a tyto úseky byly tedy použity v analýze mých a stažených sekvencí.

Vytvořila jsem dva samostatné alignmenty. První alignment sestával z 22 sekvencí hub

čeledi Thelephoraceae, které jsem získala z druhu *C. trifida*, zahrnující úseky 18S, ITS 1, 5.8S, ITS 2, 28S. Jako outgroup jsem použila taxon SOOS #2, protože byl vrámci mých sekvencí nejbazálnější. Druhý alignment jsem sestavila z vlastních 22 sekvencí spolu s 34 staženými sekvencemi a 1 outgroupem. Jako outgroup jsem použila sekvenci *Thelephora pseudoterrestris* (AF272907) z článku Koljalg *et al.*, (2000). Původně jsem se pokoušela použít jako outgroup druhy z čeledi Thelephoraceae mimo skupinu *Thelephora-Tomentella*, a to *Pseudotomentella tristis* (AF274772), *Tomentellopsis bresadoliana* (EU118674), *Amaurodon hydnooides* (AM490941), *A. aquicoeruelus* (AM490944) a *Sarcodon imbricatus* (AY586711), ty se však ukázaly jako nespolehlivě alignovatelné právě v úsecích ITS1 a ITS2. Sekvence jsem zaligovala pomocí online programu MAFFT (Kato *et al.*, 2002), kde jsem použila algoritmus E-INS-I z důvodu přítomnosti konzervativních úseků 28S, 5.8S a 18S. Alignments jsem manuálně opravila v programu BioEdit (Hall, 1999), kde jsem odstranila nespolehlivě alignované úseky. Outgroup byl nezalignovatelný, proto jsem použila tzv. midpoint rootingu v prvním v druhém alignmentu. Na obou alignmentech jsem provedla fylogenetické analýzy pomocí maximální parsimonie (maximum parsimony, dále jen MP), maximální věrohodnosti (maximum likelihood, dále jen ML) a Bayesiánské pravděpodobnosti (Bayesian inference, dále jen BI).

Postavení MP stromů bylo vypočítáno v programu PAUP 4.0 (Swofford, 2002). Bylo provedeno heuristické vyhledávání. Pro zamezení výskytu lokálních optim bylo zavedeno 1000 a 100 replikací s náhodným řazením sekvencí pro první a druhý alignment. Bylo použito TBR přehazování větví (tree-bisection-reconnection branch swapping). Gapy byly považovány za chybějící znak. Podpora větví byla zjištěna podle 500 bootstrapových pseudoreplikací.

Jako nejvhodnější substituční model pro ML a BI byl pomocí programu MrModelTest3.7 (Posada *et al.*, 1998) určen TrN+I+gamma (Tamura a Nei, 1993) pro první alignment a GTR + I+ G model pro substituci nukleotidů (např. Lanave *et al.*, 1984) pro druhý alignment. Tyto modely byly dále aplikovány na následující analýzy.

Analýza ML byla provedena v programu PhyML v2.4.4 (Guindon a Gascuel, 2003). Bylo použito 6 kategorií diskrétního gamma rozdělení, parametr alfa určující tvar gamma distribuce a proporce invariabilních pozic. Poměry tranzicí a transverzí byly odhadnuty z dat. Podpora větví byla zjištěna podle 500 bootstrapových pseudoreplikací.

Analýza BI byla provedena pomocí algoritmu Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) (Altekar *et al.*, 2004) v programu MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist a Huelsenbeck, 2003). Provedla jsem dvě nezávislé analýzy s 8 Markovovými řetězci a 1 mil. generací pro první alignment, 4 mil. pro druhý alignment, četnost sběru byla každých 100 generací pro první alignment, 500 pro druhý alignment. Konvergence řetězců byla určena pomocí hodnot uváděných v programu Mr.Bayes (standard deviation of split frequencies a potential scale reduction factor).

Dvacet pět procent stromů bylo odstraněno z datasetu a ze zbylých stromů byl vytvořen 50% majoritní konsenzus s posteriorními pravděpodobnostmi jednotlivých větví. Stromy byly vizualizovány v programu TreeView verze 1.6.6., kde jsem podle potřeby redefinovala outgroup. Fylogenetické stromy jsem dále upravila v programu MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### **2.3.2. Analýza genotypové variability druhu *C. trifida***

ISSR profily pocházející z fragmentační analýzy jsem zanalyzovala v programu Genmarker (v. 1.8.0, Soft Genetics, USA) a vytvořila binární matici kódující přítomnost či absenci lokusu. Pro podchycení variability v PCR a přítomnosti nestabilních lokusů, jsem u 5 vzorků (15%) provedla další amplifikaci a fragmentační analýzu a zjistila chybovost, tzv. error rate (počet neshodných pozic u opakovaných vzorků ku celkovému počtu porovnání). Chybovost v datech jsem určila jako přibližně 5%. Pozice obsahující neshodu v přítomnosti lokusu v opakovaných PCR jsem z celkové matice vyloučila, zároveň jsem odstranila i pozice, kde se lokus vyskytoval u méně než 4% vzorků a mohl tedy vznikat jako artefakt PCR. Výsledná matice čítala 35 vzorků a celkem 35 variabilních i nevariabilních pozic.

Síť Neighbor network byla vytvořena v programu SplitsTree v. 4.10 (Hudson a Bryant, 2006). Analýza molekulární variance (AMOVA) uvnitř a mezi populacemi pocházejícími ze dvou typů biotopů, Mantelův test testující shodu mezi geografickými a genetickými distancemi populací a analýza hlavních koordinát (PCoA) umožňující metrickou vizualizaci genetických distancí, byly spočteny v programu GenAlEx 6 (Peakall a Smouse, 2006).

## **2.4. Ekologické preference *C. trifida***

### **2.4.1. Analýza vegetačních snímků**

Fytcenologické snímky jsem převedla pomocí programu Turboveg for Windows v. 2.07a (Hennekens a Schaminee, 2001, [www.synbiosis.alterra.nl/turboveg](http://www.synbiosis.alterra.nl/turboveg)) do programu Juice v. 7.0 (Tichý, 2002). Část fytcenologických snímků jsem získala z České národní fytcenologické databáze (Chytrý a Rafajová 2003). Celkem bylo analyzováno 30 snímků (viz Přílohy).

Protože *C. trifida* primárně závisí na ektomykorhizních houbách okolních dřevin, vyloučila jsem z ordinační analýzy všechny byliny a mechy a zaměřila se na pokryvnost stromů a keřů ve všech vegetačních vrstvách. Pokryvnosti druhů byly převedeny z Braun-Blanquetovy škály na škálu 1-7. Variabilitu ve složení vegetace lokalit druhu *C. trifida* jsem vyhodnotila nepřímou ordinační analýzou PCA v programu CANOCO (ter Braak a Šmilauer 2002). Klasifikaci snímků do

vegetačních skupin jsem provedla pomocí divizivní metody TWINSpan (Hill, 1979) v programu Juice.

Ekologické nároky *C. trifida* byly dále vyhodnoceny pomocí Ellenbergových indikačních hodnot, které ukazují ekologické preference jednotlivých druhů rostlin. Škála těchto hodnot se pohybuje od 1 do 9 (Ellenberg *et al.* 1992).

Průměrné Ellenbergovy hodnoty pro vlhkost, osvětlení, kontinentalitu, půdní reakci, teplotu a živiny byly vypočítány pro každý snímek pomocí programu Juice. Kromě mechorostů a druhů vyšších rostlin, které Ellenberg *et al.* (1992) neklasifikovali, a *C. trifida*, jsem pro analýzu použila všechny ostatní přítomné druhy. Relativní ekologické nároky druhu *C. trifida* jsem následně vyhodnotila nepřímou ordinační analýzou PCA v programu CANOCO. Výsledky byly vizualizovány v programu CANODRAW v. 4.5 (ter Braak a Šmilauer, 2002). K určení jednotlivých biotopů a jejich zařazení jsem použila publikaci Chytrý *et al.*, 2001.

## 2.5. Půdní analýzy

Půdní reakce (pH) byla stanovena Markétou Kremlovou. Odebrané půdní vzorky byly přesáty na sítu (2mm) a usušeny při pokojové teplotě. Vzorky s vysokým podílem rašelinné organické hmoty byly před přesátím zhomogenizovány analytickým mlýnkem A 11 basic (IKA, Německo). Vzorek usušené jemnozeme byl smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:10 (2g/20ml) a promícháván po 1 hodinu na třepačce. Následně bylo změřeno pH vzorků membránovým pH metrem Gryf 107 (Schott Geräte). Ke kalibraci pH metru byl použit ftalátový a fosfátový pufr značky Pentanal. Každý vzorek byl změřen dvakrát a hodnoty způměrovány. Výsledné pH lokality bylo získáno způměrováním naměřených pH hodnot tří vzorků z lokality.



### 3. Výsledky

#### 3.1 Molekulární analýzy a fylogenetické analýzy

##### 3.1.1. Identifikace mykorhizních hub z druhu *C. trifida*

Celkem jsem vyextrahovala DNA a provedla PCR u 59 kořenů z 35 rostlin pocházejících z 19 lokalit. U 53 vzorků kořenů proběhla PCR úspěšně. U žádného vzorku nebylo zaznamenáno více hub, ve všech analyzovaných vzorcích byl vždy nalezen jen jeden band různé intenzity. Porovnáním mých sekvencí s volně dostupnými sekvencemi v databázi NCBI jsem zjistila, že všechny osekvenované houby patří do čeledi Thelephoraceae a rodů *Tomentella* a *Thelephora*. Žádný jiný rod mykorhizních hub nebyl v kořenech nalezen. Celkem jsem našla 22 taxonů z čeledi Thelephoraceae (tabulka 2).

Celkově byla nalezena malá diverzita hub na jednotlivých lokalitách v případě analýzy více rostlin z jedné lokality. Z 16 lokalit, kde jsem analyzovala více než jednu rostlinu, jsem jen na 4 lokalitách našla různé druhy hub v rostlinách, na zbylých lokalitách byly houby ve všech rostlinách stejné (viz tabulka 2). Z celkového počtu 22 druhů jsem identifikovala 7 různých taxonů hub z bučinových biotopů a 15 různých taxonů hub z podmáčených biotopů.

Lokalita	číslo rostliny	druh	kód
Bělá	K1	#1	Bela
	K2	#1	
Dobrá	K1	#2	Dobra #1
	K2	#3	Dobra #2
Francie	K1	#4	Francie #1
	K2	#5	Francie #2
Hardegg	K1	#6	Hardegg
	K2	#6	
BB-Hviezdaren	K1	#7	BB-Hviezdaren
Klacno	K1	#8	Klacno
	K2	#8	
Krk- lom	K1	#9	Krk- lom
	K2	#9	
Norsko 1	K1	#10	Norsko #1
	K2	#10	
Norsko 2	K1	#11	Norsko #2
	K2	#12	Olsina
Olsina	K1	#12	
	K2	#12	
Omsenie	K1	#13	Omsenie
	K2	#13	
Krk- peklo	K1	#14	Krk- Peklo
	K2	#14	
Rejviz	K1	#15	Rejviz
	K2	#15	
SOOS	K1	#16	SOOS #1
	K2	#17	SOOS #2
Sulov	K1	#18	Sulov
	K2	#18	
Vidly	K1	#19	Vidly
	K2	#19	
Zhuri 1	K1	#20	Zhuri1 #1
	K2	#21	Zhuri1 #2
	K3	#20	
Zhuri 2	K1	#22	Zhuri2
	K2	#22	

Tabulka 2. Orientační přehled druhů hub získaných z druhu *C. trifida* s kódy hub jednotlivých lokalit, čísla rostlin a jednotlivých druhů hub. Kód hub označuje kód druhu hub použitý v následných fylogenetických analýzách.

### 3.1.2. Analýza vlastních sekvencí hub z kořenů druhu *C. trifida* - alignment 1

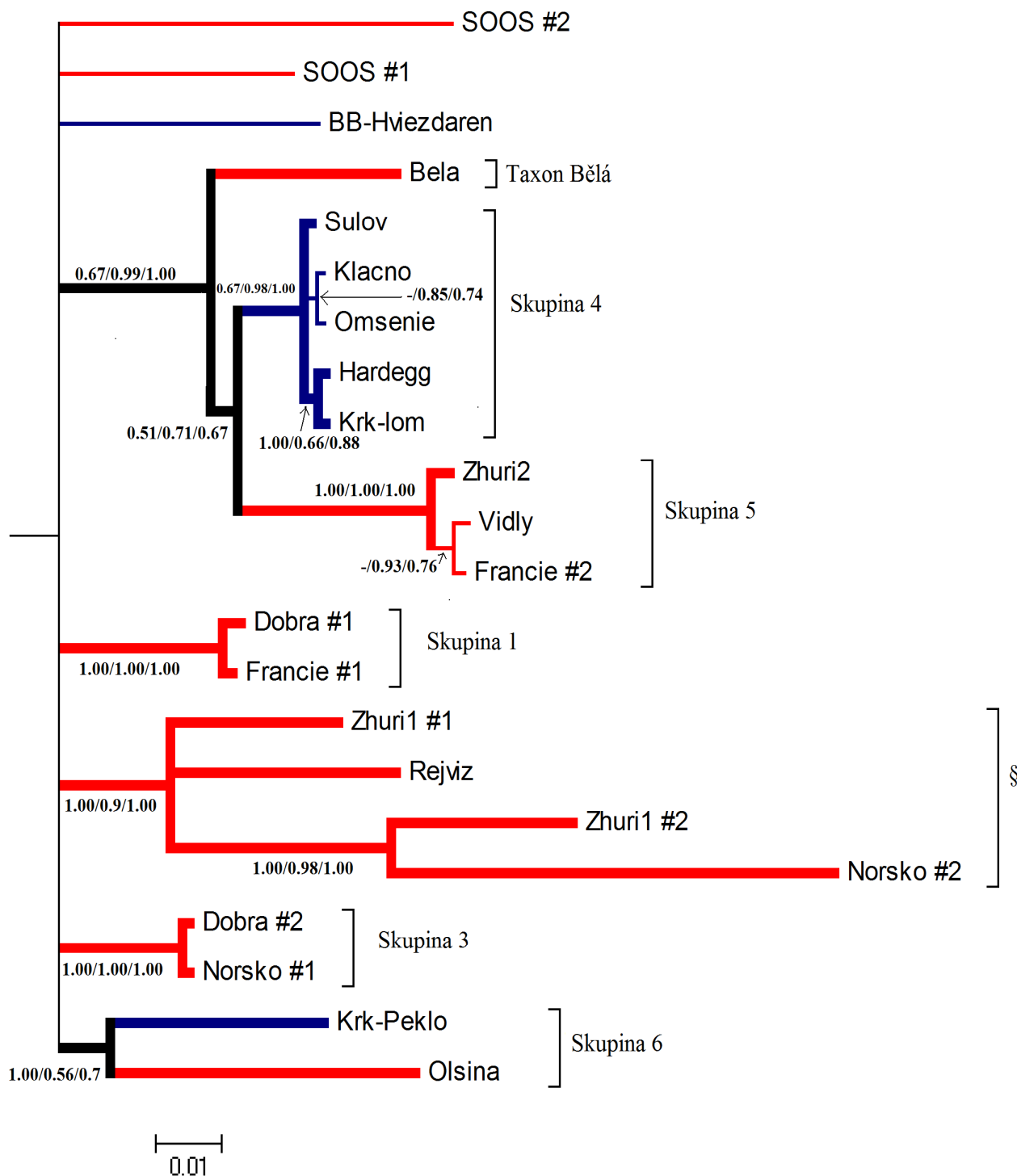
Vlastní sekvence (celkem 22) byly dobře alignovatelné v konzervativních úsecích 5,8S a 28S i ve variabilních úsecích ITS 1 a ITS 2. Alignment byl dlouhý 1195 bazí. Jako outgroup byl definován taxon SOOS#2 na základě porovnání se stromem z alignmentu 2, kde se ukázalo, že je to druh se zcela nejasnou příbuzností k ostatním taxonům.

### 3.1.3. Výsledky fylogenetických analýz

MP analýza našla 27 nejkratších stromů s délkou TL = 397 (konzistenční index- CI=0.6121, homoplastický index- HI=0.3879 a retenční index- RI=0.6695), konsenzuální strom byl sestaven pomocí 50% majoritního konsenzu. Z celkového počtu 1195 znaků bylo 126 znaků informativních pro parsimonii 986 znaků bylo nevariabilních. Analýza ML našla 1 strom (-loglk=-3661.247245). Analýza BI vytvořila jeden strom pomocí 50% majoritního konsenzu.

V případě, že byly nalezeny na jedné lokalitě různé druhy z čeledi Thelephoraceae, málokdy se ve fylogenetické analýze umístily blízko sebe. Výjimkou jsou taxony #1 a #2 z lokality Zhůří1 ve skupině 2 (viz obrázek 1). Podobné si byly druhy Thelephoraceae ze zahraničních a českých lokalit, které se umístily blízko sebe ve skupinách 1, 3 a 5 (viz obrázek 1)

Topologie stromů sestavených ve fylogenetických analýzách si byla dost podobná. Z důvodu přehlednosti byl zobrazen pouze strom sestavený analýzou BI, ve kterém je patrná výrazná bazální polytomie a tedy nejasné vztahy mezi jednotlivými skupinami vylišenými na stromu (obrázek 1). Ve stromech vytvořených ostatními metodami sice vztahy mezi skupinami rozřešeny často byly, ale řešení často nezískala významnou podporu (>50%) a nelze je tedy považovat za spolehlivé. V rámci analýz se vyskytly nestabilní taxony, které v rámci jednotlivých fylogenetických analýz měnily svá umístění (např. SOOS #1).



Obrázek 1. Bayesovský strom vytvořený na základě ITS, 18S, 5.8S a 28S úseků. MP a ML bootstrapové podpory a bayesovské pravděpodobnosti jsou umístěny u nodu v pořadí MP, ML a BI. Červeně vyznačené větve značí symbionty z kyselých biotopů, modré z bučinových. Tlustě vyznačené větve znamenají, že tyto větve jsou podpořeny ve všech třech analýzách. Jako outgroup byl definován taxon SOOS #2. Podpory jednotlivých větví jsou uvedeny pokud byly vyšší než 50%. Vysvětlivky: §- skupina 2. Bylo vytvořeno 5 skupin a jeden samostatně stojící druh.

### 3.1.4. Porovnání jednotlivých metod sestavování fylogenetických stromů

- **Maximální parsimonie**

Nebyly sestavovány polytomické taxony s nejasným fylogenetickým postavením. Topologie stromu byla dobře rozlišená. Mnoho větví, které byly podpořeny v ML a BI nebylo v MP podpořeno.

- **Maximální věrohodnost**

Byl definován jeden taxon s nejasnými fylogenetickými vztahy, a to BB-Hviezdáreň. Co bylo možné, tak bylo umístěno na bázi k jednotlivým podpořeným skupinám s nízkými podporami. Topologie stromu byla rozlišená.

- **Bayesiánská pravděpodobnost**

Vztahy mezi jednotlivými skupinami byly nejméně rozlišené. Byly vytvořeny jednoznačně rozlišitelné skupiny a podpořeny větve, které nebyly podpořeny v MP a ML. Vztahy mezi skupinami s nízkými podporami větví v MP a ML nebyly podpořeny ani analýzou BI, a tím pádem nezobrazeny v baysiánském majoritním stromu. Topologie stromu tím byla více přehledná a ne tak rozvětvená jako v MP a ML.

Mezi taxony s nejasnou příbuzností k ostatním sekvencí (tzv. nestabilní taxony) patří SOOS #1, SOOS #2 a BB-Hviezdáreň, a skončily tak v BI stromu na bázi. Jejich postavení se v rámci jednotlivých fylogenetických analýz velmi lišilo.

### 3.1.5. Dobře podpořené skupiny z alignmentu 1

Z celkového počtu 22 taxonů se vytvořilo 5 dobře podpořených skupin a taxon Bělá. Taxony hub pocházející z podmáčených lokalit nevytvořily žádnou ucelenou skupinu, ale naopak se rozdělily do několika menších skupin, mezi nimiž není jasná příbuznost. Vylišily se tři skupiny zahrnující druhy Thelephoraceae pocházející pouze z kyselých lokalit, a to skupiny 1, 2 a 3. Tyto skupiny zahrnují jak české druhy z lokalit Zhůří 1 a Dobrá, tak i francouzské (Francie #1) a oba norské druhy.

Většina sekvencí pocházejících z bučinových lokalit si byla velmi podobná a vytvořily samostatnou skupinu 4. Jediné dva druhy z bazických lokalit, které v této velké skupině nejsou zahrnuty, mají buď nejasné fylogenetické postavení (BB- Hviezdáreň) a nebo jsou zahrnuty ve smíšené skupině 6. Sesterkými skupinami k velké bazické skupině je skupina 5 a samostatně stojící taxon Bělá.

### 3.1.6. Analýza vlastních sekvencí hub společně se staženými sekvencemi z GeneBank-alignment 2

Celkem bylo analyzováno 57 taxonů. Alignment byl dlouhý 602 bazí. Jako outgroup byl definován taxon *Tomentella pseudoterrestris* (AF272907).

### 3.1.7. Výsledky fylogenetických analýz

MP analýza našla 303 nejkratších stromů s délkou TL= 859, konsenzuální strom byl sestaven pomocí 50% majoritního konsenzu. Z celkového počtu 602 znaků bylo 185 znaků informativní pro parsimonii, 350 znaků bylo nevariabilních (CI=0.3745, HI=0.6205, RI=0.6118). Analýza ML našla jeden strom (loglk=-4760.805488). Analýza BI vytvořila jeden strom sestavený 50% majoritním konsensem.

### 3.1.8. Dobře podpořené skupiny z alignmentu 2

Sekvence z alignmentu 1 zůstaly ve stejných skupinách jako ve stromu na obrázku 1. Druhy hub z českých lokalit nevytvořily oddělenou skupinu, ale byla zjištěna jejich příbuznost k mnoha různým morfologicky definovaným taxonům jako v případě skupin . V případě původně nestabilního taxonu SOOS#1 došlo k jeho stabilnímu zařazení k původně nepříbuzným druhům (obrázek 2). Ve skupině 5 překvapivě došlo k zařazení jednoho druhu pocházejícího z lokality s bazickým pH. Bučínový druh z lokality BB-Hviezdáreň původně s nejasným fylogenetickým postavením se umístil na bázi skupiny 8 (obrázek 2). Taxon SOOS #2 zůstal v nejasném fylogenetickém postavení.

- **Skupina 1**

Zahrnuje skupinu taxonů hub z biotopů s kyselým pH. Spadají do ní taxony Vidly, Francie # 2, Zhůří2, *Tomentella subclavigera* (AF272939), neurčená půdní houba (EF433990) a *Tomentella sp.* vyextrahovaná z druhu *C. trifida* na skotské lokalitě (AF184744). Taxony Francie #2 a Vidly jsou sesterské a taxon Zhůří2 je sesterský s druhem *Tomentella subclavigera* (AF272939). Ani jedna podskupina nebyla podpořena v MP, nejvyšších podpor dosáhly v ML a relativně nízkých podpor v BI. Na bázi této skupiny se nachází blíže neurčená houba vyextrahovaná z půdy na Aljašce (EF433990) a blíže neurčená *Tomentella sp.* vyextrahovaná z druhu *C. trifida* z biotopu s kyselým pH ze Skotska. Pozice bazálních taxonů byly dobře podpořeny ve všech třech analýzách.

- **Skupina 2**

Spadá do ní taxon Bělá, který je sesterský s nezařazeným druhem *Toментella sp.* asociovaným s *Betula papyrifera* (EF218831). Tato skupina je příbuzná se skupinou 1, ale tato příbuznost je podpořena pouze v BI.

- **Skupina 3**

Velká skupina taxonů hub, které byly nalezeny v biotopech se zásaditým pH, do které spadají taxony Sůlov, Klačno, Omšenie, Hardegg a Krk-lom. Tyto taxony zůstaly pohromadě jako v alignmentu 1 připojil se k nim nezařazený druh *Toментella sp.* nalezená v *C. trifida* v bučinovém biotopu s bazickým pH v Německu (EF471313).

- **Skupina 4**

Do této skupiny spadají taxony Dobrá #1, Francie #1, které se udržely pohromadě jako v alignmentu 1. K těmto taxonům je příbuzná *Toментella lateritia* (AF272926). Tato skupina je velmi dobře podpořena ve všech třech analýzách.

- **Skupina 5**

Na bázi této skupiny jsou taxony Rejvíc a Zhůří+ #1. Jejich bazální postavení je podpořeno v BI, v ML a MP tyto větve podpořeny nejsou. Byla vytvořena jedna větší podskupina, do které spadají dvě menší podskupiny a jedna blíže neurčená Basidiomycota vyextrahovaná z *Cephalantera damasonium* z biotopu se zásaditým pH (AY833051), která má v rámci této podskupiny nejasné fylogenetické postavení. Do první menší podskupiny spadá blíže neurčená *Toментella* vyextrahovaná z *Intsia bijuga* ze Seychelských ostrovů (FM955848), která je sesterská s dobře podpořenou skupinou, do které spadá *Thelephora terrestris* (TTU83486), *Thelephora sublilacina* vyextrahovaná z *Alnus sp.* (UDB002972) a neurčená houba z čeledi Thelephoraceae (AF272931). Do druhé menší podskupiny spadají taxony Zhůří1 #2, Norsko #2, blíže neurčená houba z čeledi Thelephoraceae vyextrahovaná z *Cephalantera damasonium* z biotopu s bazickým pH (AY634143). K těmto v rámci skupiny polytomickým taxonům je sesterská dobře podpořená skupina, do které spadá *Toментella terrestris* (AF272901), neurčený druh rodu *Toментella* vyextrahovaná z druhu *C.trifida* (AF184748) a ektomykorhizní houba z čeledi *Thelephoraceae* z druhu *Tsuga heterophylla* (FJ 236853).

- **Skupina 6**

Malá skupina, do které spadají taxony *Toментella punicea* (AF272943) a *Toментella ferruginea* (AF272909). Největší podpory má tato větev v BI, v ML má tato větev nízkou podporu a v MP není vůbec vytvořena.

- **Skupina 7**

Tato skupina zahrnuje na bázi taxon BB-Hviezdáreň. Ostatní větve této skupiny nebyly podpořeny v MP, v ML a BI podpořeny byly a spadají do ní 3 taxony; houba z čeledi *Thelephoraceae* z *Cephalanthera exigua* z Thajska (FJ549908), půdní houba z lokality z USA (EU292520) a druh *Tomentella lapida* (AF272941).

- **Skupina 8**

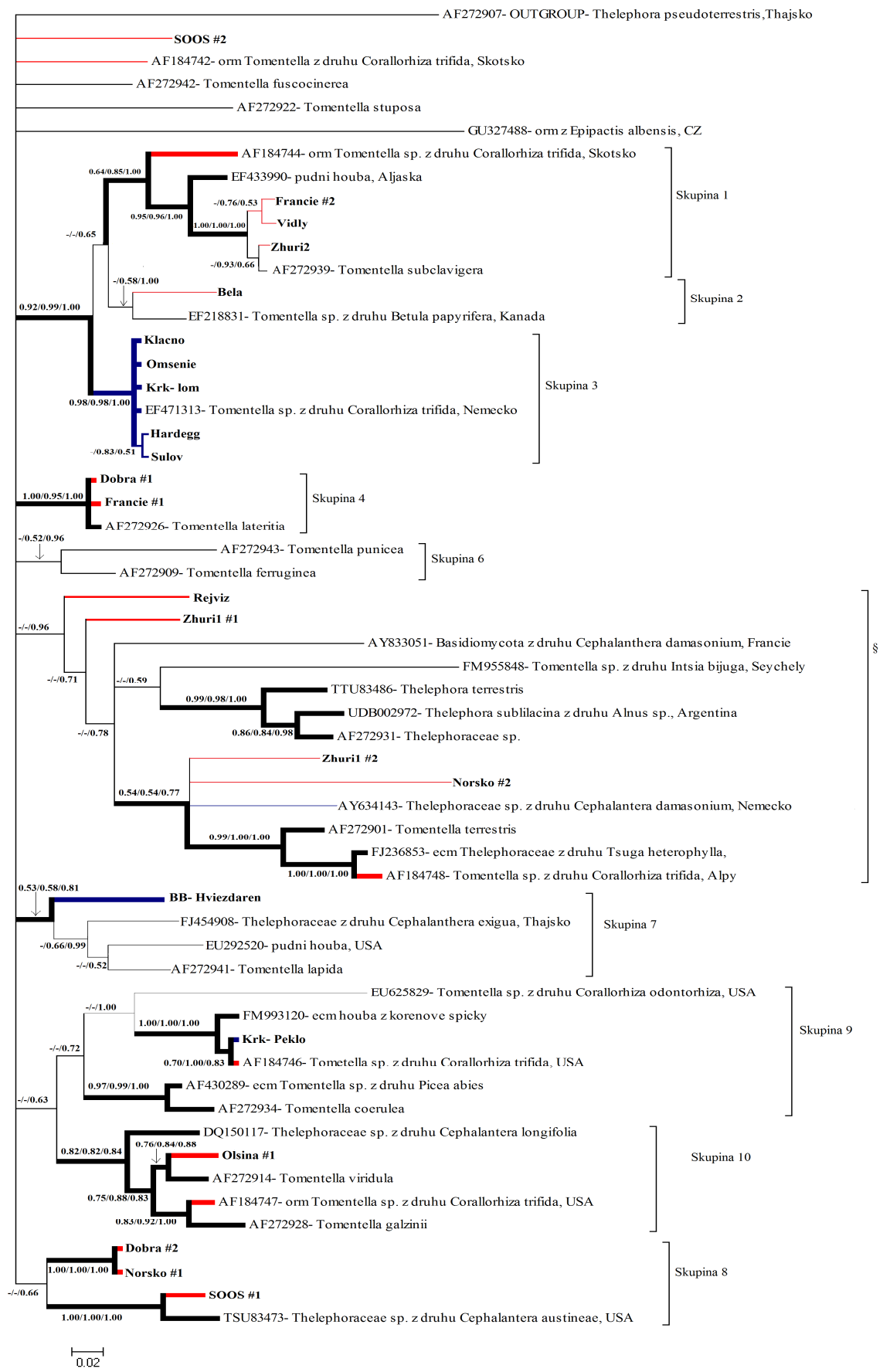
Do této skupiny spadají taxony Dobrá #2 a Norsko #1, které se drží spolu stejně jako v 1.alignmentu a k nim náleží sesterská skupina, do které spadá taxon SOOS #1, který byl v 1. alignmentu polytomický a blíže neurčená houba z čeledi *Thelephoraceae* z druhu *Cephalanthera austineae* nalezené na lokalitě v USA (TSU83473).

- **Skupina 9**

Taxon Krk-Peklo se seskupil s blíže neurčeným druhem z rodu *Tomentella* vyextrahovanou z druhu *C. trifida* na americké lokalitě (AF184746) a s neurčenou houbou z rodu *Tomentella* z *C. odontorhiza* na lokalitě v USA (EU625829) a s ektomykorhizní houbou z rodu *Tomentella* vyextrahovanou z kořenové špičky druhu *Picea abies* (AF430289). Jejím blízce příbuzným taxonem je *Tomentella coerulea* (AF272934).

- **Skupina 10**

Na bázi této skupiny je blíže neurčená houby z čeledi *Thelephoraceae* vyextrahovaná z *Cephalanthera longifolia* (DQ150117). Taxon Olšina #1 je příbuzná s *Tomentella viridula* (AF272914) a jejich sesterskou skupinou je neurčená houba z rodu *Tomentella* sp. z *C. trifida* na lokalitě s kyselým pH v USA (AF184747) a *Tomentella galzinii* (AF272928).

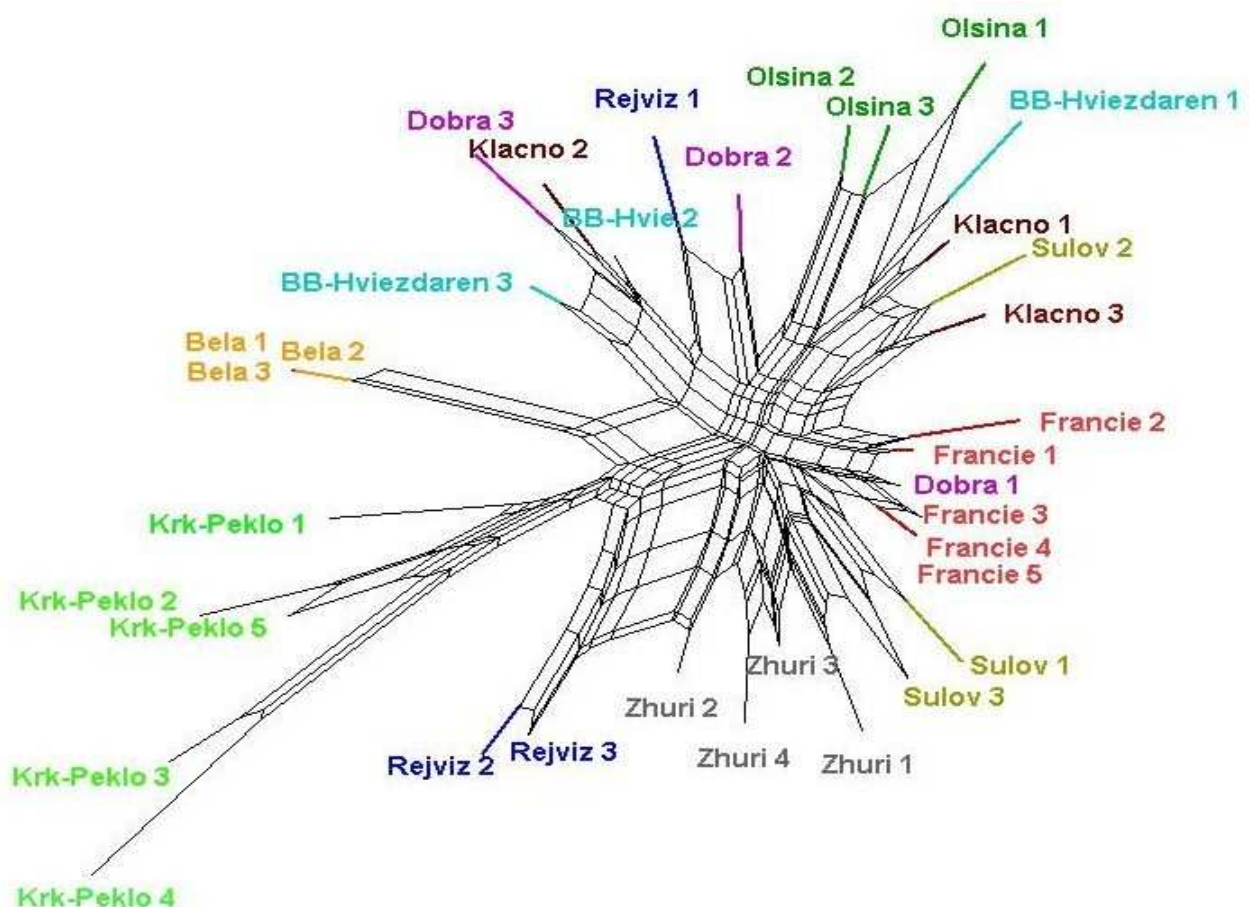




Obrázek 2. Bayesovský strom sestavený na základě ITS, 18S, 5.8S a 28S úseků. MP a ML bootstrapové podpory a bayesovské pravděpodobosti jsou umístěny u nodu v pořadí MP, ML a BI. Vysvětlivky: orm- orchideoidní mykorrhiza, ecm- ektomykorrhiza, §- skupina 5. *Tomentella pseudoterrestris* (AF272907) byla definována jako outgroup. Bylo vytvořeno 10 skupin. Jednotlivé podpory větví byly uvedeny pokud byly vyšší než 50%. Vysvětlivky: §- skupina 2. Červeně vyznačené větve značí symbionty z kyselých biotopů, modře z bazických. Tlustě vyznačené větve znamenají, že tyto větve byly podpořeny ve všech třech analýzách. Námi vytvořené sekvence byly zvýrazněny tlustě. Každá ze stažených sekvencí má uvedené své unikátní číslo z databáze. Při možnosti dohledání bližších informací byla uvedena lokalita, zdroj a pH. Celá druhová jména bez lokality a zdroje značí, že sekvence pochází z herbářové položky.

### 3.2. Analýza genotypové variability druhu *C. trifida* pomocí ISSR

Celkem jsem zanalyzovala nadzemní části 35 rostlin pocházejících z 10 různých lokalit; po pěti vzorcích z Francie a Krkonoš, po čtyřech vzorcích z lokality Zhůří 1 a po třech vzorcích z lokalit Bělá, Dobrá, BB-Hviezdáreň, Klacno, Rejviz, Olšina, Sůlov. Za použití tří ISSR primerů jsem získala 35 informativních lokusů.



Obrázek 3. Fylogenetická síť Neighbour Network vytvořená z genotypů druhu *C. trifida* získaných metodou ISSR. Číslo za jmény lokalit značí vzorky jednotlivých rostlin.

Jednotlivé vzorky nadzemních částí z kyselých a bazických biotopů a i z různých často geograficky vzdálených lokalit vytvořily relativně homogenní skupinu bez zjevné diferenciacie (obrázek 3). Absence souvislosti mezi genotypovou variabilitou a geografickými vzdálenostmi je podpořena i neprůkazným Mantelovým testem ( $p > 0,46$ ,  $R^2 = -0.038$ ).

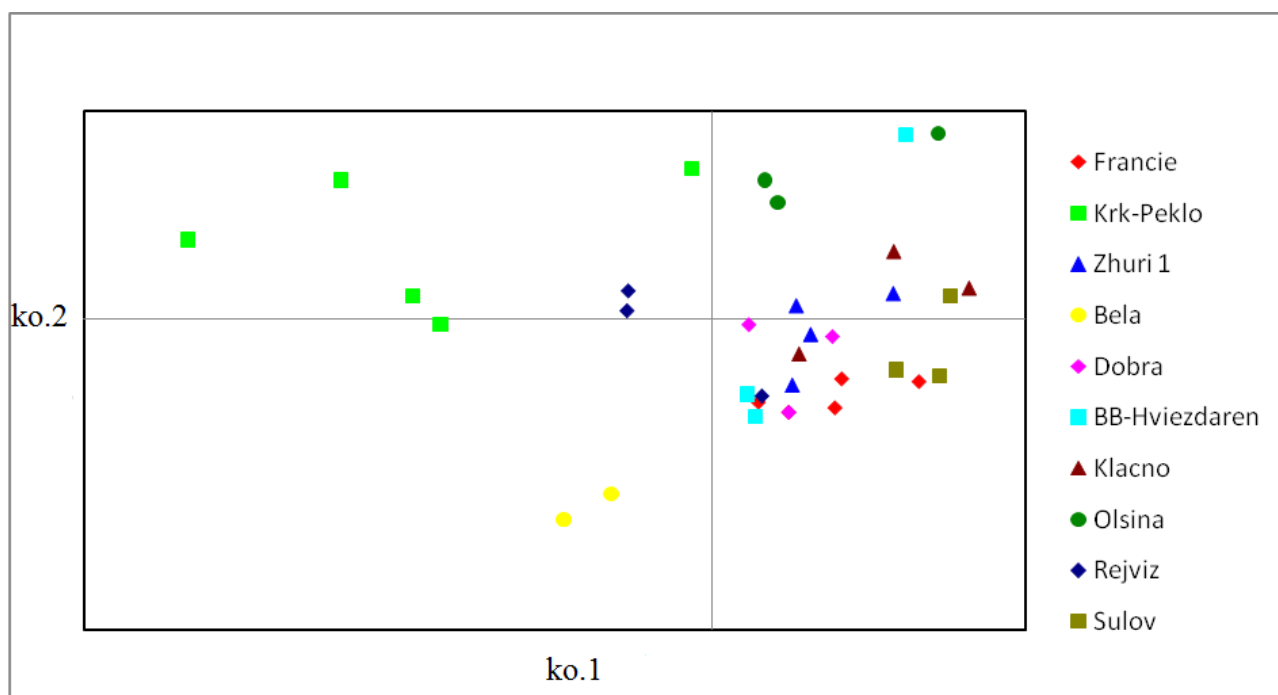
Rozmístění jednotlivých vzorků by se dalo rozdělit do tří skupin. Genotypově výrazněji oddělené od ostatních populací byly pouze rostliny ze dvou lokalit, a to Krkonoše-Peklo a Bělá (obrázek 3). Rostliny z ostatních lokalit také někdy tvořily homogenní skupiny vzorků, které zůstávaly pohromadě, nicméně výraznější oddělení od ostatních chybí (např. Francie, Olšina, Zhůří); nebo se vzorky z jedné lokality rozmístily na různá místa v síti (Sůlov, Rejvíz, Klačno, BB-Hviezdáreň, Dobrá).

Pomocí analýzy molekulární variance se ukázaly statisticky průkazné genetické rozdíly mezi populacemi i v rámci jednotlivých populací, přičemž více variability bylo vysvětleno na mezipopulační úrovni (tabulka 3). Naopak populace pocházející z kyselých a bazických stanovišť se od sebe průkazně nelišily (tabulka 3). Jelikož vysoká variabilita vzorků z lokality Krkonoše-Peklo by mohla zkreslit vlastní analýzu, byly vzorky z této lokality v další analýze odebrány, výsledek byl ale velice podobný.

Variabilita	DF	OV	%	p
Mezi biotopy	1	0,049	1	0,276
Mezipopulační	8	1,563	57	***
Vnitropopulační	25	2,086	42	***

Tabulka 3. Shrnutí analýzy molekulární variance (AMOVA). Hladina významnosti byla testována na 999 permutacích. Vysvětlivky:\*\*\*- průkazný na hladině ( $p < 0,001$ ), DF- stupně volnosti, OV odhadovaná variabilita, %- procento vysvětlené variability, p- průkaznost.

Graf PCoA analýzy (obrázek 4) ukazuje podobné výsledky jako síť Neighbour Network (obrázek 3). Opět jsou poměrně dobře oddělené rostliny z lokalit Bělá a Krkonoše-Peklo. Vzorčky z ostatních populací jsou si vzájemně naopak velmi podobné.



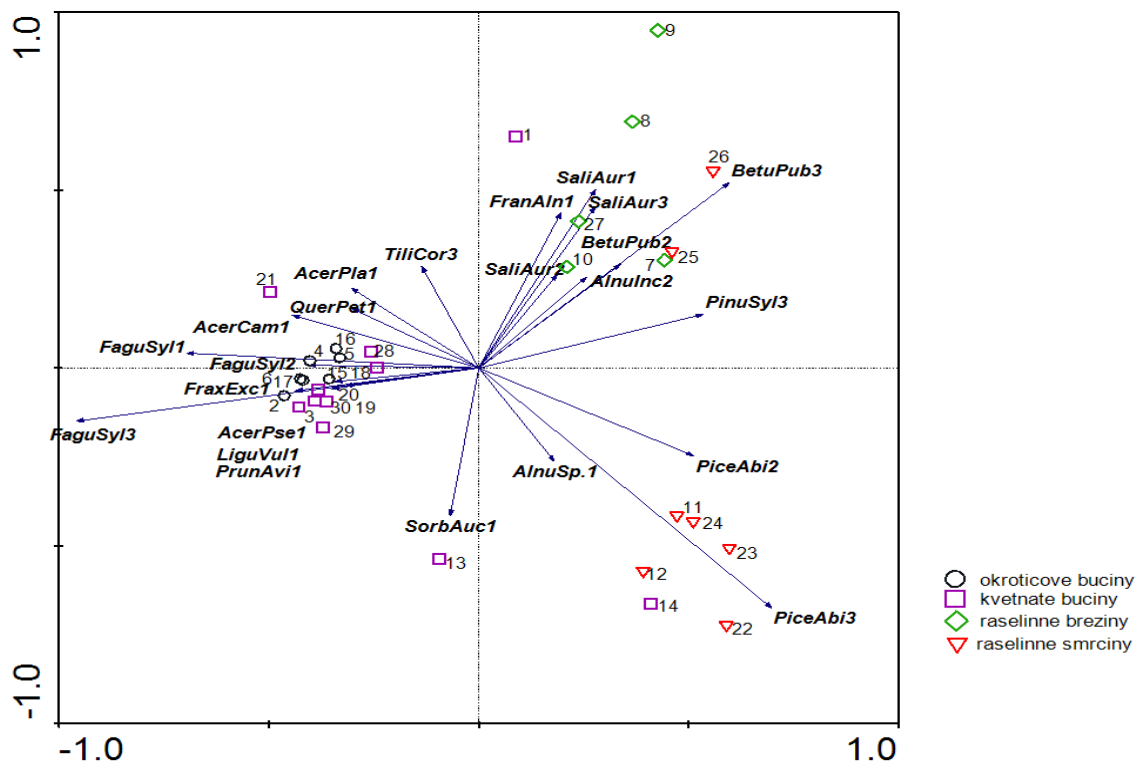
Obrázek 4. PCoA ordinační analýza genetických distancí rostlin ze všech analyzovaných lokalit. Vysvětlivky: ko.1, 2 - 1 a 2 osa. První osa vysvětlovala 34,5 % variability, druhá osa vysvětlovala 23,8 % variability.

### 3.3. Ekologické preference druhu *C. trifida*

Na základě analýzy fytoocenologických snímků pomocí divizní analýzy Twinspan byly v programu Juice klasifikovány čtyři biotopy, ve kterých roste *C. trifida*:

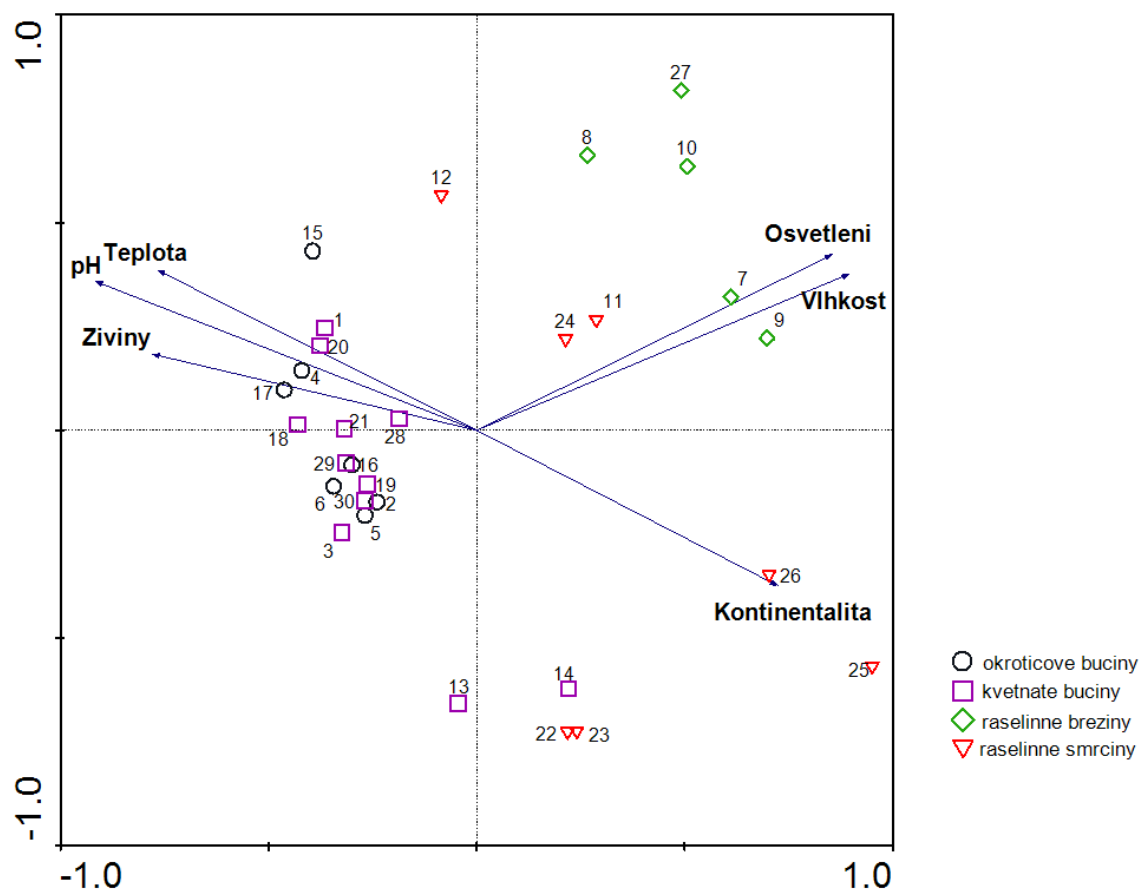
Jedná se o květnaté bučiny podsv. Eu-Fagenion (sv. Fagenion), vápnomilné (okroticové) bučiny podsv. Cephalanthero-Fagenion (sv. Fagenion), rašelinné březiny sv. Betulion pubescentis a heterogennější skupina rašelinných a podmáčených smrčín sv. Piceion excelsae a rašelinných brusnicových borů sv. Dicrano-Pinion. Druhové složení stromového a keřového patra těchto 4 skupin je ilustrováno na obrázku 6. Pro květnaté bučiny byly dominantními druhy *Fagus sylvatica*, *Tilia cordata* a *Hieraceum murorum*, diagnostickými druhy byly *Galium odoratum*, *Mycelis muralis*, *Lathyrus vernus*. Dominantními druhy pro vápnomilné bučiny byl *Fagus sylvatica*. Diagnostickými druhy byly *Fagus sylvatica* a *Cephalanthera damasonium*. Pro rašelinné březiny byly dominantními druhy *Filipendula ulmaria*, *Salix aurita*, *Betula carpathica* a *B. pubescens*. Diagnostickými druhy byly *Viola palustris*, *Salix aurita* a *Carex nigra*. Pro poslední diagnostikovaný biotop byly dominantními druhy *Picea abies*, *Calamagrostis villosa*, *Vaccinium*

*uliginosum* a *Pinus sylvestris*. Diagnostickými druhy byly *Picea abies*, *Calamagrostis villosa*, *Pinus sylvestris* a *Moneses uniflora*. Ordinační analýza stromového a keřového patra fytoocenologických snímků s výskytem korálice dobře vyděluje skupinu bučinových biotopů s dominantním druhem *Fagus sylvatica*. Druhou dobře vylíšenou skupinou jsou podmáčené rašelinné březiny a vrby s dominantními druhy *Betula pubescens* a *Salix aurita*. Skupina rašelinných smrčín je tvořena heterogenním souborem snímků, který se v ordinačním diagramu částečně překrývá se skupinou rašelinných březin (jedná se o fytoocenologické snímky z lokality NPR Borová Lada, kde se kromě *Pinus sylvestris* výrazně uplatňuje i *Betula pubescens*).



Obrázek 5. Ordinační analýza stromového a keřového patra fytoocenologických snímků s výskytem *C. trifida*. První osa vysvětlovala 22,2 % variability, druhá osa 32,7 % variability.

Mnohorozměrná analýza Ellenbergových indikačních hodnot dobře oddělila bučinové biotopy od biotopů zrašeliněných a podmáčených (obrázek 6). Pro bučinové biotopy je charakteristická vysoká úživnost, vyšší teplota a půdní reakce. Vápnomilné a květnaté bučiny jsou obecně sušší biotopy s dominujícím stromovým patrem, pokryvnost bylinného patra bývá i méně než 30%. Relativně homogenní skupinu tvoří biotop rašelinných březin, pro který je typické vyšší osvětlení a vysoká vlhkost. Jde o kyselý podmáčený biotop rostoucí zpravidla na mělkých rašelinách o hloubce 10- 20 cm. Rašelinné smrčiny se částečně vydělily dle stoupajícího gradientu kontinentality.



Obrázek 6. Ordinační analýza charakteristik jednotlivých biotopů vypočítaných na základě Ellenbergových indikačních hodnot. (nepřímá ordinační analýza PCA). První osa vysvětlovala 74,6 % variability a druhé osa vysvětlovala 87,3 % variability.

### 3.4. Půdní analýzy

Rozmezí hodnot půdní reakce v rámci studovaných lokalit se pohybovalo od 3,9 do 7,5 (tabulka 1). Na základě těchto hodnot bylo možné rozlišit stanoviště na kyselá (podmáčené a zrašelinělé březiny a smrciny) a bazická (květnaté a vápnomilné bučiny). Toto rozdělení odpovídá tomu, jaký typ vegetace na dané lokalitě roste a na jaké podkladu se vyskytuje. Výjimky v rámci bučinových lokalit tvoří Špraněk a Sůlov, které jsou sice na vápenci, ale jeho pH je mírně kyselé. Tato odchylka může být pravděpodobně způsobena vyplaveným půdním horizontem.

## 4. Diskuze

### 4.1 Limitace rozšíření mykoheterotrofních rostlin – abiotické vs. biotické faktory

Vhodnost biotopu pro vyklíčení a následný růst rostlin je určována jak abiotickými (živiny, světlo, typ půdy), tak biotickými faktory životního prostředí (kompetice s okolními rostlinami, přítomnost patogenů, opylovačů a mykorhizních hub). U mykoheterotrofních rostlin je přítomnost hub klíčovým faktorem. *C. trifida* je primárně závislá na trojstranné symbióze, které se účastní mykorhizní houby a skrze ně napojené okolní stromy. Mnoho studií dokázalo fakt, že ektomykorhizní houby nejsou v půdě rozmístěny nahodile a roztroušeně, ale shlukovitě s určenými limity jejich rozšíření. Rozmístění mykorhizních hub do jisté míry určuje rozmístění rostlin, což platí zvláště pro mykoheterotrofní rostliny (Barrett *et al.* 2010, McCormick *et al.* 2009).

Většina tomentelloidních hub je celosvětově rozšířena a centrum jejich diverzity se nachází v temperátních jehličnanových a listnatých lesích. Ektomykorhizní houby jsou vázány na lesní biotopy, kde se vyskytují jejich hostitelské rostliny a jednotlivé druhy hub se v rámci lokality vyskytují mozaikovitě (Tedersoo *et al.* 2003). Ekologické charakteristiky tomentelloidních hub nejsou stále dobře neprozkoumány. Obecně se ví, že zástupci této čeledi patří mezi saprofyty (Kalina a Váňa 2003) a ektomykorhizní houby, které jsou nespecifické při výběru svého hostitele (McKendrick *et al.* 2000; Koljalg *et al.* 2000).

### 4.2 Specifita houbových partnerů rodu *Corallorhiza*

V rámci rodu *Corallorhiza* se druh *C. trifida* řadí nejspíše mezi specifické druhy, pojí se s dvěma rody hub patřících do čeledi Thelephoraceae, a to s rody *Tomentella* a *Thelephora*. Tyto výsledky korespondují s výsledky publikované McKendrick *et al.*, (2000). Co se týče asociací pravděpodobně příbuzných druhů *C. trifida*, které byly sestaveny ve fylogenetické studii publikované Freudensteinem a Senyo (2008), je *C. odontorhiza* oproti *C. trifida* více specifická, protože se pojí jen s rodem *Tomentella spp.* Studie McCormick *et al.*, (2009) byla však provedena jen na jedné jediné lokalitě, proto může být její specifita podhodnocena a může být ve skutečnosti širší. Další druhy řazené do společné skupiny s *C. trifida*- *C. maculata* a *C. mertensiana* - se pojí výhradně s houbami z čeledě Russulaceae (Taylor a Bruns, 2003). U relativně vzdálenějšího druhu, ale stále se nacházejícím ve stejné skupině jako *C. trifida* skupině- *C. striata*- se pojila jen se zástupci z rodu *Tomentella sp.*, která je taxonomicky blíže příbuzná s *T. fuscocinerea* (Barrett *et al.*, 2010). Druh *T. fuscocinerea* vyšel jako nejbližší příbuzný taxonům z bučinových biotopů (viz

obrázek 1 v sekci Výsledky) po zpětné identifikaci. Tento druh neměl v rámci mých analýz jasné fylogenetické postavení. Proto se zpětná identifikace musí brát s rezervou, protože databáze nezahrnuje všechny druhy tomentelloidních hub a spoléhá pouze na podobnost sekvencí.

#### 4.3 Mykorhizní asociace *C. trifida* ve dvou kontrastních typech biotopů

Výsledky fylogenetických analýz ukázaly na tendence ve shlukování většiny z bučinových taxonů hub do jedné velké skupiny, a na tvorbu menších skupin taxonů smrčínových a březinových. Mezi skupinami těchto taxonů však nebyly ujasněné fylogenetické vztahy, a proto byly považovány jednotlivé skupiny za nepřibuzné. V jednom jediném případě došlo ke shlukování bučinového a smrčínového taxonu v jedné skupině.

V bučinových biotopech *C. trifida* preferovala jeden druh houby, zatímco v březinových biotopech se pojila s více druhy hub. Tato zjištění korespondují s tvrzením, že by mohl druh *C. trifida* dávat přednost jednomu určitému taxonu tomentelloidní houby před jiným (McCormick *et al.*, 2009).

Ve fylogenetické analýze došlo k jednomu zajímavému zjištění, a to u skupiny 2. (viz obrázek 1), která se sestává z taxonů Zhůří2 a Vidly, u kterých bylo naměřeno kyselé pH, a přitom jsou sesterské k bučinovým taxonům. Tyto linie by mohly být pravděpodobně považovány za jakýsi přechod mezi liniemi hub z bučinových a podmáčených biotopů. Taxony Vidly a Zhůří #2 pocházejí z rostlin rostoucích na okraji cest s nevyhraněným vegetačním společenstvem s přítomností smrku a buku (Jersáková, ústní sdělení) (viz fytoecologické snímky v sekce Přílohy). Taxon Francie #1 je evidentně příbuzný k těmto taxonům, který pochází z lokality s kyselým pH stejně jako v případě jemu příbuzných českých taxonů. Po zpětné identifikaci ve veřejné databázi se potvrdilo, že taxony Zhůří2, Vidly a Francie #1 jsou si velmi podobné s *Tomentella subclavigera*. Taxony Francie #2 a Dobrá jsou pravděpodobně druh *Tomentella lateritia*, což podpořilo naše výsledky z fylogenetických analýz uvedených v sekci Výsledky. Taxony získané z Rejvízu, Norska a Zhůří mohou být s velkou pravděpodobností *Tomentella sublilacina*. Pro tento druh bylo konkrétně zjištěno shlukovité rozmístění v rámci lokality ve studii publikované Hortonem a Brunsem (1998). Skupina 3 (viz Obr. 1) byla podobná s *Thelephora terrestris*. Všem bučinovým taxonům nacházejícím se ve skupině 4 byla nejbližší příbuzná, jak bylo již výše zmíněno, *Tomentella fuscocinerea*. Asociace našich taxonů tedy i po orientační identifikaci pokrývají rody *Thelephora* a *Tomentella*.

*C. trifida* roste ve vápnomilných bučinách, kde se hojně vyskytuje i další druh z čeledi vstavačovitých, a to druh *Cephalanthera damasonium*, ve kterém byly také, stejně jako u druhu *C. trifida*, nalezeny jako mykobionti zástupci čeledi *Thelephoraceae*. Vzhledem k tomu, že jde o dva rozdílné druhy, by bylo zajímavé porovnat jejich mykobionty.

#### 4.4 Genotypová variabilita *C. trifida*

Velikost vnitropopulační a mezipopulační variability nám umožňuje usuzovat, jaké evoluční procesy proběhly v daných populacích v historii a v současnosti (Godt *et al.*, 1996).

Míra průměrné genetické odlišnosti každé populace oproti zbytku populací může být použita ke zkoumání důsledků geografického členění populací v evolučních procesech, které probíhaly jak v minulosti, tak v současnosti a je důležitá při rekonstrukci jednotlivých fylogeografických událostí, ke kterým došlo před a po osídlení lokality.

*C. trifida* je fakultativně autogamická rostlina s výrazným klonálním růstem (Vakhrameeva *et al.* 2008). Rostlinné druhy s takovými vlastnostmi mají obvykle vysokou mezipopulační a nízkou vnitropopulační genetickou variabilitu. Miniaturní semena vstavačovitých však umožňují snadný přenos i na velké vzdálenosti, čímž by se mohla mezipopulační variabilita snižovat.

Nedávno však bylo doloženo, že většina semen vstavačovitých rostlin spadne poblíž mateřské rostliny (Jersáková a Malinová 2007) a jen nepatrné množství semen z jejich velkého počtu se přenesou i na velké vzdálenosti pomocí vzdušných proudů.

Klonalita a izolace populací v prostoru mohou také vést ke snížení mezipopulační variability a zároveň zvyšovat diverzitu vnitropopulační. V mnou studovaných lokalitách však vnitropopulační variabilita byla vyšší než variabilita mezipopulační. Tento výsledek tedy v přímém rozporu s populačními studiemi provedenými na autogamních rostlinách a odpovídá spíše trendu zjištěnému u cizosprašných rostlin (Sheeja *et al.*, 2009).

Variabilita mezi regiony byla zanedbatelná a neprůkazná, což ukazuje na relativní genotypovou homogenitu. Tato skutečnost zřejmě nebude způsobena tím, že by se *C. trifida* dobře šířila semeny a docházelo tak k časté výměně genetického materiálu. Dá se předpokládat, že v lesních uzavřených biotopech je šíření semeny ztíženo (Jacquenym, 2008), navíc většina populací *C. trifida* představuje izolované výskyty. I přes náhodnost, s jakou dochází k rozptylování semen, může tento proces podporovat toku genů a omezovat tak genetickou diferenciaci. Přenos pylu opylovači také nelze zcela vyloučit, musíme však brát v úvahu to, že o něm není nic známo a druh je pokládán za převážně samosprašný (Procházka, 1980). Nízká mezipopulační variabilita také může představovat počáteční diferenciaci ekotypů nebo počátek speciace, pokud jsou populace izolované jedna od druhé (Falk a Olwell, 1992).

Na základě hypotézy, že ještě před několika desítkami let byl druh *C. trifida* hojný, tudíž nebyly populace izolované a probíhal mezi nimi tok genů. V nedávné době však došlo k velkému úbytku populací, kdy např. na Moravě a ve Slezsku vymizelo až 88% populací (Jatiová a Šmiták, 1996), což se ještě nemuselo stihnout projevit na genetické variabilitě jednotlivých populací. Nízká



mezipopulační variabilita může být způsobena tím, že se stávající populace oddělily od zdrojové populace teprve před nedávnou dobou nebo to mohou být zbytky genotypů pocházející z původní panpopulace, které se zachovaly do současnosti (Machon *et al.*, 2002).

Dalším možným vysvětlením je to, že se jedná o druh, který se rozšířil na severní polokouli až po době ledové, proto se ještě nestačil diferencovat. Proto pro rozšíření naší analýzy by bylo vhodné rozšířit spektrum vzorků o další lokality, a to o ty vzdálenější, kupříkladu lokality z USA, protože v na americkém kontinentu se vyskytoval druh *C. trifida* již před zaledněním.

Co se týče kryptických druhů v rámci rodu *Corallorhiza*, tak u druhu *C. maculata* bylo nalezeno 6 různých rostlinných genotypů, jejichž výskyt byl svázán s jednotlivými genotypy hub (Taylor *et al.* 2003). V naší práci se nevyskytly žádné kryptické druhy. Na základě genotypových analýz totiž vyšlo najevo, že genotypově se populace březin, bučin se od sebe neliší.

Míra a distribuce genetické variability v rostlinném společenstvu je ovlivněna nejméně třemi faktory, které spolu úzce souvisejí. Prvním faktorem jsou abiotické faktory jako klima, podmínky okolního prostředí a půdy. Biotické faktory jako kompetice, symbióza, parazitismus a predace jsou druhým faktorem. Třetí faktor zahrnuje charakteristiky druhu jako je velikost jeho populace, způsob rozmnožování, genetický tok, geografické rozšíření a mechanismy rozšiřování semen. Všechny tyto tři faktory ovlivňují genetickou výbavu řízeným (např. selekcí) či náhodným způsobem.

U dvou lokalit, a to konkrétně u lokalit Krkonoše-Peklo a Bělá lze pozorovat jistou genotypovou vyhraněnost oproti ostatním lokalitám, ale nejedná se o kryptické druhy. U těchto lokalit lze pozorovat jistou ztrátu variability zapříčiněnou tzv. bottleneck efektem, při kterém dochází k výraznému snížení variability v populaci díky tomu, že se velikost populace výrazně sníží a pak může snadno dojít ke ztrátě alel nebo jejich fixaci. Ztráta variability v těchto populacích by se dala vysvětlit také tzv. efektem zakladatele.

#### **4.5 Ekologické preference druhu *C. trifida***

Dalo by se říci, že *C. trifida* má pomalý evoluční vývoj zaviněný svou samosprašností a klonalitou a její přežití je závislé jen na houbách, které jsou limitujícím faktorem jejího výskytu. Dalším důležitým souvisejícím limitujícím faktorem je výskyt vhodných ektomykorhizních stromů. Druhy, u kterých byla trojstranná symbióza popsána, jsou hojně rozšířené po severní polokouli (Randuška *et al.*, 1983). Druh *C. trifida* má velmi širokou ekologickou amplitudu, roste v různých typech biotopů s rozdílným vodním režimem, různou intenzitou světla a v relativně širokém rozmezí pH, jehož rozmezí se pohybuje od slabě bazického po kyselé (Ellenberg *et al.*, 1992). Co se týče nadmořské výšky, tak se druh *C. trifida* vyskytuje od nížin až do vyšších poloh horského stupně (Procházka, 1980).

Stejně jako mnoho dalších druhů orchidejí je *C. trifida* velmi vzácný druh. Zákonem je hodnocena jako silně ohrožený druh s vysokými nároky na stanovištní podmínky (Jatiová a Šmiták 1996). Biotopy, ve kterých roste, jsou ohroženy například vysoušením, převodem na jehličnaté monokultury, přezvěřením, ruderalizací, eutrofizací či těžbou rašeliny (Chytrý *et al.*, 2001) (Jersáková a Kindlmann, 2004) uvádějí, že *C. trifida* roste v některých typech biotopů s častějším výskytem a její pokryvnost se pro tento druh rozumí pokryvnost velmi nízká až zanedbatelná. Tento druh je tedy považován za celkově vzácný (Jatiová a Šmiták, 1996).

Klonální rostliny, ke kterým patří i *C. trifida*, obvykle tvoří velmi dlouhověké populace. *C. trifida* má silné meziroční výkyvy v početnosti zřejmě způsobené abiotickými faktory jako jsou srážky a teplota (McCormick *et al.*, 2009).

Z biotopů, kde se druh *C. trifida* vyskytuje častěji nám chybí záznamy fytoocenologických snímků, které by byly diagnostikovány jako údolní jasanovo-olšové luhy, které jsou uvedené jako jeden z hlavních typů biotopů, kde *C. trifida* roste (Jersáková a Kindlmann, 2004). Oba dominantní druhy - *Alnus glutinosa* a *Fraxinus excelsior*- byly sice zapsány v mých fytoocenologických snímcích, ale jejich vyšší pokryvnost byla zaznamenána pouze v jednom z analyzovaných fytoocenologických snímků. Ani biotopy jako mokřadní vrbiny, hercynské dubohabřiny a acidofilní bučiny, ve kterých by se měla *C. trifida* vyskytovat v nízkých frekvencích, nebyly ve vegetačních analýzách diagnostikovány.

*C. trifida* roste v bučinách převážně s dominujícím druhem stromu *Fagus sylvatica*, jehož dominantní pokryvnost řadí k sobě snímky diagnostikované jako květnaté a vápnomilné bučiny. V podmáčených biotopech jsou dominanty sice jasné, ale různily se. Proto tyto biotopy jsou podstatně více rozrůzněné i přes jejich relativně podobné rysy jako je rozvolněnost a vlhkost. Biotop podmáčených smrčín byl evidentně přechodný, což dobře koresponduje jak s našimi výsledky z ordinační metody, tak s výsledky klasifikační analýzy, kde vegetační složení bylo na rozhraní dvou podjednotek - rašelinných brusnicových borů s dominantním druhem *Pinus sylvestris* a rašelinných a podmáčených smrčín s dominujícím druhem *Picea abies*. Podmáčené biotopy jsou charakterizovány tím, že jsou oproti bučinám rozvolněnější.

## 5. Závěr

Druhy hub asociované s *C. trifida* se řadí do dvou rodů, a to *Tomentella* a *Thelephora*.

Mykorhizní houby asociované s mykoheterotrofní orchidejí *C. trifida* netvoří speciální linie vázané na určitý biotop.

Závislost geografické vzdálenosti na genotypové odlišnosti druhu *C. trifida* nebyla zjištěna.

## 6. Seznam použité literatury

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Altekar G, Dwardakas S, Huelsenbeck JP, Ronquist F. (2004) Parallel coupled Markov chain Monte Carlo for bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20: 407- 415.
- Barrett CF, Freudenstein JV. (2008) Molecular evolution of *rbcl* in the myco-heterotrophic coralroot orchids (*Corallorhiza* Gagnebin, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 665-679.
- Barrett CF, Freudenstein JV, Koljalg U, Tylor DL. (2010) Rangewide analysis of fungal associations in the fully mycoheterotrophic *C. striata* complex (Orchidaceae) reveals extreme specificity on ectomycorrhizal Tomentella (Thelephoraceae) across north America. *Am. jour. of Bot.* 97: 628-643.
- Bidartondo MI, Bruns TD, (2001) Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespred phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* 10: 2285-2295.
- Bidartondo MI, Bruns TD. (2005) On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development. *Molecular Ecology* 14 (5): 1549-1560.
- Bidartondo MI, Bruns TD, Weiss M, Sergio C, Read DJ. (2003) Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proceedings of the Royal Society London B*270: 835-842.
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ. (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc. of the Royal Society London B* 271: 1799-1806.
- Bidartondo MI, Read DJ. 2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Mol. Ecol.* 17: 3707-3716.
- Bradbury SM. (1998) Ectomycorrhizas of lodgepole pine (*Pinus contorta*) seedlings originated from southwestern Alberta cut blocks. *Canadian Journal of Botany* 76: 213-217.
- Bradbury SM, Danielson RM, Visser S. (1998) Ectomycorrhizas of regenerating stands of lodgepole pine (*Pinus contorta*). 76: 218-227. *Canadian Journal of Botany* 76: 218-227.
- Brundrett M. (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37-77.
- Burges A. (1939) The defensive mechanism in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 38: 273-283.
- Cameron DD, Preiss K, Gebauer G, Read DJ (2009) The chlorophyll-containing orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through photosynthesis. *New Phytologist*.
- Danielson RM, Zak JC, Parkinson D. (1984) Mycorrhizal inoculum in a peat deposit formed under a white spruce stand in Alberta. *Canadian Journal of Botany* 63: 2557-2560.
- Danielson RM, Pruden M. (1989) The ectomycorrhizal status of urban spruce. *Mycologia* 81:335-341.
- Dickie IA, Xu B, Koide RT. (2002) Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist* 156: 527-535.
- Diez JM, (2007) Hirarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and

- environmental gradients. *Journal of Ecology* 95: 159-170.
- Dykyjová D. (2003) *Ekologie středoevropských orchhidejí*. Nakladatelství Kopp, České Budějovice, 116 str.
- Egerton-Warburton L, Allen MF. (2001) Endo- and ectomycorrhizas in *Quercus agrifolia* Nee. (Fagaceae): patterns of root colonization and effects of seedling growth. *Mycorrhiza* 11: 283-290.
- Ellenberg H, Weber HE, Düll R, Wirth V, Werner W, Paulißen D. 1992. Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. *Scripta Geobot.* 18: 1-248.
- Falk DA, Olwell M. (1992) Restore diversity: strategies for reintroduction of endangered plants.
- Freudenstein JV, Senyo DM, (2008) Relationships and evolution of matK in a group of leafless orchids (Corallorhiza and Corallorhizineae, Orchidaceae, Epidendroideae). *Am. Jour. of Bot* 95: 498-505.
- Gardes M., Bruns TD. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification for mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gebauer G, Meyer M. (2003) N-15 and C-13 natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* 160: 209-223.
- Godt MJW, Johnson BR, Hamrick JL. (1996) Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. *Conservation Biology* 10: 796-805.
- Gryndler M. (2004) *Mykorhizní symbióza- o soužití hub s kořeny rostlin*. Academia, 366 p.
- Guindon S., Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696-704.
- Hadley G, Williamson B. (1972) Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 70: 445-455.
- Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Harley JL, Harley EL. (1987) A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* 105: 1-102 (Suppl)
- Hennekens SM, Schaminee JHJ. (2001) Turboveg, a comprehensive database management system for vegetation data. *Journal of Vegetation Science* 12: 589-591.
- Hill MO. (1979) TWINSPAN- a FORTRAN program for arranging multivariate data in an ordered two-way table by classification of the individuals and attributes. Section of Ecology and Systematics, Cornell university. New York. 90 pp.
- Hudson DH, Bryant D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol* 23: 254-267.
- Chytrý M, Kučera T, Kočí M. (2001). Katalog biotopů České republiky-Interpretační příručka k evropským programům Natura 2000 a Smaragd. AOPK, 304 p.
- Chytrý M, Rafajová M. (2003) Czech National Phytosociological Database: basic statistics of the available vegetation plot data. *Journal Veg. Science* 12:589-591.
- Jacquenym H, Wiegand T, Vandepitte K, Brys R, Roldan-Ruiz I, Honnay O. (2009) Multigenerational analysis of spatial structure in the terrestrial, food-deceiving orchid *Orchis mascula*. *Journal of Ecology* 97: 206-216.

- Jatiová M, Šmiták J. (1996) Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a ve Slezsku. AOPK, 539 p.
- Jersáková J, Malinová T. (2007) Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176: 237-241.
- Jersáková J, Kindlmann P. (2004). Zásady péče o orchidejová stanoviště. Nakladatelství Kopp, České Budějovice, 120 str.
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse M-A. (2005) Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* 160: 639-653.
- Kalina T, Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. UK v Praze, nakladatelství Karolinum.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research* 30: 3059-3066.  
<http://align.bmr.kyushuu.ac.jp/mafft/online/server/>
- Koljalg U. (1996) *Tomentella* (Basidiomycota) and related genera in temperate Eurasia, *Synopsis Fungorum* 9. Fngiflora, Oslo.
- Koljalg U, Larsson K-H, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Hoiland K, Kjoller R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vralstad T, Ursing BM. (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 163: 1063-1068. <http://unite.ut.ee>
- Koljalg U., Dahlberg A., Taylor A.F.S., Larsson E., Hallenberg N., Stenlid J., Larsson K.- H., Fransson P.M., Karén O., Jonsson L. (2000). Diversity and abundance of resupinate theleporoid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests. *Molecular Ecology* 9: 1985-1996.
- Lanave C, Preparata G, Saccone C. *et al.* (1984): A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of molecular evolution* 20: 86-93.
- Leake JR. (1994) The biology of myco-heterotrophic plants. *New Phytologist* 127: 171-216.
- Leake JR (2005) Plants parasitic on fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. *Mycologist* 19: 113-122.
- Maas PJM, (1986) Saprophytes pro parte. Introduction to monographs 40, 41 and 42 of Flora Neotropica.
- Machon N, Bardin P, Mazer SJ, Moret J, Godelle B, Austerlitz F.(2002) Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. *New Phytologist* 157: 677-687.
- Marchisio VP, Berta G, Fontana V, Marzetti MF. (1985) Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization. *New Phytologist* 100: 623-641.
- Martos F, Dulormne M, Pailler T, Bonfante P, Faccio A, Fournel J, Dubois M-P, Selosse M-A (2009) Independent recruitment of saprobic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist*.
- McCormick MK, *et al.* (2004) Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* 163: 425-438.
- McCormick M, Whigham DF, O'Neill JP, Becker JJ, Werner S, Rasmussen HN, Brund TD, Taylor DL. (2009) Abundance and distribution of *Corallorhiza odontorhiza* reflect variations in climate and

ectomycorrhizae. Ecological Monographs 79: 619-635.

McKendrick S.L., Leake J.R., Taylor D.L., Read D.J. (2000). Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature : ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. New Phytologist 145: 523-537.

Nan GL, *et al.* (1997) *Dendrobium* orchids contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes. Physiol.Mol. Plant Pathol. 51: 391-399.

Nieuwdorp PL (1972) Some observations with light and electron microscope on the endotrophic mycorrhiza of orchids. Acta Botanica Neerlandica 21: 128-144.

O'Donnell, K (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, DR, Taylor, JW (Eds.) The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics, CAB International, Wallingford, pp 225–233.

Ogura-Tsujita *et al.* 2009 Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. Proc of the Royal Society London 276: 761-767.

Ogura-Tsujita Y., Yukawa T. (2008). *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan. Mycorrhiza 18: 331-338.

Peakall R, Smouse PE. (2006) Genealex: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology 6:288-295.

Peterson RL, Uetake Y, Zelmer C. (1998) Fungal symbioses with orchid protocorms. Symbiosis 25: 29-55.

Posada D, Crandall KA. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution – Bioinformatics 14: 817-818.

Procházka F. (1980) Naše orchideje, Krajské muzeum Pardubice, 296 p.

Randuška D, Šomšák L, Háberová I. (1983) Barevný atlas rostlin, Nakladatelství Obzor, Bratislava, 638 p.

Rasmussen HN. (1990) Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb.f.) Hunt and Summerhayes (Orchidaceae) during germination in vitro. New Phytologist 116: 137-147.

Rasmussen HN. (1995) Terrestrial orchids. From seed to mycoheterotrophic plant. Cambridge University Press.

Rasmussen HN, Rasmussen FN. (2009) Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. Oikos 118: 334-345.

Read DJ, Kianmehr H, Malibari A. (1977) The biology of mycorrhiza in *Helianthemum* Mill. New Phytologist 78: 305-312 B.

Read DJ, Duckett JG, Francis R, Ligrone R, Russell A. (2000) Symbiotic fungal associations in lower land plants. Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological sciences 355: 815-831.

Redecker D, Kodner R, Graham LE. (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. Science 289 (5486): 1920-1921

Ronquist F, Huelsenbeck JP. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.

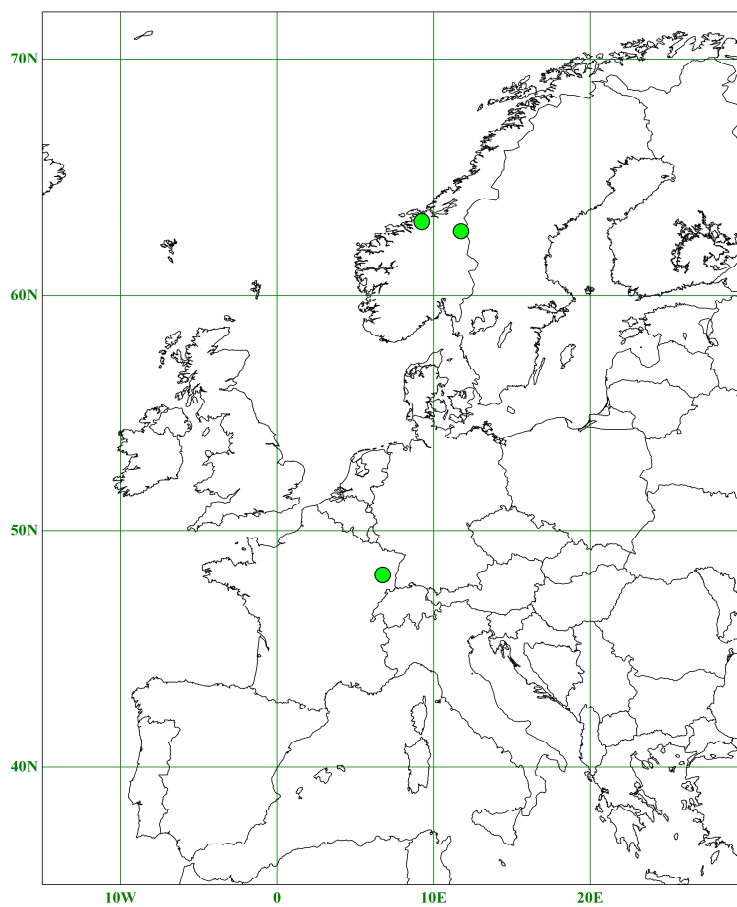
Roy M, Wathana S, Stier A, Richard F, Vesabutr S, Selosse M-A. (2009) Two mycoheterotrophic orchids from Thailand dipterocarpacean forests associate with broad diversity of ectomycorrhizal fungi. BMC Biology 7.

- Selosse MA, Bauer R., Moyersoen B. (2002) Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees in silva: microscopic and molecular evidence. *New Phytologist* 155: 183–195.
- Selosse M-A, Faccio A, Scappatrici G, Bonfante G. (2004) Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* 47: 416-426.
- Senthilkumar S, Krishnamurthy KV. (1998) A cytochemical study on the mycorrhizae of *Spathoglottis plicata*. *Biologia plantarum* 41: 111-119.
- Sharma J, Ishida ML, Yadon VL. (2007) Mycorrhizal diversity of an endemic terrestrial orchid. *Lankesteriana* 7: 215-218.
- Shefferson RP, Taylor DL, Weiss M, Garnica S, McCormick MK, Adams S, Gray HM, McFarland JW, Kull T, Tali K, Yukawa T, Kawahara T, Miyoshi K, Lee Yung I. (2007) The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. *Evolution* 61: 1380-1390.
- Sheeja G, Sharma J, Yadon VL. (2009) Genetic diversity and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Am. Jour. of Bot.* 96: 2022-2030.
- Smith SE, Read DJ. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* Third edition. The University Press, Cambridge. 815 p.
- Swofford DL. (1998) PAUP 4.0 – phylogenetic analysis using parsimony. Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10: 512-526.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Taylor DL, Bruns TD. (1999) Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the cheating orchids *Corallorhiza maculata* and *C.mertensiana*. *Molecular Ecology* 8: 1719-1732.
- Taylor DL, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA. (2003) Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic orchid. *Am. Jour. Bot* 90: 1168-1179.
- Taylor DL, Bruns TD, Hodges S. (2004) Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proc of the Royal Society B* 271: 35-43.
- Taylor DL, McCormick MK. (2008) Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytol.* 177: 1020-1033.
- Tedersoo L, Koljalg U, Hallenberg N, Larsson KH. (2003) Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist*: 159: 153-165.
- Technelysium Pty Ltd. 2007. ChromasPro, version 1.41. [www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au).
- ter Braak CJF, Šmilauer P, (2002). *Canoco reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)*. Microcomputer Power, Ithaca.

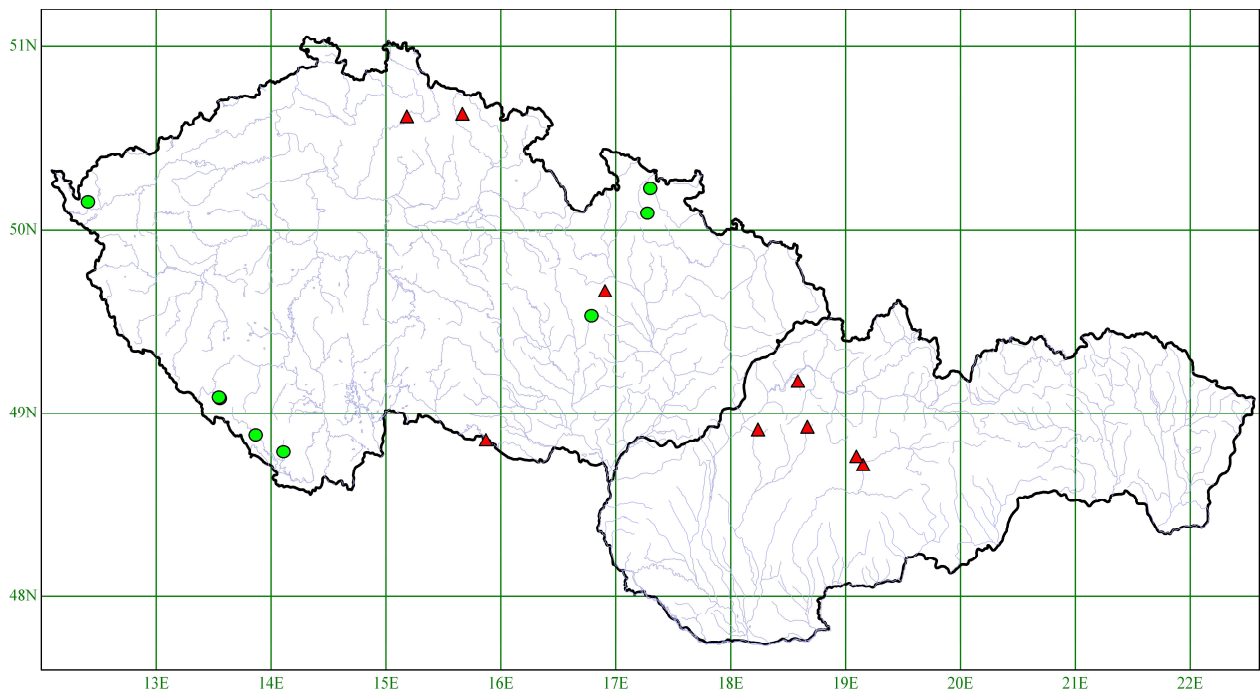


- Tichý L. (2002) Juice: software for vegetation classification . *Journal Veg. Sci* 13:451-453.
- Umata H, (1998) A new biological function of shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, in a mycoheterotrophic orchid, *Erythrorchis ochobiensis*. *Mycoscience* 39: 85–89.
- Vachrameeva MG, Tatarenko IV, Varlygina TI, Torosyan GK, Zangulskii MN. (2008) *Orchids of Russia and adjacent countries*. ARG Gartner Verlag KG. 690 p.
- van der Heijden MGA, Horton TR (2009) Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97: 1139-1150.
- Barrett (2010) *Rangewide*
- Wang X, Bauw G, van Damme EJJ, Peumans WJ, Chen ZL, van Montagu M, Angenon G, Dillen W. (2001) Gastrodin-like mannose-binding proteins: a novel class of plant proteins with antifungal properties. *Plant Journal* 25: 651-661.
- Weiss M, Selosse M-A, Rexer KH, Urban A, Oberwinkler F. (2004) Sebaciniales: a hitherto overlooked class of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological research* 108: 1003-1010.
- Wu B, Nara K, Hogetsu T (2002) Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia. *Mycorrhiza* 12: 83-88.
- Xu J, Ran X, Guo S. (1989) Studies of a life cycle of *Gastrodia elata*. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* 11: 37- 241.
- Zelmer CD, Currah RS (1995) Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae). *Canadian Journal of Botany* 73: 862-866.
- Zimmer K, Meyer C, Gebauer G (2008) The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial mycoheterotroph. *New Phytologist* 178: 395-400.

## Přílohy



Obrázek 7. Zelené body značí umístění lokalit ve středním Norsku a ve Francii. Mapa byla vytvořena v programu D-map for Windows verze 7.2.



Obrázek 8. Rozmístění studovaných lokalit v ČR a SR. Červeně vyznačené body jsou bučinové lokality a zeleně vyznačené body jsou podmáčené lokality.

#### Snímky studovaných lokalit

číslo snímku	Lokalita
1	Hardegg
2	Rakousy
3	Krk-Peklo
4	Omšenie
5	Súlov
6	Špraněk
7	Zhůří1
8	Dobrá
9	SOOS
10	Rejvíz
11	Olšina
12	Bělá
13	Vidly
14	Zhůří2
15	Klačno
16	BB- Hviezdáreň
17	BB-Podlavické Výmole

#### Snímky z Nár.fytocenologické databáze

číslo snímku	Lokalita
18	NPR Býčí skála
19	NPR Karlovske bučiny
20	Světlá pod Ještědem
21	Moravský kras
22	Doksy
23	Doksy-Mimoň
24	Lenora
25	Borová Lada 1
26	Borová lada 2
27	PR mokřady pod Vlčkem
28	České středohoří
29	Ještědské pohoří
30	Kalivodské údolí

Tabulka 4. Názvy všech lokalit, ze kterých byly zapsány fytocenologické snímky a jejich rozdělení.

Tabulka 5. Zápisy fytoocenologických pořizování z našich lokalit a snímky poskytnuté z fytoocenologické databáze. Vysvětlivky písmena a čísel v druhém sloupci: V- vrstva porostu, 1- stromové patro, 4- keřové patro, 6- bylinné patro, 7- semenáčky stromů.

Název druhu	V	27	8	10	7	9	26	25	12	11	24	14	13	23	22	28	18	21	20	30	29	19	6	2	16	5	17	4	3	15	1					
Acer campestre	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	+	r	+	.	r	r					
Acer platanoides	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	+	.	.	1					
Acer pseudoplatanus	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	r	r	.	.	+	.	+					
Ajuga genevensis	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r					
Alnus glutinosa	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4					
Anemone ranunculoides	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
Asarum europaeum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	r	.	1					
Brachypodium sylvaticum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	1	2	.	r	.	.	.	.	.	+						
Carex digitata var. digitata	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	2	.	.	r	.	.	+	+	.	.	.	.	.	+					
Carex pilosa	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1					
Carpinus betulus	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Cephalanthera damasonium	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	+	+	+	.	.	+	+	.	1	r	.	+	r					
Convallaria majalis	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
Corallorhiza trifida	6	r	+	+	+	+	r	r	+	+	r	+	+	1	r	+	+	+	+	+	+	+	r	+	r	+	r	r	+	+	+					
Cyclamen purpurascens	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+				
Cypripedium calceolus	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Dactylis polygama	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Daphne mezereum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r					
Fagus sylvatica	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	2	1	1	1	+	1	.	+				
Fragaria vesca	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	r	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Galium odoratum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	2	1	2	1	1	1	.	.	.	.	.	.	.	.	r	1				
Galium sylvaticum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	r	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Hepatica nobilis	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+					
Heracleum sphondylium	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Lathyrus vernus	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	r	+	+	1	.	1	.	.	.	.	.	+	.	+					
Maianthemum bifolium	6	.	.	.	.	.	.	.	1	.	2	+	1	1	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	1					
Melica nutans	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	.	2	+	.	+	2	.	.	r	.	.	.	.	.	.	+					
Melittis melissophyllum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	r					
Mercurialis perennis	6	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	.	.	.	.	+	1	2	2	+	2	2	r	.	+	.	1	1	.	+					
Paris quadrifolia	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	.	1	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	r					
Phyteuma spicatum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Polygonatum odoratum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r					
Primula elatior	6	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Pulmonaria obscura+officinalis	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1					
Quercus petraea agg.	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	r					
Sanicula europaea	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	2	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Senecio ovatus	6	.	.	.	.	.	.	.	.	r	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	+	.	.	.	.	.	.	.	+					
Symphytum tuberosum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Tilia cordata	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3					
Ulmus minor	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Viola odorata	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r					
Avenella flexuosa	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	r	+	+	.	r	.	.	.	.	.	.	.					
Fagus sylvatica	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	.	.	.	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5	.					
Fragaria species	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	.	.	.				
Fraxinus excelsior	6	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
Hieracium murorum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	2	+	2	.	+	3	1	.	+	+	r	.	r	+	.	.					
Ligustrum vulgare	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+					
Rubus species	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	.	r	.				
Sorbus aucuparia	6	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	+	.	.				
Viola hirta	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	r	.	.	.	.	.	.				
Actaea spicata	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	1	+	.	+	+	+	.	.	.	.	.	+	1	.	.				
Dentaria enneaphyllos	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.				
Hedera helix	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.			
Oxalis acetosella	6	.	.	.	.	.	.	2	.	2	2	1	2	2	.	.	.	+	.	+	1	2	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.				
Polygonatum verticillatum	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.			
Prenanthes purpurea	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	2	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.		
Prunus avium	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	+	.	.	.			
Viola reichenbachiana	6	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.	.	.	.	+	+	1	.	1	2	.	.	.	.	.	.	+	1	.	.	.			
Campanula rapunculoides	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	1	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.		
Cornus mas	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	.		
Cornus mas	4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	
Fraxinus ornus	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	.	.	.	
Hacquetia epipactis	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	
Sorbus aria	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.
Viburnum lantana	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	r	.	r	.	.	.	.
Carex alba	6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.









