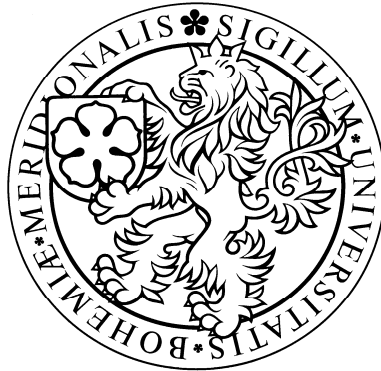


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

**Vliv abiotických a biotických faktorů
na polymorfismus barvy květů u *Dactylorhiza
sambucina* (Orchidaceae)**

Bc. Markéta Kremlová

Školitelka: RNDr. Jana Jersáková, PhD.

České Budějovice 2010

Kremlová M., 2010: Vliv abiotických a biotických faktorů na polymorfismus barvy květů u *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae) [The effect of abiotic and biotic factors on corolla colour polymorphism in *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae), Mgr. Thesis, in Czech] – 46 p., Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: The European rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* commonly produces yellow- and purple-flowered individuals in frequencies that in different populations range from balanced to very unbalanced ones (we can find even monochromatic populations). I studied an effect of abiotic factors (soil pH, hydrolimits, slope and altitude of the locality), biotic factors (weight and viability of the seeds obtained from crossing between and within morphs) and the size of the populations on corolla colour of two morphs in European populations (the Czech Republic, Italy, Austria, Germany, France).

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 30. 4. 2010

.....
Markéta Kremlová

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat mé školitelce Janě Jersákové za odborné vedení této práce, za konzultace, pomoc při vyhodnocování dat a čas, který mi věnovala. Dále mé konzultantce Ivě Schödelbauerové za veškerou pomoc a spolupráci. Děkuju všem, na které jsem se během práce obracela s dotazy a kteří přispěli ke vzniku této práce.

Velký dík patří mým rodičům za finanční i psychickou podporu.

Obsah:

1 Úvod	1
2 Metodika	8
2.1 Charakteristika studovaného druhu	8
2.2 Popis lokalit.....	9
2.2.1 České lokality.....	9
2.2.2 Zahraniční lokality	10
2.3 Metodika sběru dat.....	12
2.3.1 Zjišťované charakteristiky na lokalitách a odběr půd	12
2.3.2 Stanovení pH půd	12
2.3.3 Stanovení hydrolimit půd	12
2.3.4 Ruční opylování	13
2.3.5 Zjištění kvantity semen	14
2.3.6 Zjištění vitality semen pomocí tetrazoliového testu.....	14
2.4 Zpracování dat.....	15
3 Výsledky	18
3.1 Váha semen	18
3.1.1 Vliv křížení barevných forem na váhu semen.....	18
3.1.2 Meziroční variabilita ve váze semen vzniklých z křížení barevných forem	19
3.2 Životoschopnost semen – podíl semen s vyvinutým embryem.....	20
3.2.1 Vliv křížení barevných forem na podíl semen s vyvinutým embryem	20
3.2.2 Meziroční variabilita v podílu semen s vyvinutým embryem vzniklých z křížení barevných forem.....	22
3.3 Životoschopnost semen – podíl vitálních semen.....	22
3.3.1 Vliv křížení barevných forem na podíl vitálních semen	22
3.3.2 Meziroční variabilita v podílu vitálních semen vzniklých z křížení barevných forem	24
3.4 Vliv velikosti populace na zastoupení barevných forem v evropských populacích.....	25
3.5 Vliv zkoumaných abiotických faktorů na různé zastoupení barevných forem v populacích	26
3.5.1 Vliv pH půdy na zastoupení barevných forem v evropských populacích.....	26
3.5.2 Rozdíl v pH půd odebraných u žlutých a u červených jedinců ve vybraných evropských populacích.....	28
3.5.3 Vliv všech vybraných environmentálních proměnných na zastoupení barevných forem v českých populacích.....	28
4 Diskuze	30
4.1 Vliv křížení barevných forem na jejich frekvenci v populacích	30
4.2 Vliv abiotických faktorů na frekvenci barevných forem v populacích.....	32
4.3 Vliv velikosti populace na barevnou odchylku 1:1.....	33
4.4 Alternativní netestované hypotézy.....	34
5 Závěr	35
6 Literatura	36
7 Přílohy	43

1 Úvod

Polymorfismus je v přírodě velmi častým a nápadným jevem, který hraje významnou roli v celé řadě ekologických, etologických i evolučních dějů jak u rostlin, tak u živočichů (Weiss 1995, Bond 2007), proto bývá nezdědkou předmětem přírodovědeckého zájmu. Vysoký výskyt polymorfismu nalezneme v nejpočetnější rostlinné čeledi, kterou je čeleď *Orchidaceae* s cca 30 tisíci druhy (Dressler 1993), a tak se vstavačovitě rostliny hojně stávají modelovými organismy pro výzkum celé řady biologických souvislostí spojených s tímto jevem.

U krytosemenných rostlin se genetický polymorfismus projevuje např. ve tvaru listů (heterofylie, *Hedera*) a jejich velikosti (anizofylie, *Thymus*), ve vzhledu semen (*Pisum sativum*) a velmi často v barvě květů (nebo, což je méně časté, v barvě samotného korunního plátku, např. ve velikosti a barevnosti jednotlivých plošek nebo teček, jako je tomu v rodě *Ipomoea*, kde za tímto polymorfismem stojí mobilní genetické elementy (Clegg & Durbin 2000)). Polymorfismus v barvě květu je jevem, který se vyskytuje v přírodních populacích rostlin ve dvou variantách – buď jako polymorfismus kontinuální, nebo diskrétní. U kontinuálního polymorfismu můžeme pozorovat jednotlivé kontinuální barevné přechody u květů v rámci jednoho druhu a populace jako např. u druhů *Digitalis purpurea*, *Vicia sepium* a *Cirsium palustre* (Warren & Mackenzie 2001). Z čeledi *Orchidaceae* tento druh polymorfismu vykazuje např. madagaskarská orchidej *Polystachya rosea* (Pettersson & Nilsson 1993) (květy od tmavě červené po bílou s přechody přes žlutou a fialovou barvu), z českých orchidejí např. *Dactylorhiza maculata* a *Orchis morio* (v obou případech různé odstíny fialové přes růžovou po bílou barvu) (Průša 2005). Narozdíl od kontinuálního polymorfismu se diskrétní varianta tohoto jevu projevuje existencí dvou zcela odlišných barevných forem, jako v případě mnou zkoumaného organismu *Dactylorhiza sambucina* (prstnatec bezový), kdy se jedná o formu žlutou a nachově červenou. Stejný typ polymorfismu květních barev vykazuje celá skupina druhů z okruhu *D. sambucina*, a to *D. markusii*, *D. flavescens* a *D. romana*, stejně tak bychom za diskrétní polymorfismus mohli považovat výskyt dvou variet druhu *Dactylorhiza incarnata* (Delforge 2006). Polymorfismus v barvě květu často souvisí s různými opylovacími mechanismy a přítomností tzv. šálivých květů (Jersáková et al. 2006a).

Jako šálivé označujeme květy bez nektaru, vyskytující se u více jak třetiny orchidejí (Renner 2006). Tento typ květů je podvodným prostředkem, jak přilákat hmyzí pozornost, protože nenabízejí opylovačům za přenos pylu žádnou odměnu v podobě energeticky cenného zdroje. Pylová zrna orchidejí se nacházejí ve shlucích v prašnickovém útvaru, tzv. brylce, která

se nalepí na tělo opylovače (Dykyjová 2003), a ten není schopen jednotlivá pylová zrna z brylek získat a využít (Nilsson 1992, Johnson & Edwards 2000). Decepcce je u orchidejí pravděpodobně primitivním znakem, zatímco mutualismus se zřejmě z takových podvodných jevů opakovaně vyvinul (Smithson 2009). Existují dvě základní hypotézy o tom, jak klamání opylovačů může zvýšit reprodukční úspěšnost rostlin: (i) přerozdělení energie, která se jinak vkládá do výroby nektaru, ve prospěch květů a produkce semen a (ii) vyšší míra cizosprašení díky tomu, že opylovači na rostlině bez nektaru stráví méně času a navštíví méně květů (Jersáková et al. 2006a, Jersáková & Johnson 2006). Brylky hrají obecně velmi významnou roli u deceptivních druhů, protože ačkoliv je nalezneme u všech orchidejí, deceptivní druhy by se v této čeledi nemohly vyvinout v takové míře, pokud by tyto pylové útvary nezaručovaly vysokou účinnost přenosu. Ta je velmi důležitá z toho důvodu, že šálivé květy jsou navštěvovány opylovači v méně než je tomu u květů rostlin produkujících nektar. Účinnost přenosu pylu orchidejí na bliznu jiného květu svého druhu je díky tomu, že se vyskytuje v brylkách, zhruba 10-37 %, zatímco u rozsypavého pylu to je pouze 1 % (Harder 2000). Další výhodou proti rozsypavému pylu má tento kompaktní lepivý útvar v tom, že není nutná stálost opylovačů v rámci jednoho druhu, protože poté, co se jednou brylka nalepila na tělo opylovače, může dojít k opylení i za delší čas, což se stává díky tendenci opylovačů vzdalovat se od míst, kde se nachází deceptivní květy (Renner 2006). To, že může docházet k transportu pylu na větší vzdálenost a opylovač navštíví méně květů v rámci rostliny, je pro deceptivní orchideje velkým přínosem, protože se takto snižuje možnost geitonogamie (de Jong et al. 1993), a tedy i inbrední deprese, o jejíž existenci u prstnatce bezového existují důkazy (Juillet 2007). I přestože jsou druhy bez nektaru navštěvovány opylovači méně, mohou se ve své reprodukční úspěšnosti vyrovnat druhům s nektarem, a to díky tomu, že na rozdíl od těchto druhů maximalizují kvalitu semen (Neiland & Wilcock 1998, Tremblay et al. 2005, Jersáková et al. 2006a).

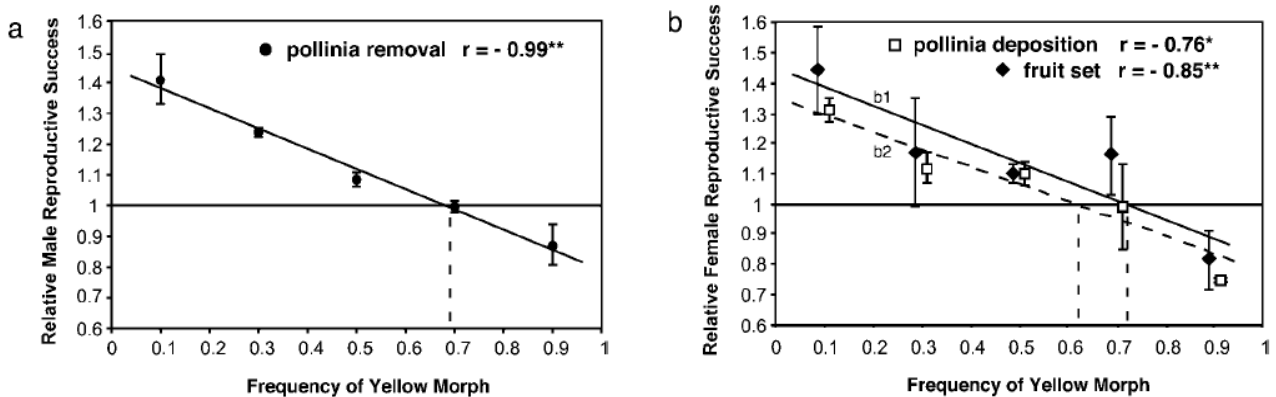
Orchideje s šálivými květy využívají k vábení opylovačů různé alternativní strategie, jako je například napodobování hmyzích partnerek (Kullenberg 1961) tzv. pseudokopulace, imitování druhů nabízejících odměnu (tzv. potravních modelů, Batesovo mimikry, Roy & Widmer 1999, Johnson 2000) nebo využívají všeobecné podobnosti s potravními zdroji („generalized food-deception“, Dafni 1986), jako je tomu v případě mého modelového organismu. Většina druhů využívající všeobecné podobnosti s potravními zdroji kvete hromadně brzy na jaře, většinou o něco dříve než rostliny produkující nektar (Kindlmann & Jersáková 2006, Internicola et al. 2008), a jsou opylovány převážně nově se líhnoucími jedinci různých druhů blanokřídlých (Dafni 1984, Ackerman 1986, van der Cingel 1995).

Proto se zdá, že všeobecná podobnost rostlin bez nektaru s potravními zdroji může fungovat jako selektivní činitel pouze za určitých ekologických podmínek, protože tyto druhy spoléhají spíše na naivitu mladých jedinců hmyzu (Gigord et al. 2002). Předpokládá se, že tato skutečnost úzce souvisí s vysokou mírou polymorfismu barvy květů v populacích deceptivních orchidejí. Byla zjištěna větší reprodukční úspěšnost těchto druhů, pokud je populace polymorfní v barvě květu (Pellegrino et al. 2008, Dormont et al. 2010). Polymorfismus deceptivních druhů zřejmě tedy primárně slouží ke zpomalení procesu učení, při kterém se opylovači naučí vyhýbat pro ně energeticky bezcenným květům (Heinrich 1975, 1983, Real et al. 1990), proto je na místě se domnívat, že možná cesta k udržení stabilního polymorfismu v barvě květů u vstavačovitých, vede skrze opylovače.

Jedna z teorií, která vysvětluje, jak je barevný polymorfismus prstnatce bezového udržován a která souvisí v tomto případě s opylovači, je selekce závislá na frekvenci, neboli také frekvenčně závislá selekce (frequency dependent selection, Ridley 1996). Polymorfismus bývá ve většině případů podmíněn geneticky, a to přítomností dvou či více variant alel jednotlivých genů. Za předpokladu, že všechny organismy jsou vystaveny neustálému působení přirozeného výběru a všechny alely jsou z hlediska evoluční zdatnosti rovnocenné, dalo by se očekávat, že nejvýhodnější alela by mohla vytlačit ty, které jsou v dané situaci zrovna méně hodnotné. Selektce závislá na frekvenci by však mohla být v tomto případě mechanismem schopným takovému jevu zabránit (Flegr 2005). Tento typ selekce může udržovat polymorfismus, pokud selekční hodnota určité alely negativně koreluje s její frekvencí. To znamená, že čím vzácnější je alela v populaci, tím je větší zdatnost jejich nositelů. V případě prstnatce bezového by mohla selekce negativně závislá na frekvenci fungovat následujícím způsobem.

Podle této teorie opylovač dává přednost méně častému barevnému fenotypu. Těmito opylovači jsou především královny čmeláků (Nilsson 1980), které poté, co naleznou květy bez nektaru, ve snaze vyhnout se těmto šálivým květům navštíví květ jiné barvy stejného druhu, a takto zvýší reprodukční úspěšnost rostlinám se vzácnějším fenotypem. Každá barevná varianta by tedy měla ve své reprodukční úspěšnosti vykazovat negativní závislost na hustotě jedinců druhé barevné formy. Četnosti jednotlivých barevných forem v rámci populace by se tak měly časem obrátit ve prospěch toho fenotypu, který byl předtím vzácnější, tudíž by frekvence fenotypů měly oscilovat v čase kolem určitého rovnovážného stavu, který představuje situaci, kdy jsou obě barevné formy zastoupeny stejným počtem jedinců (Gigord et al. 2001).

Tuto teorii se podařilo prokázat v manipulativním experimentu s prstnatcem bezovým, kdy jednotlivé rostliny obou barevných forem byly přesazeny do květináčů, ze kterých byly vytvořeny umělé populace s pravidelným rozmístěním rostlin (Gigord et al. 2001). V takto vytvořených populacích byla měněna frekvence obou barevných forem, hustota rostlin byla konstantní. Výsledky experimentu potvrzují fungování selekce negativně závislé na frekvenci v takto vytvořených populacích, kdy se samčí (odnos brylek z květu) i samičí reprodukční úspěch (příjem brylek a tvorba semeníků) dané barevné formy zvětšoval se snižující se frekvencí této formy v populaci (Obr. 1). Frekvence žluté formy představující rovnovážný stav v tomto experimentu byla 61%. Tento výsledek se přibližně rovná průměrné frekvenci žluté formy nalezené u 174 přírodních populací (Gigord et al. 2001), což by mohlo být dáno vrozenou preferencí opylovačů v dané oblasti pro žlutou barvu rostlin (Smithson & Macnair 1997).



Obr. 1 Relativní samčí (a, odnos brylek) a samičí (b, depozice brylek a produkce semeníků) reprodukční úspěšnost žluté formy prstnatce bezového závislá na frekvenci žluté formy v uměle vytvořených populacích. (Převzato z Gigord et al. 2001)

Přestože byl mechanismus selekce negativně závislé na frekvenci v případě modelového organismu prstnatce bezového potvrzen v uměle vytvořeném experimentu, stále postrádáme přesvědčivé důkazy o jeho roli v přírodních populacích tohoto druhu (Pellegrino et al. 2005a, Kropf & Renner 2005, Jersáková et al. 2006b), stejně tak v populacích jiných druhů deceptivních orchidejí vykazujících polymorfismus v barvě květu (Koivisto et al. 2002, Aragón & Ackerman 2004, Dormont 2010). Je také možné, že se tento typ selekce projevuje až při velmi velkém vychýlení poměru barevných forem (Smithson 2001, Jersáková et al. 2006b).

Přestože o tomto problému bylo zjištěno už poměrně mnoho, stále neznáme všechny souvislosti, kterými bychom uměli popsat změny ve fenotypovém složení různých populací tohoto druhu, které se v rámci Evropy velmi různí ve frekvencích jednotlivých barevných forem na lokalitách. Tato skutečnost napovídá tomu, že v přírodních populacích zřejmě situaci komplikují i jiné faktory, vlivy a mechanismy, které se podílí na ovlivňování fenotypového zastoupení.

1) Prvním z těchto faktorů by mohlo být chování opylovačů, které není tak jednoduché, jak by se mohlo zdát. Potravní chování opylovačů ovlivňují i druhy rostlin obsahující nektar, které kvetou společně s prstnatcem bezovým na lokalitách, jejichž převládající barva by mohla určovat barevné preference opylovačů (Nilsson 1980). Opylovači mají sklon navštěvovat takové barevné formy deceptivních rostlin, které se nejvíce podobají květům s nektarem, na kterých se nejčastěji zdržují (Heinrich 1979, Gumbert & Kunze 2001, Gigord et al. 2002, Johnson et al. 2003). To znamená, že například opylovač, který je zvyklý létat na žlutě kvetoucí rostliny obsahující nektar, bude směřovat svou další návštěvu na jinou žlutě kvetoucí rostlinu, ale dopředu netuší, že ta mu nic nenabídne. Takto dojde k přenosu pylu mezi žlutými formami prstnatce bezového, dokud se opylovač nenaučí šálivé květy rozpoznávat, nebo se nezaměří na květy jinak barevné. U prstnatce bezového existují dokonce tzv. dvojnásobné květní mimikry, pokud kvete na stanovišti společně s dalším polymorfním druhem, který produkuje nektar a má obdobně barevné formy. Tak tomu je na lokalitách v jižní Itálii, kde prstnatec bezový kvete společně s *Viola aethnensis* (žluté a modré formy) a relativní úspěšnost obou barevných forem prstnatce bezového je větší v přítomnosti tohoto polymorfního druhu (Pellegrino 2008). Potom je možné, že by nevyvážené frekvence barevných forem v přírodních populacích prstnatce bezového mohly být dány různými poměry rostlin nabízejících nektar a kvetoucích společně s touto orchidejí na lokalitách. Ovšem potravní chování hmyzu může být ovlivněno i faktory, jako jsou hustota a prostorové rozmístění jak rostlin obsahujících nektar, tak těch bez něj (Internicola et al. 2006, Internicola et al. 2007) a svou roli hraje také proces učení (Dukas & Real 1993, Smithson & Macnair 1996, Ferdy et al. 1998, Internicola et al. 2009).

2) U populací s výrazně vychýleným poměrem barevných forem se nabízí teorie genetického driftu (Lack & Kay 1988). Orchideje bez nektaru mívají malou efektivní velikost populace díky malému reprodukčnímu úspěchu (Tremblay et al. 2005) a dohromady s omezenou výměnou genetického materiálu (pylu) mezi jednotlivými populacemi, je pravděpodobné, že by to mohlo vést k tomuto jevu. Neměli bychom ani zapomenout na efekt hrdla lahve a zakladatele a také inbrední depresi, což jsou jevy objevující se v malých

populacích (Primack et al. 2001). Efekt velikosti populace na barevnou odchylku 1:1 byl ale testován s negativním výsledkem (Jersáková et. al 2006b).

3) Jiné studie předpokládají existenci reprodukčních bariér po opylení (Pellegrino et al. 2005b), které by mohly hrát roli v reprodukční úspěšnosti jednotlivých forem a tedy ovlivňovat fenotypové složení následujících generací. Touto možností se zabývala i studie Jersákové et al. (2006b), na kterou částečně navazuje tento experiment. Z výsledků ručního opylovacího experimentu, který byl proveden na prstnatci bezovém u dvou populací na Vsetínsku vyplynulo, že žlutá forma měla menší váhu semeníků i jednotlivých semen, než forma červená, bez ohledu na způsob opylování (opylování v rámci a mezi barevnými formami), a že podíl semen s vyvinutým embryem a podíl vitálních semen byl průkazně nižší u žlutých rostlin. Z výsledků vyplývá snížená vitalita žlutých rostlin na obou lokalitách, která by mohla vysvětlit převahu červené formy ve vsetínských populacích. Podobně Juillet et al. (2007) uvádí menší reprodukční úspěšnost a větší inbrední depresi červené formy (výsledky z ručního opylování a následného klíčení), zejména v populacích, kde převládá žlutý fenotyp.

Pro plné pochopení mechanismů udržujících polymorfismus by bylo vhodné znát principy genetické dědičnosti barevných fenotypů, zatím ale postrádáme jakékoli znalosti o dědičnosti barev květů prstnatce bezového.

4) Jinou teorií, která by mohla vysvětlovat různé fenotypové zastoupení prstnatce bezového v evropských populacích, je ovlivňování proporčního zastoupení jednotlivých barevných forem místními ekologickými faktory. Je známo, že pH může mít vliv na zbarvení okvětních lístků anthokyanovými barvivy, kdy by se v zásaditém prostředí měly tvořit tmavěji zbarvené květy (červené) zatímco v kyselém světlejší odstíny (modrá) (Goto & Kondo 1991, Yoshida et al. 2003). Je možné, že žlutá barva květů prstnatce bezového vzniká tím, že anthokyanová barviva jsou v kyselém prostředí překryta karotenovými. Teorii o vlivu půdní reakce podporuje výskyt monochromních žlutých populací prstnatce bezového v Německu, které se vyskytují na silně kyselých půdách (S. Renner, osobní sdělení).

Víme ale také, že mnoho rostlin více syntetizuje anthokyanová barviva jako odpověď na různé environmentální podmínky jako je změna teploty nebo stres způsobený nedostatkem dusíku (Bonguebartelsman & Phillips 1995, Oren-Shamir & Levi-Nissim 1997). Warren a Mackenzie (2001) uvádí, že více anthokyanových barviv se tvoří v rostlinách vystavených stresu suchem. Schemske a Bierzychudek (2001) diskutují možný pleiotropní efekt u bíle zbarvených jedinců polymorfní rostliny *Linanthus parryae*, kdy bílé formy mají menší reprodukční úspěšnost v letech s malým množstvím srážek. Bílé kvetoucí jedinci této jednoleté pouštní rostliny koncentrují ve svých tkáních více hořčíku a selenu (potenciálně

toxických kationtů), než modré formy, proto se jim daří lépe v letech, kdy více prší a kdy tyto látky mohou být vyplaveny z půdy. Modré formy, aby se vyhnuly příjmu nežádoucích látek, všeobecně redukuje příjem iontů, což se pro ně stává nevýhodou v letech s větším srážkovým úhrnem, kdy se u nich snižuje i příjem prospěšných minerálů jako vápníku a fosforu.

Je také možné, že by se jednotlivé barevné formy polymorfních rostlin různily ve své reprodukční úspěšnosti díky tomu, že je produkce anthokyanů pro rostliny z energetického hlediska nákladná (Atanassova et al. 1997, Warren & Mackenzie 2001), což by mohlo vysvětlit různé fenotypové složení evropských populací prstnatce bezového. Tak by mohl být polymorfismus v barvě květu považován spíše za možnost nebo nemožnost rostlin syntetizovat anthokyanová barviva, založenou na heterogenitě prostředí a schopnosti tolerance stresových podmínek.

Cílem, této práce je ověřit některé z těchto hypotéz a přispět k objasnění mechanismů, které se podílí na udržování polymorfismu v barvě květu u druhu *Dactylorhiza sambucina* (prstnatce bezového) a které by zároveň mohly vysvětlit různé proporční zastoupení barevných forem ve vybraných evropských populacích (Česká republika, Itálie, Rakousko, Německo, Francie).

Konkrétní cíle práce jsou:

- 1) ověřit vliv křížení barevných forem na jejich frekvenci v populacích na větším počtu lokalit, ve více sezónách a přes větší geografický areál, než tomu bylo ve studii Jersákové et al. (2006b),
- 2) zhodnotit vliv abiotických faktorů (půdního pH, půdních hydrolimit, sklonu a nadmořské výšky stanoviště) na frekvenci barevných forem v populacích,
- 3) posoudit vliv velikosti populace na frekvenci barevných forem v populacích.

2 Metodika

2.1 Charakteristika studovaného druhu

Dactylorhiza sambucina (L.) Soó (prstnatec bezový) z čeledi Orchidaceae je evropský druh, jehož areál rozšíření sahá od Skandinávie až do horských oblastí Středozeří. Na východ se vyskytuje po Kavkaz, Turecko a Írán. V Evropě není jeho oblast výskytu spojitá, nenalezneme ho na většině ostrovů, v severozápadní Evropě (Island, Britské ostrovy, Holandsko, převážná část SZ Francie), dále v jižním Španělsku a Velké uherské nížině (Procházka 1980, Baumann et al. 2009).

Jedná se o druh náročný na světlo, proto jeho stanovišti jsou převážně travnaté porosty, ojediněle křoviny, vzácně listnaté lesy. Vyskytuje se spíše na sušších místech, a to nejvíce v podhorských a horských oblastech (Procházka & Velisek 1983, Průša 2005). Konkrétními biotopy, na kterých se prstnatec bezový vyskytuje, jsou mezofilní ovsíkové louky, poháňkové pastviny, podhorské a horské smilkové trávníky, širokolisté suché trávníky, acidofilní suché trávníky a vzácně acidofilní teplomilné doubravy (Jersáková & Kindlmann 2004).

Roste převážně na půdách s kyselou reakcí (pH 5,2-6,8) (Procházka & Velisek 1983), přesto můžeme některé populace nalézt i na lokalitách s karbonátovým podložím (vápence, opuky, flyš) (Jersáková & Kindlmann 2004). Průša (2005) uvádí, že druh roste nejčastěji na bázemi bohatších ale nevápenných, humózních i kamenitých půdách, zatímco Jatiová a Šmiták (1996) zmiňují půdy hlinitopísčité, neutrální až středně kyselé.

Rostliny dorůstají výšky 10-20(-30) cm, čímž se tento druh řadí mezi naše nejmenší prstnatce. Přímá lodyha nese 4-6 listů, které jsou světle zelené, beze skvrn a nedosahují k bázi poměrně hustého vejčitého květenství. Větší květy vyrůstají z paždí bylinných kopinatých listenů (Procházka & Velisek 1983). Jedná se o tzv. šálivé květy, které nenabízí opylovačům za jejich servis žádnou odměnu, a vykazují barevný polymorfismus – v populacích se vyskytují společně formy žluté a nachově červené. Vzácně můžeme najít i rostliny s květy barvy růžově lososové, které zřejmě představují hybridy mezi oběma formami. Tyto dvě formy se kromě barvy květů neliší v žádné jiné charakteristice jako např. ve výšce rostliny, počtu listů, počtu květů a jejich velikosti, a pokud je známo, tak ani ve vůni (Nilsson 1980, Gigord et al. 2001, 2002, Kropf & Renner 2005, Pellegrino et al. 2005a). Avšak některé experimenty dokazují, že vůně květu není stěžejním vodítkem pro čmeláky opylující tyto šálivé květy, kteří raději dávají přednost barvě před ostatními květními charakteristikami (Gumbert & Kunze 2001). Frekvence barev v jednotlivých evropských populacích jsou velmi

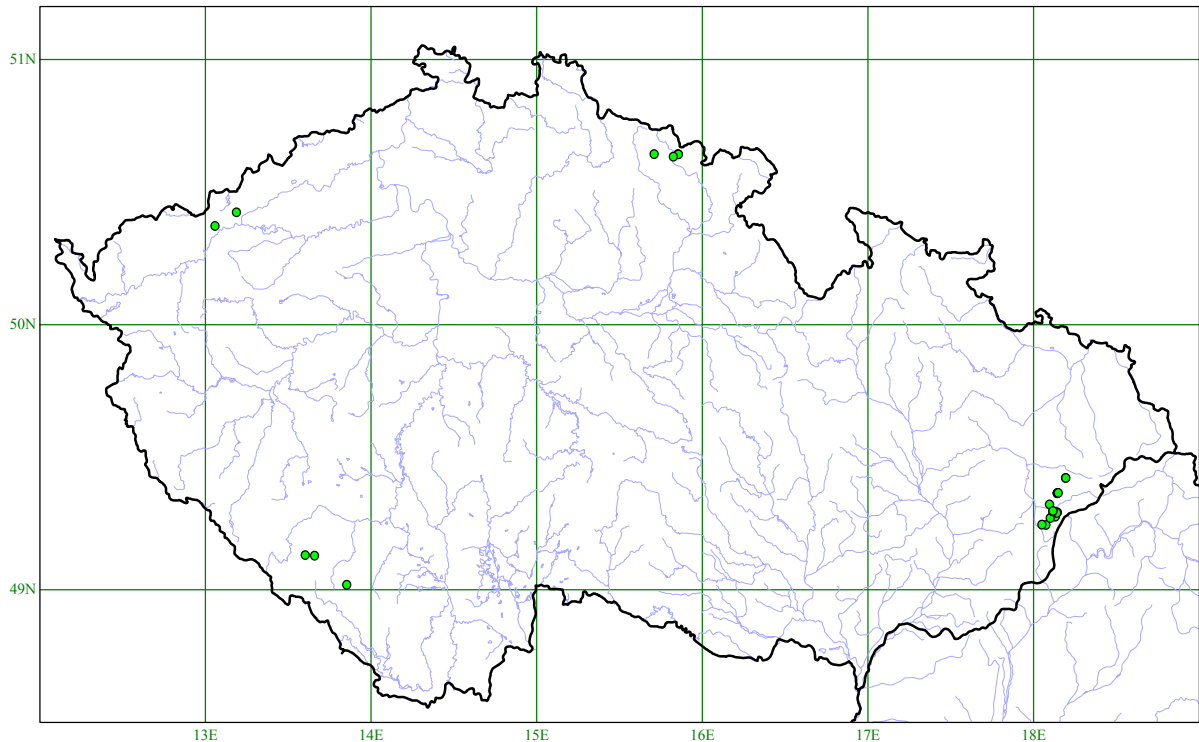
různé, nalezneme populace barevně vyvážené, ale i zcela jednobarevné (Nilsson 1980, Gigord et al. 2001, 2002, Pellegrino et al. 2005a, Kropf & Renner 2005). Pylová zrna vznikají v tetradách, ty jsou spojeny v hrudky (masuly), které tvoří tzv. brylku, která je přenášena hmyzem. Plodem je tobolka s velkým množstvím malých semen, která jsou šířena větrem. Na celkové výživě dospělých rostlin tohoto druhu se velmi uplatňuje mykotrofie (Procházka & Velíšek 1983, Pellegrino et al. 2009). Druh vykvétá časně z jara, v teplých mediteránních oblastech již v březnu (Buttler 2000), u nás od dubna do května, ve vyšších horských polohách (nad 1000 m n. m.) i počátkem června (Procházka & Velíšek 1983).

V České republice roste nyní prstnatec bezový především na Moravě (v moravské části Karpat – nejhojněji v Beskydech v rámci celé ČR, dále na Znojemsku a v Národním parku Podyjí), roztroušeně v pohraničních horách (Krkonoše, Krušné hory, Šumava) a velmi zřídka i v jiných pro tento druh vhodných oblastech (Hajduchová 2009). Celostátně spadá tento druh podle Červeného seznamu rostlin do kategorie silně ohrožených druhů C2 (Holub & Procházka 2000), v moravskoslezském regionu do kategorie ohrožených druhů C3 (Jatiová & Šmiták 1996). Z evropského hlediska je důležité, že je součástí mezinárodní Washingtonské úmluvy (CITES) (<http://www.cites.org>).

2.2 Popis lokalit

2.2.1 České lokality

Sběr dat se v České republice uskutečnil především v oblasti Vsetínských vrchů a Javorníků (19 lokalit), kde se nachází těžiště výskytu tohoto druhu na našem území a kde v populacích převládá většinou červená forma (s průměrnou frekvencí 0,65). Ostatní lokality (9), z kterých byla data sebrána, se nachází v našich pohraničních horách – na Šumavě, v Krkonoších a v Krušných horách. Všechny tyto lokality jsou znázorněny pro přehlednost na mapě České republiky (Obr. 2). Lokality se nachází v nadmořských výškách od 467 m n. m. (poblíž obce Halenkov, Vsetínsko) do 900 m n. m. (Včelná pod Boubínem u pily, Šumava). Velikost populací se pohybuje od 7 do 3 872 kvetoucích jedinců (medián – 182).



Obr. 2 Lokality, na kterých byl prováděn sběr dat v České republice.

2.2.2 Zahraniční lokality

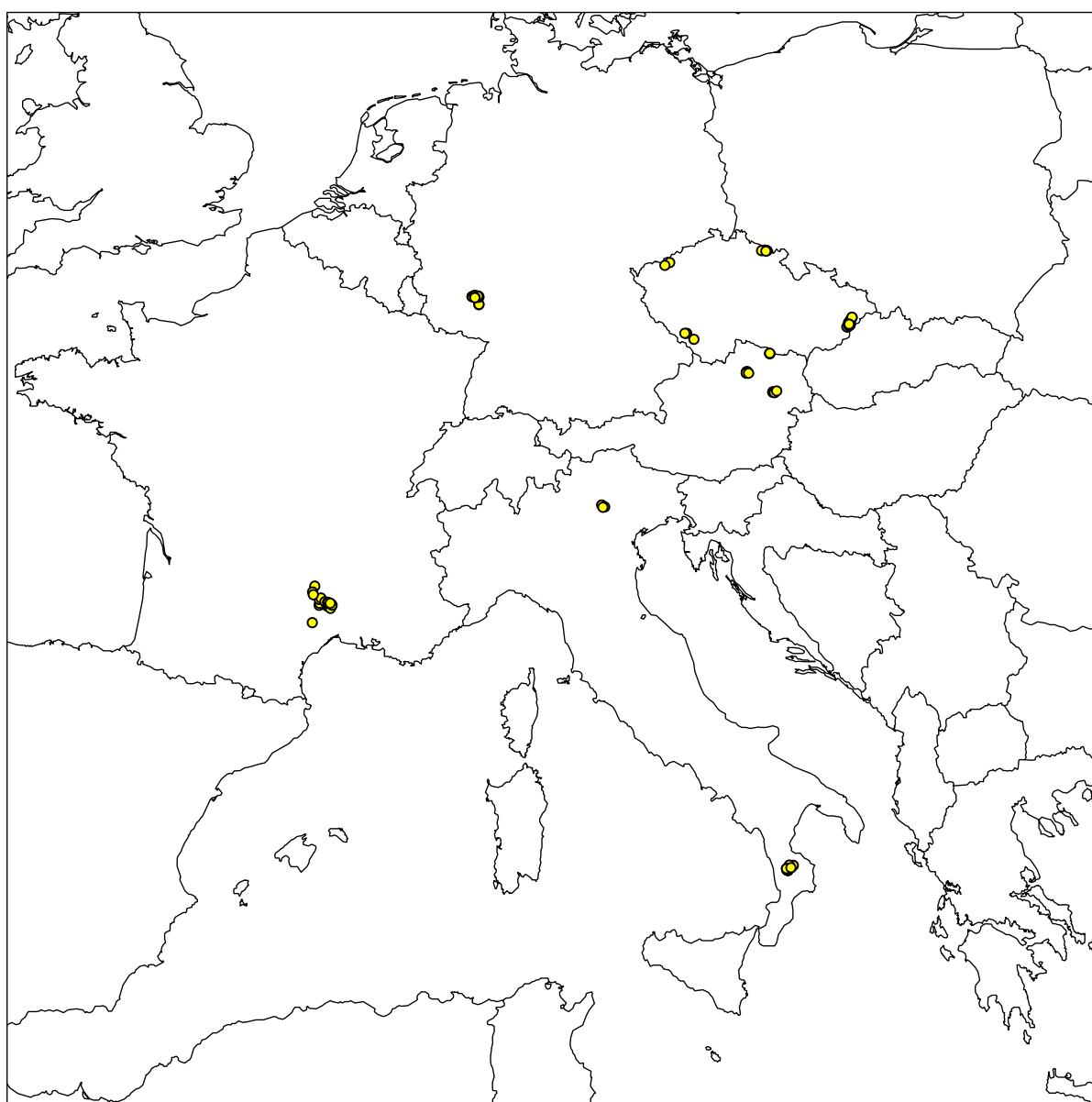
Zahraniční pracoviště, které se podílely na tomto experimentu se nachází ve Francii, Itálii, Německu a Rakousku. Pro mezinárodní spolupráci byla pro pokusy prováděné v terénu a pro sběr dat na všech lokalitách používána sjednocená metodika. Zahraniční lokality, na kterých se prováděl sběr dat, jsou znázorněny spolu s českými na mapě Evropy (Obr. 3).

Francouzská oblast výskytu prstnatce bezového pro tyto pokusy se nachází ve Francouzském středohoří. Jedná se o lokality s nadmořskou výškou od 781 m n. m. až 1300 m n. m. Sledováno bylo celkem 21 lokalit s počtem kvetoucích jedinců od 44 do 986 (medián – 208).

Italské lokality, na nichž byl prováděn výzkum, se nachází v pohoří La Sila a v jeho okolí, dále 4 lokality nalezneme mimo tuto oblast, a to v severní Itálii. Celkem se jedná o 20 lokalit s nadmořskou výškou od 1149 m n. m. až 1709 m n. m. Počty kvetoucích jedinců v populacích se pohybovaly od 16 po cca 52 000 (medián – 175) .

Německý výzkum byl soustředěn na 21 lokalit v Porýní, kde se vyskytují pouze monochromní, a to žluté populace této orchideje. Nadmořská výška na sledovaných lokalitách se pohybuje od 175 m n. m. do 445 m n. m., počet kvetoucích jedinců v populacích byl od 1 do 636 jedinců na lokalitu (medián – 71).

Rakouské experimenty a sběr dat byly prováděny celkem na 14 lokalitách, a to ve východní části Rakouské žulové plošiny, ve Vídeňském lese a na lokalitách přibližně 65 km severně od Vídně. Sledované lokality se nachází v nadmořské výšce od 295 m n. m. až 820 m n. m. a jsou charakterizovány 3 až 1368 kvetoucími jedinci (medián – 146).



Obr. 3 Všechny lokality, na kterých byla sbírána data pro experiment v rámci Evropy.

2.3 Metodika sběru dat

2.3.1 Zjišťované charakteristiky na lokalitách a odběr půd

Na každé lokalitě byl zjišťován celkový počet jedinců v populaci, poměr červené a žluté formy, sklon svahu a celková plocha, na které se populace nachází. Pokud byla populace zastoupena velkým množstvím jedinců (nad 500), bylo zastoupení jednotlivých barevných forem na takové lokalitě odhadováno pomocí průměru ze tří náhodně položených čtverců o velikosti 10x10 m.

Následně byly odebrány půdní vzorky. Půdní vzorky byly odebírány pomocí půdní sondy, a to celkem na 104 lokalitách (28 lokalit ČR, 21 lokalit Francie, 20 lokalit Itálie, 21 lokalit Německo, 14 lokalit Rakousko), aby mohlo následně dojít k porovnání takto získaných výsledků v rámci lokalit a regionů. Hloubka odběru byla vždy 2-10 cm. Z každého takto odebraného vzorku byly odstraněny 2 cm svrchní části, která obsahovala velké množství nerozložené organické hmoty, a mohla by tedy ovlivňovat chemické analýzy. Na každé lokalitě bylo odebráno 5 vzorků u každé barevné formy, a to vždy náhodně v rámci lokality. Poté byly z každé lokality vytvořeny dva směsné vzorky, vždy od žluté a od červené formy. Vzorky půd se nechaly volně uschnout a poté byly přesety na sítu s velikostí děr 2 mm.

2.3.2 Stanovení pH půd

Bylo stanoveno vodné pH půdních vzorků. Pro měření bylo použito vždy 10g vzorku a 30 ml destilované vody, tedy vždy ředění 1:3. Takto naředěné vzorky se nechaly vyluhovat po dobu 24 hodin v uzavřených lahvičkách. Po uplynutí této doby bylo změřeno pH vzorků membránovým pH metrem HI8316 s THETA '90 elektrodou (typ:HC113). Každý vzorek byl přeměřen třikrát. Výsledné pH lokality bylo získáno zprůměrováním výsledků od obou barevných forem na lokalitě.

2.3.3 Stanovení hydrolimit půd

Pro stanovení fyzikálních vlastností půd, byla použita metoda Kopeckého válečků, kdy pomocí těchto válečků bylo odebráno vždy 5 vzorků na lokalitu, a to pouze na českých lokalitách. Pro stanovení hydrolimit půd byl použit jednotný pracovní postup (Zbiral et al. 1997). Na stanovení hydrolimit a pH půd se podílel Zbyněk Másler, toho času student SOŠ a SOU Hořovice, který některé výsledky použil pro svou maturitní práci (Másler 2007).

Hodnoty z 5-ti opakování byly vždy pro následné statistické vyhodnocení zprůměrovány do jedné výsledné hodnoty pro každou lokalitu.

Ze stanovaných ukazatelů byla pro následné statistické zpracování použita retenční vodní kapacita (max. množství vody, které je půda schopna zadržet vlastními silami po 24 hod. v téměř rovnovážném stavu po nadměrném zavlažení) a maximální kapilární vodní kapacita (charakterizuje schopnost půdy zadržet vodu pro potřeby vegetace v kapilárních pórech půdy, tedy po volném odtoku a průsaku vody vlivem gravitace) (Pokorný et al. 2007). Tyto veličiny tedy vypovídají o schopnosti půdy zadržet vodu z dlouhodobého i krátkodobého hlediska.

2.3.4 Ruční opylování

Ruční opylování prstnatce bezového se uskutečnilo na českých lokalitách v květnu roku 2006 a opakovaně v roce 2007. Jednalo se vždy o stejné čtyři lokality v Beskydech (U Čotků, Zákopčí, Hrachovec, Javorná (viz Příloha 1)), z nichž dvě (U Čotků, Hrachovec) se shodovaly s lokalitami vybranými v předešlém experimentu provedeném v roce 2002 (Jersáková et al. 2006b). Dále se tento pokus podařilo úspěšně provést na 3 lokalitách italských a jedné rakouské. Spolupráce se zahraničními pracovišti probíhala pouze v roce 2006.

Na každé lokalitě bylo vždy vybráno 10-12 jedinců od každé barvy. Jednotlivé rostliny se vybíraly tak, aby nebyly bezprostředními sousedy. Před úplným vykvetením, na začátku sezóny, byli tito vybraní jedinci zakryti sítkami na drátěné konstrukci, aby se zabránilo přirozenému opylení. Spontánní autogamie u tohoto druhu není možná, semeníky jsou schopny se v přírodě vyvíjet pouze po opylení hmyzem (Jersáková 1998).

Po vykvetení byla konstrukce odstraněna a bylo opylováno ručně vždy spodních šest květů, a to následujícím způsobem: opylování v rámci fenotypu (ČČ nebo ŽŽ; 3 květy) a mezi fenotypy (ČŽ nebo ŽČ; 3 květy), přičemž Č znamená červený květ a Ž žlutý květ, dále první písmeno znamená barvu květu, který byl opylován, a druhé písmeno barvu květu zdroje pylu. Květy na jednom jedinci byly opylovány vždy střídavě, co se týká barvy donorů pylu. Pro opylování jednoho květu byla použita vždy jedna brylka, která pocházela od vzdálenějšího jedince v rámci populace. K opylování bylo použito párátko. Takto opylené květy byly označeny barevnými drátky pro pozdější rozlišení mezi typem zásahu.

2.3.5 Zjištění kvantity semen

Zralé semeníky byly sebrány a umístěny do Eppendorf zkumavek, ve kterých se nechaly volně doschnout. Poté byla semena vyjmuta ze semeníků a vážena na analytických vahách.

Dále byla počítána vždy část semen, která byla přenesena pomocí pinzety na Petriho misku, pod stereoskopickým mikroskopem, a to ve třech kategoriích – semena prázdná, semena s abortovanými embryi, semena s embryi. Z každého semeníku bylo takto spočítáno cca 200 semen. Abortovaná embrya se vyznačují jiným tvarem, než semena správně vyvinutá. Pod stereoskopickým mikroskopem vypadají jako tmavší scvrklé útvary postrádající pravidelný oválný tvar plně vyvinutých embryí. V prázdných semenech naopak embryo není patrné vůbec, semena bez embryí jsou užší.

Semena byla uchovávána po dobu experimentů v Eppendorf zkumavkách v chladničce při 4 °C.

2.3.6 Zjištění vitality semen pomocí tetrazoliového testu

Vitalita, tedy životaschopnost, semen byla posuzována pomocí tzv. tetrazoliového barvení (van Waes & Debergh 1986). Tato metodika byla optimalizována pro potřeby barvení semen mého studovaného druhu.

Den před pokusem se připraví 5% roztok chlorového vápna $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, který se používá k rozrušení osemení semen, a 1% Tween-80 (polyoxyethylensorbitanmonooleát), který zabraňuje slepování semen. V den, kdy provádíme pokus, se oba připravené roztoky smíchají dohromady v kádince, a to v poměru 2:1. Vzorky se umístí na planktonní síťku (5x5 cm) s velikostí ok 50 μm , která se přehne a umístí do diarámečku. Takto umístěná semena se ponoří na 10 hodin do kádinky s výše popsaným roztokem. Každé dvě hodiny po vložení vzorků do roztoku je nutné tento roztok promíchat, aby se $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ neusazoval na dně. Poté se vzorky vyjmou a nechají se odstát v destilované vodě po dobu 24 hodin. Další den se přemístí do 1% TTC (2, 3, 5 triphenyltetrazolium chlorid), který se nechá působit 24 hodin. Tetrazoliová sůl je v živých buňkách účinkem iontů vodíku redukována na červené barvivo a tak se živé embryo zbarví do červena. Během tetrazoliového barvení byla kádinka se vzorky v termostatu s nastavenou teplotou na 30 °C. Následující den se vzorky vyjmou z termostatu a 3x se promyjí destilovanou vodou. Poté se odsaje přebytečná voda a síťka se otiskne na Petriho misku předem potřenou vazelínou, na kterou se semena přichytí. Pod stereoskopickým mikroskopem byla spočítána prázdná, neobarvená a obarvená (červená)

semena. Jednotlivé vzorky byly takto připraveny ze všech odebraných semeníků. V průměru bylo spočítáno na každé misce 364 semen.

Protože se tloušťka a propustnost osemení u jednotlivých druhů orchidejí liší, je nutné před tímto pokusem experimentálně zjistit optimální dobu vápnění. Semena prstnatce bezového byla tedy ponechána v roztoku chlorového vápna po dobu 0-24 hodin. Každé dvě hodiny se vyjmula část semen a byla podrobena výše popsanému tetrazoliovému testu. Pro každou dobu barvení byla použita dvě opakování. Optimální doba vápnění, kdy byla semena obou barevných forem obarvena ve stejné míře, byla tímto pokusem stanovena na uvedených 10 hodin (Schödelbauerová, osobní sdělení).

Tento experiment byl prováděn ve spolupráci s mojí konzultantkou RNDr. Ivou Schödelbauerovou, PhD.

2.4 Zpracování dat

Mapy v této práci byly vytvořeny v programu DMAP for Windows verze 7.2e (<http://www.dmap.co.uk>) ze zeměpisných souřadnic lokalit získaných v terénu.

Experimentální data jsem nejprve upravila v programu Excel pro následné statistické analýzy. Pokud se mezi daty z opylovacích experimentů objevila některá, která signalizovala vliv nějakého vnějšího faktoru a nikoliv vliv cíleného typu zásahu (např. všechna semena v semeníku prázdná nebo postižena herbivorem), byly taková data eliminována u všech sledovaných proměnných (váha, podíl semen s vyvinutými embryi, podíl vitálních semen). Při úspěšném opylení květu tohoto druhu se semena vždy vyvinou, pouze se mění množství abortovaných embryí (Jersáková, osobní sdělení).

Většinu dat jsem zpracovávala v programu Statistica 9 (StatSoft, Inc. 1984-2009).

Data, která neměla normální rozdělení, jsem transformovala logaritmickou, nebo arcsinovou transformací podle typu dat (údaje o váze semen logaritmickou, údaje o podílech arcsinovou transformací). Normalitu dat jsem testovala Kolmogorov-Smirnovovým testem.

Vliv typu křížení (křížení uvnitř a mezi barevnými formami) a barevné formy rostliny na hmotnost semen a jejich životaschopnost byl analyzován dvoucestnými analýzami variance (faktoriální ANOVA) s nezávislými proměnnými: typ křížení, barevná forma a lokalita a závislými proměnnými: hmotnost semen, podíl semen s vyvinutým embryem a podíl vitálních semen. Pro meziroční variabilitu výše zmíněných vlivů byl použit obecný lineární model s možností navolení si požadovaných interakcí, kdy mezi nezávislé proměnné přibyl vždy rok, v kterém byl experiment prováděn.

K testování možného vlivu velikosti populace na poměr barevných forem v populaci byla použita lineární regrese. Předpokládala jsem, že v malých populacích by poměr barevných forem mohl být více vychýlen než u velkých populací z důvodu genetického ochuzení malých populací (Primack et al. 2001). Z tohoto testu byly vynechány monochromní lokality, lokality, na kterých nebyl zaznamenán žádný kvetoucí jedinec, a lokality s jedním kvetoucím jedincem. Pro statistické vyhodnocení jsem v tomto případě pracovala s absolutní hodnotou odchylky frekvence červené formy na lokalitách od 0,5 (hypotetický rovnovážný stav).

K testování vlivu pH půdy na fenotypové zastoupení barevných forem v populacích byla použita lineární regrese a analýza kovariance (ANCOVA), kde pH je veličina s pevným efektem, zatímco region s náhodným, protože předpokládáme, že populace téhož druhu se mohou lišit v určitých charakteristikách (Lepš 1996). K tomuto vyhodnocení byly použity i údaje z populací, na kterých se v roce experimentu (2006) nenalezl žádný kvetoucí jedinec, ale z předešlých let se vědělo, že se jedná o populace monochromní. Pro stanovení statistické průkaznosti rozdílů mezi vlivem jednotlivých lokalit na pH půd a na frekvenci červené formy v populacích jsem použila Tukeyho test (mnohonásobné porovnání), který upřesňuje průkazný výsledek analýzy variance (ANOVA).

K testování rozdílu pH půd odebraných u žlutých a červených forem v rámci regionů a u celého souboru dat byl použit párový t-test s následnými Bonferroniho korekcemi (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/calculations/bonfer.htm>). K tomuto vyhodnocení byla použita pouze data, která byla z dané lokality k dispozici jak od červeně, tak od žlutě zbarvených jedinců (tedy zcela s vynecháním monochromních populací).

Pro testování vlivu vybraných environmentálních proměnných (výčet) na frekvenci červené formy v českých populacích jsem použila metodu postupného výběru (forward selection), která je součástí mnohonásobné regrese, a přímou lineární gradientovou analýzu (RDA) v programu CANOCO for Windows verze 4.5 (ter Braak & Šmilauer 2002). V rámci lineární gradientové analýzy data nebyla transformována (kromě velikosti populace, která byla zlogaritmovaná) a byla centrována přes "species". Provedla jsem metodu postupného výběru (forward selection). Celý model jsem otestovala pomocí Monte Carlo permutačního testu. Pro výsledný graf z této analýzy byl použit program CanoDraw for Windows verze 4.12. Pro testování vlivu veličiny, která průkazně vysvětlila největší podíl z celkové variability modelu (retenční vodní kapacita), na zastoupení červených forem v českých populacích, jsem následně použila lineární regresi.

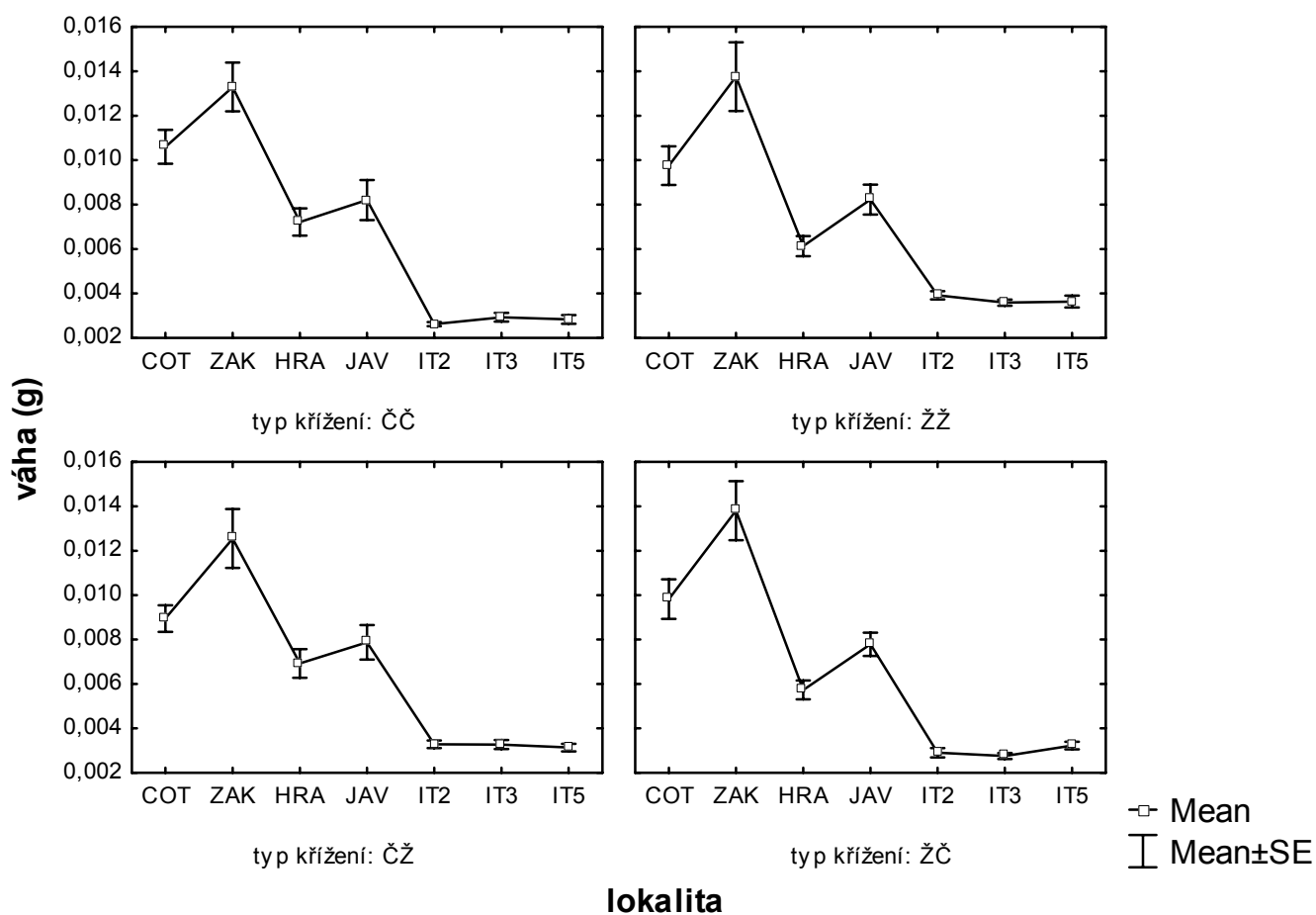
Výsledky testů byly posuzovány na 5% hladině významnosti. Pro tvorbu všech grafů, pokud není uvedeno jinak, byla použita původní netransformovaná data. Chybové úsečky v grafech ukazují střední chyby průměru. Vždy jsem pracovala s neváženým průměrem.

3 Výsledky

3.1 Váha semen

3.1.1 Vliv křížení barevných forem na váhu semen

Nebyl zaznamenán rozdíl ve váze semen obou barevných forem, ani ve váze semen vzniklých z křížení mezi barevnými formami. Statisticky průkazné jsou pouze rozdíly mezi lokalitami (Tab. 1, Obr. 4), kdy italské lokality měly až 4-krát nižší váhu semen v semeníku než české lokality.



ČČ - červená forma opylovaná červenou

ŽŽ - žlutá forma opylovaná žlutou

ČŽ - červená forma opylovaná žlutou

ŽČ - žlutá forma opylovaná červenou

COT - U Čotků

ZAK - Zákopčí

HRA - Hrachovec

JAV - Javorná

IT2 - Itálie lokalita 2

IT3 - Itálie lokalita 3

IT5 - Itálie lokalita 5

Obr. 4 Závislost váhy semen na lokalitě a typu křížení barevných forem. (Mean – průměr, Mean ± SE – průměr ± střední chyba průměru)

Tab. 1 Vliv typu křížení, barevné formy a jednotlivých českých i zahraničních lokalit na váhu semen v semenících. Závislá proměnná: váha semen; nezávislá proměnná: lokalita, typ křížení (křížení uvnitř a mezi formami) a barevná forma rostliny. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální analýza variance (ANOVA): d.f. – stupně volnosti, M.S. – průměrný čtverec, error M.S. – chybový průměrný čtverec, F – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti)

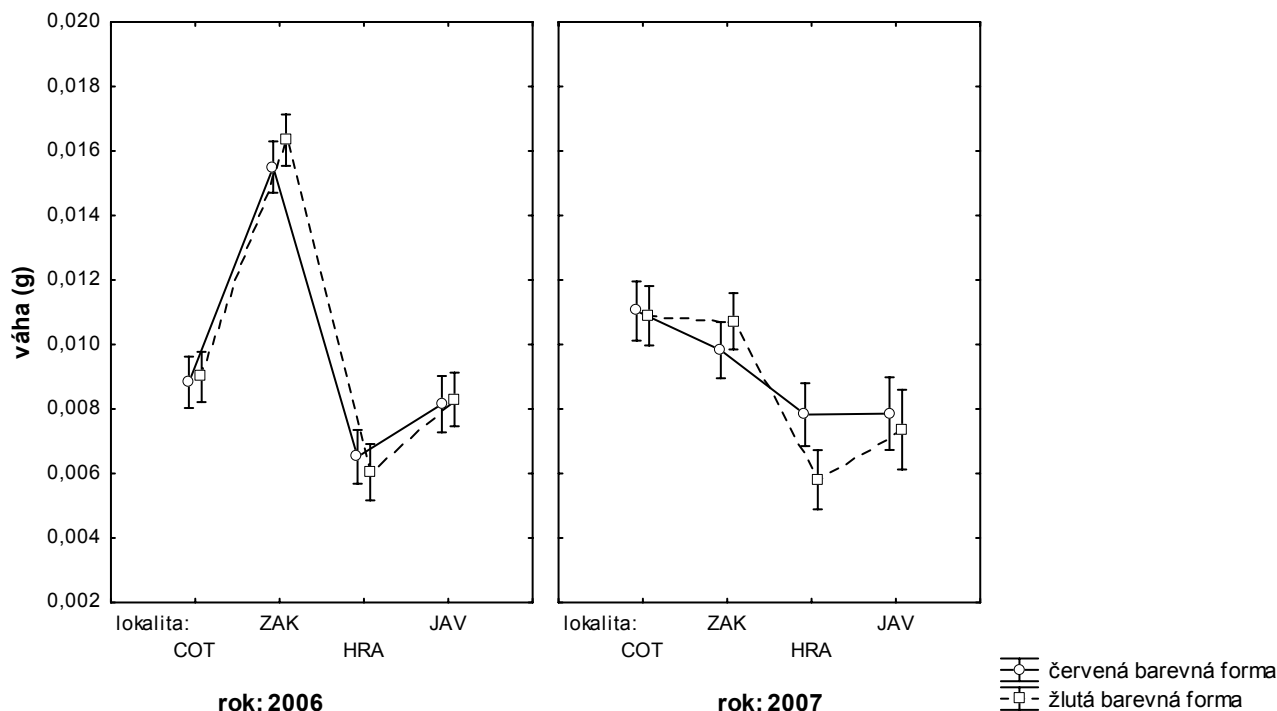
Závislá proměnná: váha semen	d.f.	M.S.	F-value	p-level
Nezávislé proměnné:				
lokalita	6	93×10^{-5}	71,78	< 0,001
typ křížení	1	1×10^{-5}	0,81	0,370
barevná forma	1	$0,1 \times 10^{-5}$	0,07	0,797
lokalita x typ křížení	6	$0,1 \times 10^{-5}$	0,07	0,999
lokalita x barevná forma	6	$0,7 \times 10^{-5}$	0,56	0,760
typ křížení x barevná forma	1	$0,1 \times 10^{-5}$	0,06	0,805
lokalita x typ křížení x barevná forma	6	$0,5 \times 10^{-5}$	0,39	0,889
„error“	402	$1,3 \times 10^{-5}$		

3.1.2 Meziroční variabilita ve váze semen vzniklých z křížení barevných forem

Nebyl zaznamenán rozdíl ve váze semen obou barevných forem, ani ve váze semen vzniklých z křížení mezi barevnými formami na českých lokalitách, zatímco statisticky průkazné jsou rozdíly mezi lokalitami a mezi roky, v kterých byl experiment uskutečněn (Tab. 2, Obr. 5). Průkazná je také interakce Rok*Lokalita ukazující, že některé lokality (Zákopčí) se z hlediska váhy semen chovají v některých rocích jinak než ostatní lokality.

Tab. 2 Vliv typu křížení, barevné formy, roku a jednotlivých českých lokalit na váhu semen v semenících. Závislá proměnná: váha semen; nezávislá proměnná: lokalita, typ křížení (křížení uvnitř a mezi formami), barevná forma rostliny a rok. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) jsou vyznačeny tučně. (obecný lineární model (GLM): d.f. – stupně volnosti, M.S. – průměrný čtverec, error M.S. – chybový průměrný čtverec, F – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti)

Závislá proměnná: váha semen	d.f.	M.S.	F-value	p-level
Nezávislé proměnné:				
lokalita	3	63×10^{-5}	42,32	< 0,001
typ křížení	1	$1,8 \times 10^{-5}$	1,20	0,274
barevná forma	1	$0,1 \times 10^{-5}$	0,05	0,832
rok	1	$6,2 \times 10^{-5}$	4,13	0,043
rok x barevná forma	1	$0,6 \times 10^{-5}$	0,41	0,523
rok x typ křížení	1	$0,0 \times 10^{-5}$	0,02	0,877
rok x lokalita	3	23×10^{-5}	15,42	< 0,001
rok x typ křížení x barevná forma	1	$1,1 \times 10^{-5}$	0,73	0,395
rok x lokalita x barevná forma	3	$0,1 \times 10^{-5}$	0,09	0,965
„error“	297	$1,5 \times 10^{-5}$		



COT - U Čotků, ZAK - Zákopčí, HRA - Hrachovec, JAV – Javorná

Obr. 5 Závislost váhy semen jednotlivých barevných forem bez ohledu na typ křížení (uvnitř a mezi formami) na jednotlivých českých lokalitách v letech 2006 a 2007. (vertikální úsečky znázorňují střední chybu průměru, střední úseček nevážený aritmetický průměr)

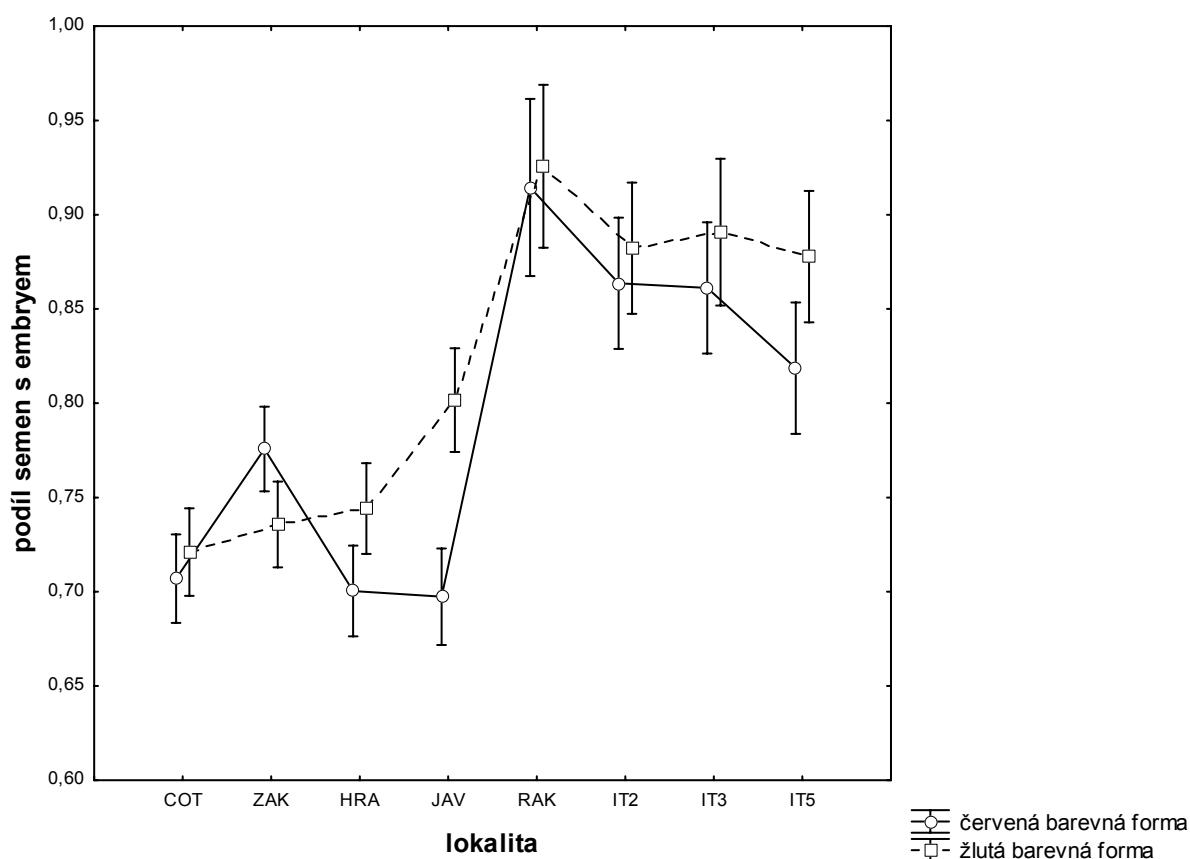
3.2 Životoschopnost semen – podíl semen s vyvinutým embryem

3.2.1 Vliv křížení barevných forem na podíl semen s vyvinutým embryem

Křížení mezi barevnými formami nemělo vliv na podíl semen s vyvinutými embryi v českých i zahraničních populacích, ale statisticky průkazný je vliv lokality a stejně tak barevná forma rostliny (Tab. 3), kde můžeme pozorovat statisticky průkazný rozdíl v podílu semen s vyvinutými embryi ve prospěch žluté barevné formy (Obr. 6). Z grafu je vidět, že žlutá forma má vyšší podíl semen s vyvinutým embryem na všech zahraničních a dvou českých lokalitách. Semena ze zahraničních populací jsou v rámci tohoto experimentu celkově životoschopnější (průměrně 88 % semen s vyvinutým embryem) než semena z českých lokalit (74 %).

Tab. 3 Vliv typu křížení, barevné formy a jednotlivých českých i zahraničních lokalit na podíl semen s vyvinutými embryi v semenících. Závislá proměnná: podíl semen s vyvinutým embryem; nezávislá proměnná: lokalita, typ křížení (křížení uvnitř a mezi formami) a barevná forma rostliny. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální analýza variance (ANOVA): d.f. – stupně volnosti, M.S. – průměrný čtverec, error M.S. – chybový průměrný čtverec, F – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti)

Závislá proměnná: podíl semen s vyvinutým embryem	d.f.	M.S.	F-value	p-level
Nezávislé proměnné:				
lokalita	7	0,5105	15,00	< 0,001
typ křížení	1	0,0204	0,60	0,439
barevná forma	1	0,1379	4,05	0,045
lokalita x typ křížení	7	0,0145	0,43	0,886
lokalita x barevná forma	7	0,0490	1,44	0,187
typ křížení x barevná forma	1	0,0048	0,14	0,709
lokalita x typ křížení x barevná forma	7	0,0352	1,03	0,406
„error“	445	0,0340		



COT - U Čotků, ZAK - Zákopčí, HRA -Hrachovec, JAV - Javorná, RAK - Rakousko, IT2 - Itálie lokalita 2, IT3 - Itálie lokalita 3, IT5 - Itálie lokalita 5

Obr. 6 Závislost podílu semen s vyvinutým embryem u jednotlivých barevných forem bez ohledu na typ křížení (uvnitř a mezi formami) na lokalitách. (vertikální úsečky znázorňují střední chybu průměru, středy úseček nevážený aritmetický průměr)

3.2.2 Meziroční variabilita v podílu semen s vyvinutým embryem vzniklých z křížení barevných forem

Nebyl zaznamenán rozdíl v podílu semen s vyvinutým embryem obou barevných forem, ani rozdíl v témže ukazateli životaschopnosti semen vzniklých křížením mezi barevnými formami. Statisticky neprůkazný je i rozdíl mezi sledovanými českými lokalitami a lety, v kterých byl experiment na těchto lokalitách prováděn (Tab. 4).

Tab. 4 Vliv typu křížení, barevné formy, roku a jednotlivých českých lokalit na podíl semen s vyvinutým embryem. Závislá proměnná: podíl semen s vyvinutým embryem; nezávislá proměnná: lokalita, typ křížení (křížení uvnitř a mezi formami), barevná forma rostliny a rok. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) zde nenalézáme. (obecný lineární model (GLM): d.f. – stupně volnosti, M.S. – průměrný čtverec, error M.S. – chybový průměrný čtverec, F – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti)

Závislá proměnná: podíl semen s vyvinutým embryem	d.f.	M.S.	F-value	p-level
Nezávislé proměnné:				
lokalita	3	0,0455	1,10	0,350
typ křížení	1	0,0616	1,49	0,224
barevná forma	1	0,0571	1,38	0,242
rok	1	0,0099	0,24	0,626
rok x barevná forma	1	0,0201	0,48	0,487
rok x typ křížení	1	0,0008	0,02	0,887
rok x lokalita	3	0,0224	0,54	0,654
rok x typ křížení x barevná forma	1	0,0074	0,18	0,673
rok x lokalita x barevná forma	3	0,1081	2,61	0,052
„error“	322	0,0415		

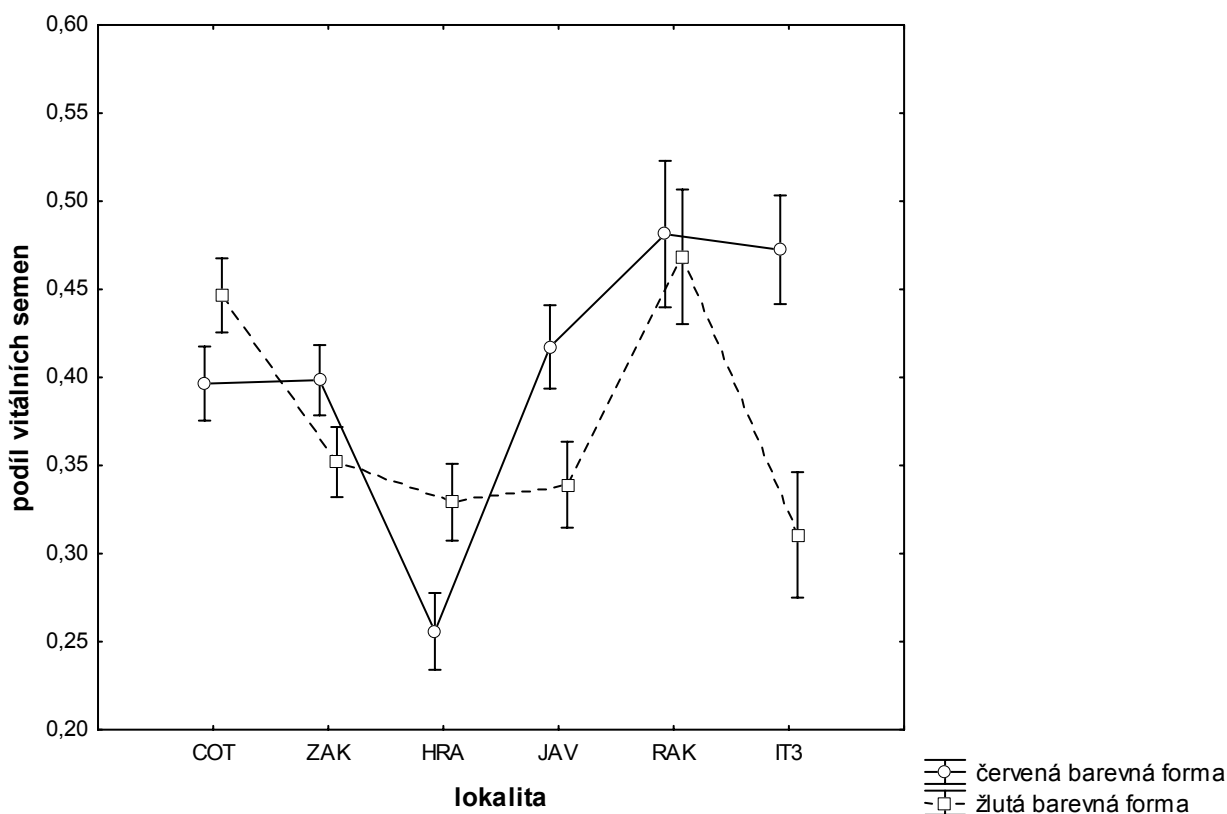
3.3 Životaschopnost semen – podíl vitálních semen

3.3.1 Vliv křížení barevných forem na podíl vitálních semen

Výsledkem ručního opylování barevných forem a následného tetrazoliového barvení embryí je statisticky neprůkazný rozdíl v podílu vitálních semen obou barevných forem, stejně tak v podílu vitálních semen vzniklých křížením barevných forem na českých i zahraničních lokalitách. Statisticky průkazné jsou rozdíly mezi jednotlivými lokalitami a interakce Lokalita*Barevná forma rostliny (Tab. 5, Obr. 7).

Tab. 5 Vliv typu křížení, barevné formy a jednotlivých českých i zahraničních lokalit na podíl vitálních semen. Závislá proměnná: podíl vitálních semen; nezávislá proměnná: lokalita, typ křížení (křížení uvnitř a mezi formami) a barevná forma rostliny. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální analýza variance (ANOVA): d.f. – stupně volnosti, M.S. – průměrný čtverec, error M.S. – chybový průměrný čtverec, F – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti)

Závislá proměnná: podíl vitálních semen	d.f.	M.S.	F-value	p-level
Závislé proměnné:				
lokalita	5	0,2331	9,47	< 0,001
typ křížení	1	0,0005	0,02	0,892
barevná forma	1	0,0797	3,24	0,073
lokalita x typ křížení	5	0,0127	0,51	0,765
lokalita x barevná forma	5	0,1259	5,11	< 0,001
typ křížení x barevná forma	1	0,0027	0,11	0,740
lokalita x typ křížení x barevná forma	5	0,0044	0,18	0,971
„error“	363	0,0246		



COT - U Čotků, ZAK - Zákopčí, HRA -Hrachovec, JAV - Javorná, RAK - Rakousko, IT3 - Itálie lokalita 3

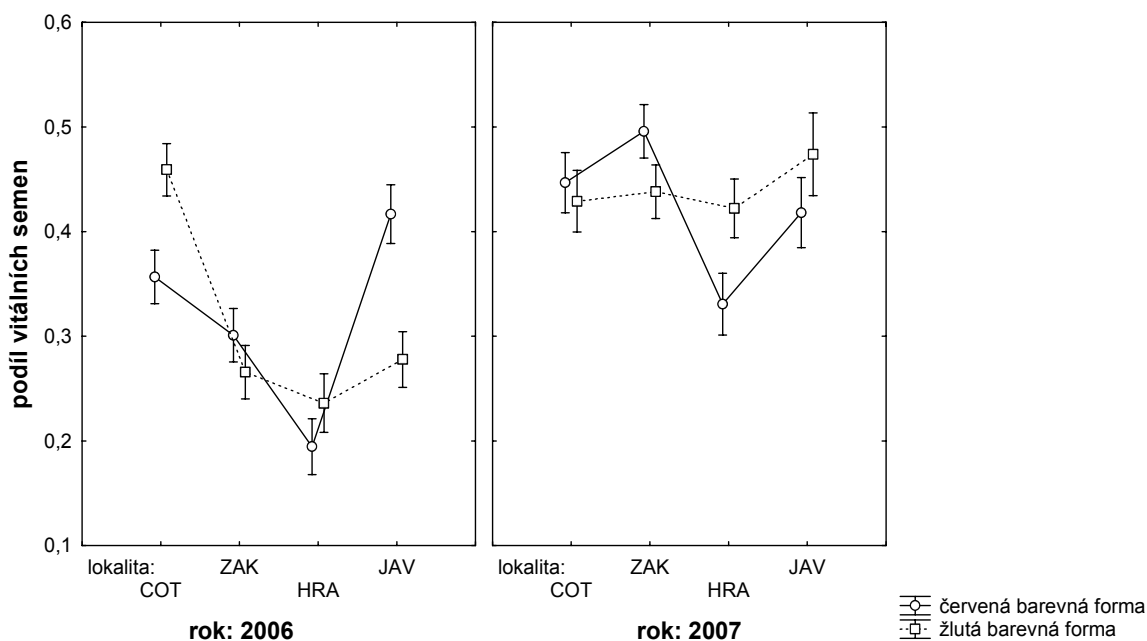
Obr. 7 Závislost podílu vitálních semen dvou různých barevných forem na českých a zahraničních lokalitách. (vertikální úsečky znázorňují střední chybu průměru, středy úseček nevážený aritmetický průměr)

3.3.2 Meziroční variabilita v podílu vitálních semen vzniklých z křížení barevných forem

Byl zaznamenán průkazný rozdíl v podílu vitálních semen na jednotlivých lokalitách a v jednotlivých letech experimentu. Typ křížení ani samotná barva rostliny neměly vliv na vitalitu semen (Tab. 6, Obr. 8).

Tab. 6 Vliv typu křížení, barevné formy, roku a jednotlivých českých lokalit na podíl vitálních semen. Závislá proměnná: podíl vitálních semen; nezávislé proměnné: lokalita, typ křížení (křížení uvnitř a mezi formami), barevná forma rostliny a rok. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) jsou vyznačeny tučně. (faktoriální analýza variance (ANOVA): d.f. – stupně volnosti, M.S. – průměrný čtverec, error M.S. – chybový průměrný čtverec, F – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti)

Závislá proměnná: podíl vitálních semen	d.f.	M.S.	F-value	p-level
Nezávislé proměnné:				
lokalita	3	0,2401	14,75	< 0,001
typ křížení	1	0,0009	0,06	0,813
barevná forma	1	0,0028	0,17	0,678
rok	1	1,1326	69,55	< 0,001
rok x barevná forma	1	0,0158	0,97	0,325
rok x typ křížení	1	0,0046	0,28	0,595
rok x lokalita	3	0,1040	6,39	< 0,001
rok x typ křížení x barevná forma	1	0,0035	0,21	0,644
rok x lokalita x barevná forma	3	0,0996	6,12	< 0,001
„error“	312	0,0163		

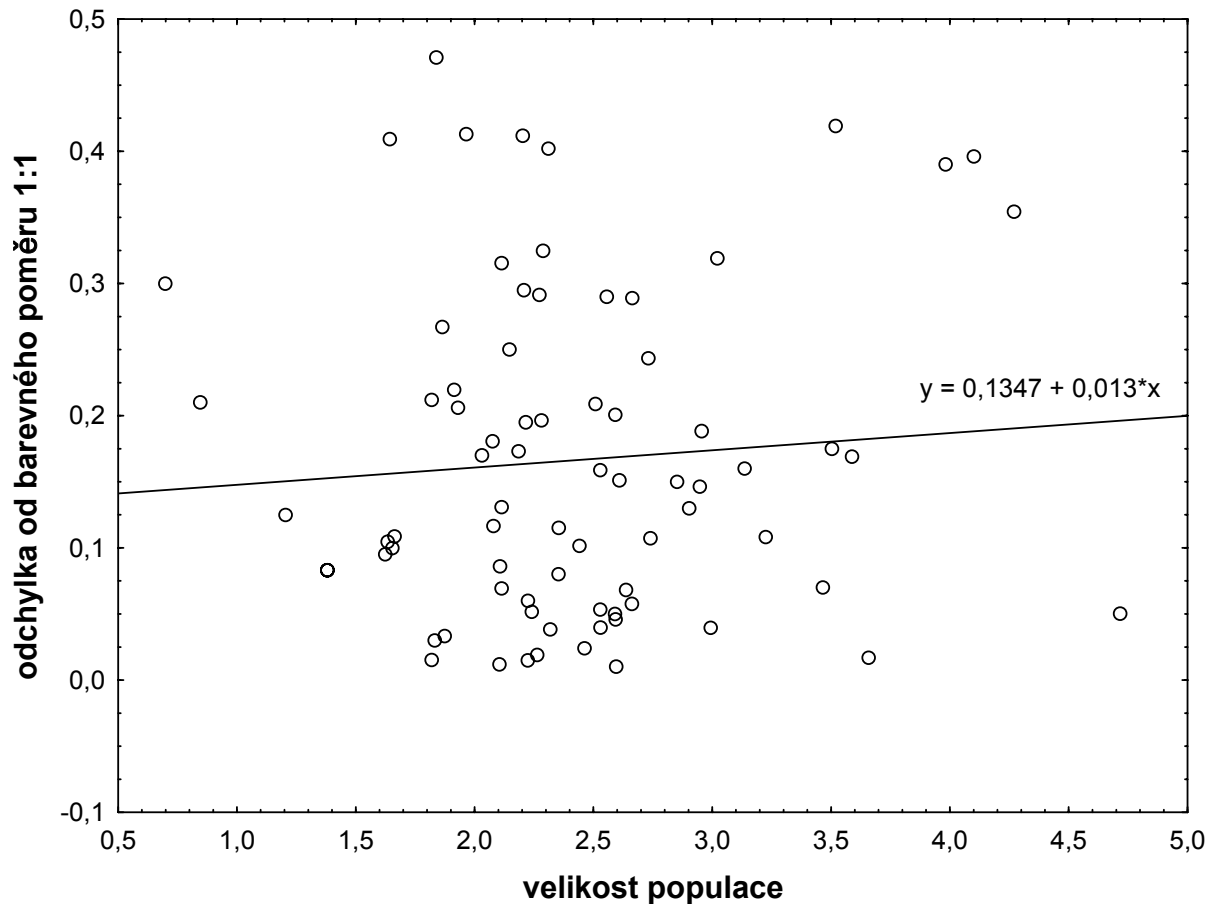


COT - U Čotků, ZAK - Zákopčí, HRA - Hrachovec, JAV – Javorná

Obr. 8 Závislost podílu vitálních semen dvou různých barevných forem na lokalitách v jednotlivých letech experimentu. (vertikální úsečky znázorňují střední chybu průměru, středy úseček nevážený aritmetický průměr)

3.4 Vliv velikosti populace na zastoupení barevných forem v evropských populacích

Odchyłka od barevného poměru 1:1 byla testována lineární regresí (Obr. 9). Velikost populace nemá vliv na zastoupení jednotlivých barevných forem v populacích ($F_{(1, 76)} = 0,46$; $p = 0,499$).



Obr. 9 Závislost odchyłky od barevného poměru 1:1 na velikosti populací vybraných evropských regionů. (velikost populace reprezentují zlogaritmovaná data)

3.5 Vliv zkoumaných abiotických faktorů na různé zastoupení barevných forem v populacích

3.5.1 Vliv pH půdy na zastoupení barevných forem v evropských populacích

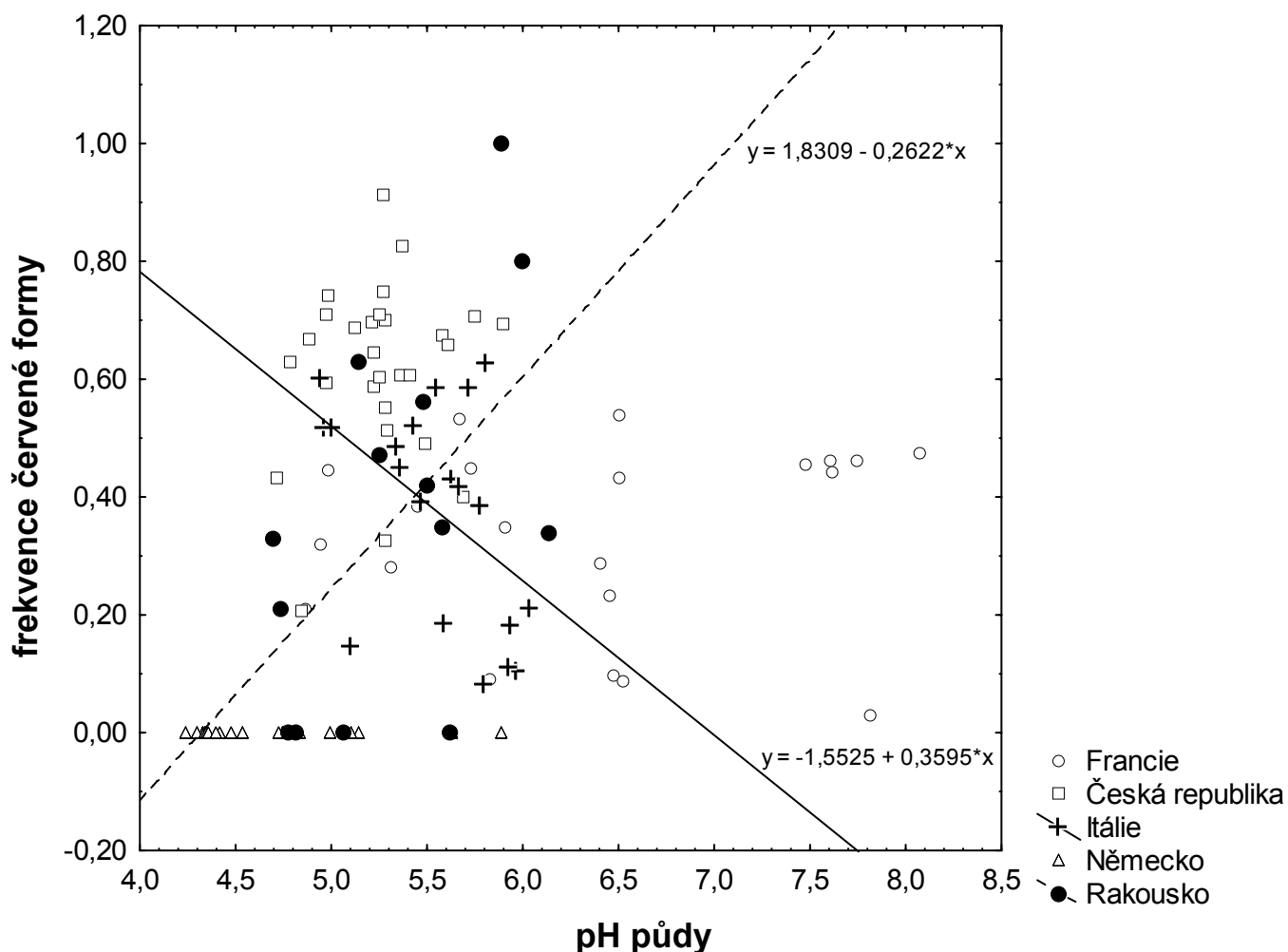
Závislost frekvence barevných forem na pH půdy ve vybraných evropských populacích byla průkazná pouze ve dvou regionech (Tab. 7), a to na lokalitách v Itálii a v Rakousku. Z obrázku 10 ale vidíme, že tyto prokázané závislosti jsou protichůdné, což tedy nepodporuje teorii o tom, že nízké pH mění frekvenci barev ve prospěch žluté barvy. V rámci zjišťovaného půdního pH a zastoupení jednotlivých barevných forem v populacích se objevují statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými regiony (Tab. 8), které jsou znázorněny v tabulce 7.

Tab. 7 Vliv půdního pH na zastoupení barevných forem ve vybraných evropských populacích. Závislá proměnná: frekvence červené formy v populaci; nezávislá proměnná: pH půdy na lokalitě. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) jsou vyznačeny tučně. (Lineární regrese: a, b – regresní parametry, R^2 – regresní koeficient, p – dosažená hladina významnosti; mean – průměr, SE – střední chyba průměru; N – počet lokalit v regionu) Stejná písmena značí statisticky neprůkazné rozdíly v dané proměnné mezi regiony (Tukey test, $p < 0,05$).

Ragiony (N)	pH mean \pm SE	frekvence červené formy mean \pm SE	a	b	R^2	p
Francie (21)	6,4 \pm 0,22 ^a	0,34 \pm 0,03 ^a	0,016	0,232	0,011	0,648
Česká republika (28)	5,3 \pm 0,05 ^b	0,62 \pm 0,03 ^b	0,087	0,159	0,029	0,387
Itálie (20)	5,6 \pm 0,08 ^b	0,38 \pm 0,04 ^a	-0,262	1,831	0,231	0,032
Německo (21)	4,7 \pm 0,10 ^c	0	-	-	-	-
Rakousko (14)	5,3 \pm 0,13 ^b	0,37 \pm 0,08 ^a	0,360	-1,553	0,309	0,039

Tab. 8 Vliv regionu a pH na frekvenci barevných forem v populacích. Závislá proměnná: frekvence červené formy; nezávislé proměnné: pH a region. Statisticky průkazné hodnoty ($p < 0,05$) jsou vyznačeny tučně. (analýza kovariance (ANCOVA): d.f. – stupně volnosti, M.S. – průměrný čtverec, error M.S. – chybový průměrný čtverec, F – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti)

Závislá proměnná: frekvence červené formy	efekt	d.f.	M.S.	F-value	p-level
Nezávislé proměnné:					
pH	pevný	1	0,027	0,25	0,640
region	náhodný	4	0,130	4,95	< 0,001
region x pH	náhodný	4	0,134	5,12	< 0,001
„error“		94	0,026		



Obr. 10 Závislost zastoupení červené barevné formy na pH půdy na lokalitách vybraných evropských regionů (přímkami znázorněny pouze statisticky průkazné závislosti a jejich regresní rovnice)

3.5.2 Rozdíl v pH půd odebraných u žlutých a červených jedinců ve vybraných evropských populacích

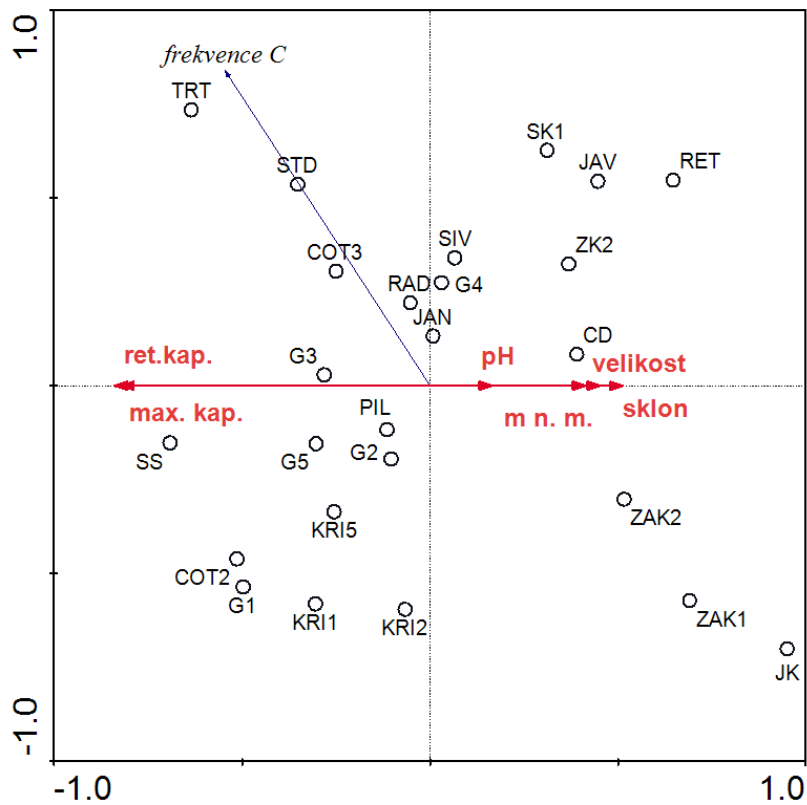
Po Bonferroniho korekci nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v pH půd odebraných zvlášť u červených a u žlutých jedinců v rámci všech lokalit, ani v rámci vybraných regionů (Tab. 9).

Tab. 9 Rozdíl v půdním pH získaném z půd zvlášť od žlutých a od červených jedinců. Závislá proměnná: půdní pH od červených jedinců a půdní pH od žlutých jedinců na lokalitě. Po Bonferroniho korekci (, která nám ukazuje jakou by musely mít výsledky dosaženou hladinu významnosti, abychom ja na 5% hladině významnosti mohli považovat za průkazné) nenalézáme statisticky průkazné rozdíly mezi lokalitami (žádné hodnoty $p < 0,016$). (párový t-test (Dependent Samples): d.f. – stupně volnosti, t-value – hodnota testového kritéria, p – dosažená hladina významnosti, * - hodnoty neprůkazné po Bonferroniho korekci na $p < 0.016$)

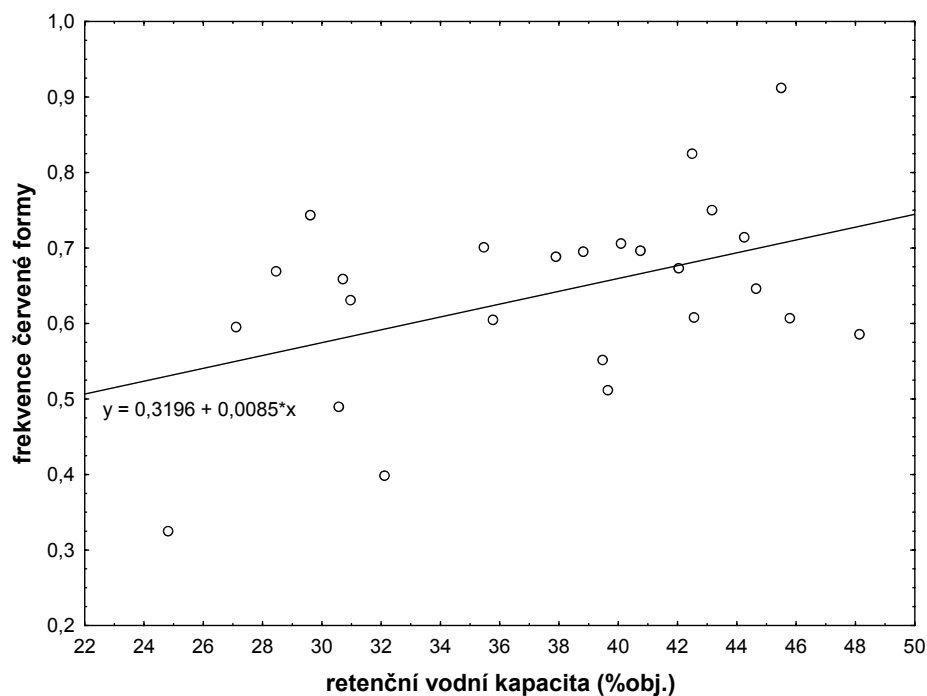
Závislé proměnné: pH od žlutých a pH od červených rostlin	d.f.	t-value	p-level
Region:			
Itálie + ČR + Francie	69	0,37	0,712
Itálie	19	-2,32	0,032 *
ČR	28	2,22	0,035 *
Francie	20	0,09	0,929

3.5.3 Vliv všech vybraných environmentálních proměnných na zastupení barevných forem v českých populacích

Výsledky metody postupného výběru (forward selection) v mnohonásobné regresi a přímé lineární gradientové analýze (Obr.11) ukázaly, že statisticky průkazný vliv na zastoupení barevných forem v českých populacích měla ze všech vybraných environmentálních proměnných pouze retenční vodní kapacita ($R^2 = 0,186$; $p = 0,014$), která vysvětlila 21 % z celkové variability modelu (variabilita vysvětlená všemi proměnnými = 30 %). Z obrázku 12 lze vidět, že červené barevné formě se daří více na místech s větší retenční vodní kapacitou půdy (lineární regrese: $R^2 = 0,174$; $p = 0,022$).



Obr. 11 Ordinační diagram přímé lineární gradientové analýzy (RDA) znázorňuje vliv environmentálních proměnných na frekvenci červené barevné formy (frekvence C) v českých populacích (= jednotlivé body; zkratky označující příslušné lokality jsou vysvětleny v Příloze 1). První osa vysvětluje 30 % a druhá osa 70 % variability. (environmentální proměnné: retenční vodní kapacita (ret. kap.), maximální kapilární vodní kapacita (max. kap.), pH, velikost populace (velikost), sklon svahu (sklon) a nadmořská výška lokality (m n. m.))



Obr. 12 Vliv retenční vodní kapacity půdy na zastoupení barevných forem v českých populacích.

4 Diskuze

Mechanismus udržování polymorfismu v barvě květu je jednou z evolučně-biologických otázek, na které se dnešní věda snaží nalézt odpověď. Na prstnatci bezovém, coby modelovém organismu, bylo provedeno už nemálo studií (viz Úvod), které nám stále nedávají odpovědi na to, jak je polymorfismus tohoto druhu udržován v přírodních populacích. Teorii selekce negativně závislé na frekvenci se doposud nepodařilo potvrdit v přírodních populacích tohoto druhu, proto se tato práce snažila testovat alternativní hypotézy, kterými se doposud nikdo nezabýval a pokud ano, tak na výrazně menším počtu lokalit.

Ačkoliv se podařilo splnit vytyčené cíle práce, výsledky nepodporují zkoumané hypotézy o tom, jaké doposud méně zkoumané faktory by mohly ovlivňovat fenotypové zastoupení barevných forem prstnatce bezového v evropských populacích. Výjimkou je průkazný vliv vybraných půdních hydrolimit, které zatím nikdo v této souvislosti netestoval, proto by se případný příští výzkum mohl ubírat tímto směrem. Porozumění mechanismům udržujícím polymorfismus barvy květů prstnatce bezového, by mohlo přispět k lepším znalostem o biologii tohoto zajímavého druhu a k pochopení evoluce polymorfismu u rostlin.

4.1 Vliv křížení barevných forem na jejich frekvenci v populacích

Výsledky ručního opylování celkově neukazují na větší životaschopnost žluté nebo červené formy prstnatce bezového. Rozdíly jsou většinou pouze mezi lokalitami a stejně tak se uplatňuje meziroční variabilita. Větší podíl semen s vyvinutým embryem ve prospěch žluté barevné formy by mohl být dán na zahraničních lokalitách převahou žluté formy v těchto populacích, zatímco na českých lokalitách má větší fitness ta barevná forma, která je v populaci vzácnější. Celkově tedy nelze vypožorovat žádný ustálený trend. Fakt, že ve vsetínských populacích byla v roce 2002 zjištěna snížená vitalita žlutých rostlin oproti červeným (Jersákové et al. 2006b), která by mohla vysvětlit převahu červené formy v těchto populacích, byl založen pouze na vzorku dvou populací. Zvýšení počtu sledovaných lokalit a studium ve více letech výsledky předešlé studie již nepotvrdilo. Meziroční variabilita ve fitness rostlin je výrazná a tak zatímco v jedné sezóně může mít na konkrétní lokalitě větší vitalitu semen červená forma, ve druhém roce to může být přesně naopak (viz. lokalita Javorná na Obr. 8). Podobně data sebraná ze stejných dvou lokalit, na kterých byl prováděn předešlý experiment, vykazují větší podíl vitálních semen žlutě zbarvených jedinců, zatímco v roce 2002 tomu bylo naopak. Juillet et al. (2007) neuvádí žádný rozdíl v produkci semeníků

a schopnosti klíčení semen barevných forem prstnatce bezového po vzájemném umělém křížení barevných forem, což podporuje moje výsledky, že rostliny se ve svých průměrných relativních reprodukčních zdatnostech neliší. Meziroční variabilita v produkci semen může být dána především v malých populacích orchidejí místními environmentálními podmínkami a klimatickými faktory (Jacquemyn & Brys 2009).

Zjišťování viability semen pomocí tetrazoliového barvení je sice standardně užívanou metodou (van Waes & Debergh 1986, van der Kinderen 1995, Malinová 2006), má však svá úskalí a zjištěná vitalita semen nemusí dobře korelovat s reálným počtem semen, která jsou schopna vyklíčit *in situ*. Pro toto biochemické barvení je nutno nejdříve zproprustnit relativně tlusté osemení semen terestrických orchidejí vápněním. Pro stanovení optimální doby vápnění se provádí počáteční experiment, z kterého stanovíme tuto dobu jako čas, za který se obarví největší množství embryí. Semena se ale mohou lišit v míře odolnosti svého obalu, proto se potom může stát, že se část embryí v době, která je určena jako optimální, neobarví, nebo se obarví jen velmi slabě, ačkoliv jsou plně vitální. Výsledky barvení tetrazoliovou solí mohou být tedy velmi ovlivněny variabilitou ve zralosti semen a měli bychom je brát jako minimální množství semen, která jsou skutečně životaschopná. Svou roli může hrát také skladování semen. Van Waes (1984) udává, že semena terestrické orchideje kruštíku širolistého (*Epipactis helleborine*) se již nebarvila po 4 týdnech skladování při pokojové teplotě a po 12 týdnech v lednici, zatímco Malinová (2006) udává, že se semena téhož druhu barvila ještě z 20 % po 7 týdnech skladování v lednici. Proto byla semena prstnatce bezového použita pro barvení tetrazoliovou solí co nejdříve po sebrání semeníků z českých lokalit nebo dodání semeníků ze zahraničních pracovišť. Pokud ale porovnáujeme semena z jednotlivých regionů, musíme vzít také v úvahu, že všechny semeníky nemusely být sebrány ve stejném stádiu zralosti a potom méně zralá semena lze snadněji narušit vápněním díky tomu, že se zralostí semen stoupá také podíl fenolických látek v osemení, které ho činí nepropustným (Baskin & Baskin 1998). Barvení embryí tetrazoliovou solí se tedy nejeví být úplně spolehlivou metodou zjišťování viability semen, což také demonstruje bakalářská práce Malinové (2006), kdy se semena kruštíků barvila v menší míře proti výsledku klíčení těchto semen v přírodě. Proto by bylo vhodnější zkoumat viabilitu semen jinou alternativní metodou, jakou je právě klíčení semen *in situ* a *ex situ* (Malinová 2006, Juillet et al. 2007), popř. jinými chemickými metodami jako je barvení semen kyselinou fuksinovou (Vujanovic et al. 2000) nebo fluorescenčním barvivem (fluorescein diacetát) (Pritchard 1985). U fluorescein diacetátu byly dokonce potvrzeny srovnatelné výsledky s metodou klíčení semen (Wood & Pritchard 2004).

Výsledky z křížení barevných forem by mohly být také eventuelně zkrusleny možnou herbivorí listů rostlin, protože víme, že odlistění tohoto druhu má vliv na reprodukční úspěšnost rostlin, a to zejména na tvorbu semen (Pellegrino & Musacchio 2006). V terénu jsme ale žádný takový jev nezaznamenali a předpokládáme, že i kdybychom si herbivorie listů v terénu u některých jedinců nepovšimli, zřejmě by to zásadním způsobem výsledky nezkruslilo, díky dostatečnému množství opakování.

4.2 Vliv abiotických faktorů na frekvenci barevných forem v populacích

Teorii o tom, že se jedné barevné formě daří lépe za zhoršených environmentálních podmínek, podporuje studie Jersákové et al. (2006b), kdy byla zjištěna na vsetínských lokalitách větší vitalita semen červené formy v roce 2002. Podle těchto výsledků by se mohlo červené formě dařit lépe než žluté formě v letech, kdy je větší sucho, a to zejména v květnu a v červnu, což jsou měsíce, které hrají roli v dozrávání semeníků. Tyto měsíce byly na Vsetínsku v roce 2002 chudšími na srážky narozdíl od let 2006 a 2007 (Příloha 2), v kterých byl prováděn tento opylovací experiment, mimo jiné na dvou stejných lokalitách jako v roce 2002. Z výsledků mé diplomové práce ale naopak vyplývá, že frekvence červené formy v populaci stoupá se schopností půdy zadržet vodu – jako jsou retenční vodní kapacita (schopnost půdy krátkodobě zadržet vodu) a maximální kapilární vodní kapacita (schopnost půdy zadržet vodu z dlouhodobějšího hlediska). Červené formě by se tedy podle těchto výsledků mělo dařit lépe na místech, která tolik nevysychají. Příčinou by mohl být fakt, že tmavší barva více akumuluje teplo, proto by červené rostliny mohly mít větší nároky na vodu. Na stanovištích s vysýchavou půdou by pak v případě sucha měla výhodu žlutá forma, zatímco v letech bohatších na srážky by si mohly červené formy dovolit více transpirovat, tedy i hromadit více asimilátů, a investovat více do semen. Tato teorie založená na půdních hydrolimitách se ale neshoduje s výsledky z let 2006 a 2007, kdy ačkoliv bylo dostatek srážek, žlutá forma měla přesto větší fitness. Výsledky mé práce nekorespondují ani s alternativním tvrzením, že se tmavěji zbarveným rostlinám obsahujícím anthokyanová barviva daří lépe v období vodního stresu (Schemske & Bierzychudek 2001, Warren & Mackenzie 2001). Ačkoliv není znám přesný mechanismus, proč by měly mít tmavší formy výhodu ve stresových podmínkách, předpokládá se, že výroba anthokyanů by mohla být spojena se syntézou příbuzných sloučenin, flavonoidů, které mají antioxidační účinky, díky kterým by rostlina mohla redukovat množství volných radikálů, které se v takových podmínkách tvoří (Gould et al. 1995). Jiná teorie je spjata s efektem, kdy tmavší formy

redukuje celkově příjem iontů, aby se v suchém období, kdy se prvky koncentrují v půdě, vyhnuly většímu příjmu pro ně nežádoucích iontů. Potom mají v období sucha větší fitness než formy světlé, které s větším příjmem iontů koncentrují ve svých tkáních více hořčíku a selenu (potenciálně toxických kationtů) (Schemske & Bierzychudek 2001).

Polymorfismus v barvě květu se nejvíce vyskytuje u rostlin, které obsahují anthokyanová barviva (Warren & Mackenzie 2001). Víme, že pH může ovlivnit výsledné zbarvení květních částí, které obsahují anthokyanové pigmenty. Tato práce nepotvrdila domněnku o ovlivňování frekvence barevných forem prstnatce bezového půdním pH. V Německu a v Rakousku převládá v populacích žlutá forma na kyselých půdách a stejně tak se francouzské výrazně „žluté“ lokality prstnatce bezového vyznačují slabě kyselými půdami. V italských populacích převládají také žlutě zbarvení jedinci, ale jejich zastoupení se zvyšuje se zvyšujícím se pH půdy. Výsledky tedy potvrzují, že druh roste spíše na kyselých půdách (Procházka & Velisek 1983), ale můžeme ho nalézt i na půdách slabě kyselých až neutrálních (Jatiová & Šmiták 1996), jak tomu je v případě některých francouzských lokalit (Obr. 10). Přestože nebyly nalezeny rozdíly v pH půd odebraných zvlášť u červených a žlutých jedinců, bylo by lepší (ale i časově náročnější) pro případný další výzkum tohoto problému, nedělat vždy jeden směsný vzorek na lokalitu zvlášť od žlutých a od červených jedinců, ale změřit pH půd jednotlivých odebraných vzorků.

4.3 Vliv velikosti populace na barevnou odchylku 1:1

Z výsledků je také patrné, že zastoupení barevných forem prstnatce bezového v populacích nelze vysvětlit velikostí populace (Obr. 9). Domnívali jsme se, že v malých populacích by se mohla uplatňovat teorie genetického driftu, kdy se náhodným posunem frekvence alel v populaci může některá ztratit, takže malé populace prstnatce bezového mohou být o alely jedné barvy ochuzené. Je známo, že genetický drift hraje určitou roli především v populacích s malou efektivní velikostí populace a nedostatečnou výměnou genetického materiálu, jako je tomu např. u endemických druhů orchidejí rodu *Lepanthes* (Tremblay & Ackerman 2001). V malých populacích prstnatce bezového by se navíc mohlo uplatňovat asortativní (výběrové) křížení způsobené opylovači (Jones & Reithel 2001). Takto by mohlo dojít ke vzniku populací s nevyváženým poměrem barevných forem. Efekt velikosti populace na odchylku od poměru barevných forem 1:1 byl již testován v rámci jiné studie, a to také s negativním výsledkem, avšak na výrazně menším počtu populací; 20 versus 101 (Jersáková et al. 2006b).

4.4 Alternativní netestované hypotézy

Odlišně zbarvené populace by mohly být také možným výsledkem rozdílných vrozených preferencí opylovačů v různých zeměpisných oblastech (Smithson & Macnair 1997). Na jedné z lokalit v Beskydech byl sledován přenos barevně značeného pylu (Máslar 2007), který ukázal, že pohyb opylovačů mezi oběma formami není náhodný. Opylovači se častěji pohybovali mezi červenými formami než žlutými a většina pylu transportovaného jak z červených tak žlutých donorů končila opět na červených rostlinách. Tento výsledek vyvrací existenci selekce negativně závislé na frekvenci a podporoval by spíše teorii o preferenci hojnější barevné formy opylovači (Smithson 1996), která ovšem platí za předpokladu, že rostlina nabízí opylovačům odměnu. V našem případě by mohlo jít buď o vrozené nebo získané preference opylovačů. Bylo zjištěno, že čmelák zemní (*Bombus terrestris*), který je jedním z hlavních opylovačů prstnatce bezového na Vsetínsku (Jersáková et al. 2006b), vykazuje, coby mladý nezkušený opylovač, velkou preferenci pro fialovou a modrou barvu (Raine & Chittka 2007), a to přes celý jeho geografický areál (Chittka et al. 2004, Raine et al. 2006).

Určitou roli v preferencích opylovačů pro jednu z barevných forem prstnatce bezového mohou hrát z lokálního hlediska druhy s nektarem, které kvetou na společně s touto orchidejí, a jejichž převládající barva by mohla ovlivňovat potravní chování opylovačů (Pellegrino et al. 2008). Např. byl zjištěn negativní vliv žlutě kvetoucí prvosenky jarní (*Primula veris*) na odnos pylu ze žlutých forem prstnatce bezového na společných vsetínských lokalitách (Jersáková et al. 2006b). Podle této studie velké množství rostlin stejné barvy jako má určitá forma prstnatce bezového, neprospívá takové formě na společné lokalitě, zejména co se týká samčí reprodukční úspěšnosti.

Pokud odhlédneme od všech zmiňovaných hypotéz, naskýtá se tu ještě otázka, zda není četnost barevných forem determinována pouze geneticky. Rozdíly v četnostech barevných forem pak mohou být důsledkem toho, že populace, které si jsou geograficky blízké, si jsou i geneticky podobné, a proto mají i podobnou četnost příslušných květních forem a naopak. O dědičnosti barevných forem prstnatce bezového se zatím moc neví. Vzhledem k tomu, že se tvoří i kříženci s lososovou barvou květu, bude se zřejmě jednat o nějakou formu kodominance (Snustad & Simmons 2009). V budoucnu by bylo užitečné najít vhodné molekulární markery, pomocí kterých bychom mohli např. prozkoumat barevné složení potomstva vzniklého z křížení obou barevných forem.

5 Závěr

Prstnatec bezový je evropský druh orchideje, který je modelovým organismem z hlediska zkoumání mechanismů udržujících polymorfismus v barvě květu. V rámci Evropy nalezneme populace s různým zastoupením červené a žluté barevné formy. Tato práce se zabývala zkoumáním vlivu vybraných abiotických faktorů (půdního pH, půdních hydrolimit, sklonu a nadmořské výšky stanoviště), biotických faktorů (váha a životaschopnost semen získaných umělým křížením barevných forem) a velikosti populace na fenotypové složení vybraných evropských populací, a to v České republice, Německu, Rakousku, Francii a Itálii.

Výsledky práce ukazují vliv vybraných hydrolimit, a to zejména retenční vodní kapacity, na větší frekvenci červené formy v populacích. Tato skutečnost by mohla být dána tím, že červeně zbarvené rostliny se hůře vyrovnávají se stresem způsobeným suchem, proto vyhledávají místa, která dokáží více zadržet vodu.

Dále se podařilo potvrdit, že prstnatec bezový roste spíše na kyselých půdách, ale pH celkově nemá vliv na barevné složení populací. Stejně tak se nepodařilo potvrdit další hypotézu o mechanismu, který by mohl udržovat barevný polymorfismus, kterou je vliv křížení barevných forem na životaschopnost semen. Viabilita semen z lokalit o různých frekvencích barevných forem nevykazovala žádný trend. Rozdílné zastoupení barevných forem tohoto druhu nebylo vysvětleno ani velikostí populace, kde existoval předpoklad, že v malých populacích může hrát roli genetický drift.

Je tedy možné, že frekvence barevných forem v populacích prstnatce bezového jsou do určité míry podmíněny chováním opylovačů a také genetickým pozadím daného jevu.

6 Literatura

- Ackerman, J. D. (1986): Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1: 108-113.
- Aragón, S. & Ackerman, J. D. (2004): Does flower color variation matter in deception pollinated *Psychilis monensis* (Orchidaceae)? *Oecologia* 138: 405-413.
- Atanassova, B., Shtereva, L. & Molle, E. (1997): Effects of three anthocyaninless genes on germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 2. Seed germination under stress conditions. *Euphytica* 97: 31-38.
- Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (1998): Seeds, ecology, biogeography and evolution of dormancy, and germination. Academic Press. San Diego.
- Baumann, H., Künkele, S. & Lorenz, R. (2009): Orchideje Evropy a přilehlých oblastí. Academia, Praha.
- Bond, A. B. (2007): The evolution of color polymorphism: crypticity, searching images, and apostatic selection. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 489-514.
- Bonguebartelsman, M. & Phillips, D. A. (1995): Nitrogen stress regulates gene-expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic-pathway of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 539-546.
- Buttler, K. P. (2000): Orchideje. Planě rostoucí druhy a poddruhy Evropy, Přední Asie a severní Afriky. Ikar. Praha.
- Chittka, L., Ings, T. C. & Raine, N. E. (2004): Chance and adaptation in the evolution of island bumblebee behaviour. *Population Ecology* 46: 243-251.
- Clegg, M. T. & Durbin, M. L. (2000): Flower color variation: A model for the experimental study of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 7016-7023.
- Dafni, A. (1984): Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 259-278.
- Dafni, A. (1986): Floral mimicry - mutualism and unidirectional exploitation of insect by plants. *Insect and the Plant Surface* (eds. B. Juniper & R. Southwood), pp. 81-90. Edward Arnold Ltd, London.
- Delforge, P. (2006): Orchids of Europe, North Africa and the Middle East. A. & C. Black, London.
- Dressler, R. (1993): Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Cambridge, Massachusetts.

- de Jong, T. J., Waser, N. M. & Klinkhamer, P. G. L. (1993): Geitonogamy: the neglected side of selfing. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 321-325.
- Dormont, L., Delle-Vedove, R., Bessiere, J. M., Hossaert-Mc Key, M. & Schatz, B. (2010): Rare white-flowered morphs increase the reproductive success of common purple morphs in food-deceptive orchid. *New Phytologist* 185: 300-310.
- Dukas, R. & Real L. A. (1993): Effects of recent experience on foraging decisions by bumblebees. *Oecologia* 94: 244-246.
- Dykyjová, D. (2003): Ekologie středoevropských orchidejí. Kopp, České Budějovice.
- Ferdy, J. B., Gouyon, P. H., Moret, J. & Godelle, B. (1998): Pollinator behaviour and deceptive pollination: learning process and floral evolution. *American Naturalist* 152: 696-705.
- Flegr, J. (2005): Evoluční biologie. Academia, Praha.
- Gigord, L. D. B., Macnair, M. R. & Smithson, A. (2001): Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6253-6255.
- Gigord, L. D. B., Macnair, M. R., Střiteský, M. & Smithson, A. (2002): The potential for floral mimicry in rewardless orchids: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 269: 1389-1395.
- Goto, T. & Kondo, T. (1991): Structure and molecular stacking of anthocyanins – flower color variation. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 30: 17-33.
- Gould, K. S., Kuhn, D. M., Lee, D. W. & Oberbauer, S. F. (1995): Why leaves are sometimes red. *Nature* 378: 241-242.
- Gumbert, A. & Kunze, J. (2001): Colour similitary to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 419-433.
- Hajduchová, K. (2009): Vliv způsobu hospodaření na velikost populací *Dactylorhiza sambucina* a její rozšíření na Vsetínsku, bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Harder, L. D. (2000): Pollen dispersal and the floral diversity of Monocotyledons. *Monocots: Systematics and Evolution* (eds. K. L. Wilson & D. Morrison), pp. 243-257. CSIRO Publishing, Melbourne.
- Heinrich, B. (1975): Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution* 29: 325-334.
- Heinrich, B. (1979): Bumblebee economics. Harvard University Press, Cambridge.

- Heinrich, B. (1983): Insect foraging energetics. *Handbook of experimental pollination biology* (eds. C. E. Jones & R. J. Little), pp. 187-214. Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York.
- Holub, J. & Procházka, F. (2000): Červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000), *Preslia* 72: 187-230.
- Internicola, A. I., Juillet, N., Smithson, A. & Gigord, L. D. B. (2006): Experimental investigation of the effect of spatial aggregation on reproductive success in a rewardless orchid. *Oecologia* 150: 435-441.
- Internicola, A. I., Page, P. A., Bernasconi, G. & Gigord, L. D. B. (2007): Competition for pollinator visitation between deceptive and rewarding artificial inflorescences: an experimental test of the effects of floral colour similarity and spatial mingling. *Functional Ecology* 21: 864-872.
- Internicola, A. I., Page, P. A., Bernasconi, G. & Gigord, L. D. B. (2009): Carry-over effects of bumblebee associative learning in changing plant communities leads to increased costs of foraging. *Arthropod-Plant Interactions* 3: 17-26.
- Internicola, A. I., Bernasconi, G. & Gigord, L. D. B. (2008): Should food-deceptive species flower before or after rewarding species? An experimental test of pollinator visitation behaviour under contrasting phenologies. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1358-1365.
- Jacquemyn, H. & Brys, R. (2009): Large population sizes mitigate negative effects of variable weather conditions on fruit set in two spring woodland orchids. *Biology Letters* 5: 495-498.
- Jatiová, M. & Šmiták, J. (1996): Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a ve Slezsku. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Brno.
- Jersáková, J. (1998): Srovnání reprodukce deceptivních a nedeceptivních orchidejí. *Európske vstavačovité (Orchidaceae)-výskum a ochrana II* (eds. J. Vlčko & R. Hrivnák), pp. 43-50. Technická univerzita vo Zvolene, Zvolen.
- Jersáková, J. & Kindlmann, P. (2004): Zásady péče o orchidejová stanoviště. Kopp, České Budějovice.
- Jersáková, J. & Johnson, S. D. (2006): Lack of floral nectar reduces self-pollination in a fly pollinated orchid. *Oecologia* 147: 60-68.
- Jersáková, J., Johnson, S. D. & Kindlmann, P. (2006a): Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* 81: 219-235.
- Jersáková, J., Kindlmann, P. & Renner, S. S. (2006b): Is the colour dimorphism in *Dactylorhiza sambucina* maintained by differential seed viability instead of frequency-dependent selection? *Folia Geobotanica* 41: 61-76.

- Johnson, S. D. (2000): Batesian mimicry in the nonrewarding orchid *Disa pulchra*, and its consequence for pollinator behaviour. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 119-132.
- Johnson, S. D. & Edwards, T. (2000): The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution* 222: 243-269.
- Johnson, S. D., Peter, C. I. & Nilsson, L. A. (2003): Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology* 84: 2919-2927.
- Jones, K. N. & Reithel, J. S. (2001): Pollinator-mediated selection on a flower color polymorphism in experimental populations of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 88: 447-454.
- Juillet, N., Dunand-Martin, S. & Gigord, L. D. B. (2007): Evidence for inbreeding depression in the food-deceptive colour-dimorphic orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Plant Biology* 9: 147-151.
- Kindlmann, P. & Jersáková, J. (2006): Effect of floral display on reproductive success in terrestrial orchids. *Folia Geobotanica* 41: 47-60.
- Koivisto, A., Vallius, E. & Salonen, V. (2002) : Pollination and reproductive success of two colour variants of a deceptive orchid, *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* 22: 53-58.
- Kropf, M. & Renner, S. S. (2005): Pollination success in monochromic yellow populations of the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina*. *Plant Systematics and Evolution* 254: 185-197.
- Kullenberg, B. (1961): Studies in *Ophrys* pollination. *Zoologiska Bidrag fran Upsala* 34: 1-340.
- Lack, A. J. & Kay, Q. O. N. (1988): Allele frequencies, genetic relationships and heterozygosity in *Polygala vulgaris* populations from contrasting habitats in southern Britain. *Biological Journal of the Linnean Society* 43: 119-147.
- Lepš, J. (1996): Biostatistika. Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Malinová, T. (2006): Průběh klíčení a mykorhizní asociace čtyř druhů rodu *Epipactis*, bakalářská práce. Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Másler, Z. (2007): Ekologie prstnatce bezového (*Dactylorhiza sambucina* L. Soó), Je barevná polymorfie *Dactylorhiza sambucina* ovlivňována aciditou půdy a vlivem vzdálenosti spolukvetoucích rostlin na reprodukční úspěšnost jeho barevných variant?, maturitní práce. Střední odborná škola a Střední odborné učiliště Hořovice, Hořovice.
- Neiland, M. R. M. & Wilcock, C. C. (1998): Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657-1671.

- Nilsson, L. A., (1980): The pollination ecology of *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae). *Botanical Notiser* 133: 367-385.
- Nilsson, L. A. (1992): Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 255-259.
- Oren-Shamir, M. & Levi-Nissim, A. (1997): Temperature effects on the leaf pigmentation of *Cotinus coggygria* 'Royal Purple'. *Journal of Horticultural Science* 72: 425-432.
- Pellegrino, G., Caimi, D., Noce, M. E. & Musacchio, A. (2005a): Effects of local density and flower colour polymorphism on pollination and reproduction in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Plant Systematics and Evolution* 251: 119-129.
- Pellegrino, G. & Bellusci, F. (2009): Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae). *Biologia* 64: 893-897.
- Pellegrino, G., Bellusci, F. & Musacchio, A. (2005b): Evidence of post-pollination barriers among three colour morphs of the deceptive orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. *Sexual Plant Reproduction* 18: 179-185.
- Pellegrino, G., Bellusci, F. & Musacchio, A. (2008): Double floral mimicry and the magnet species effect in dimorphic co-flowering species, the deceptive orchid *Dactylorhiza sambucina* and rewarding *Viola aethnensis*. *Preslia* 80: 411-422.
- Pellegrino, G. & Musacchio, A. (2006): Effect of defoliation on reproductive success in two orchids, *Serapias vomeracea* and *Dactylorhiza sambucina*. *Annales Botanici Fennici* 43: 123-128.
- Petterson, B. & Nilsson, L. A. (1993): Floral variation and deceit pollination in *Polystachya rosea* (Orchidaceae) on an inselberg in Madagascar. *Opera Botanica* 121: 237-245.
- Pokorný, E., Šarapatka, B. & Hejátková, K. (2007): Hodnocení kvality půdy v ekologicky hospodařícím podniku, Metodická pomůcka. ZERA – Zemědělská a ekologická regionální literatura, o.s., Náměšť nad Oslavou.
- Primack, R. B., Kindlmann, P. & Jersáková, J. (2001): Biologické principy ochrany přírody. Portál, Praha.
- Pritchard, H. W. (1985): Determination of orchid seed viability using fluorescein diacetat. *Plant, Cell and Environment* 8: 727-730.
- Procházka, F. (1980): Naše orchideje. Krajské museum východních Čech – pracoviště Pardubice, Pardubice.
- Procházka, F. & Velisek, V. (1983): Orchideje naší přírody. Academia, Praha.
- Průša, D. (2005): Orchideje České republiky. Computer Press. Brno.

- Raine, N. E. & Chittka, L. (2007): The adaptive significance of sensory bias in a foraging context: floral colour preferences in the bumblebee *Bombus terrestris*. *PLoS One*, 2: e556.
- Raine, N. E., Ings, T. C., Dornhaus, A., Saleh, N. & Chittka, L. (2006): Adaptation, genetic drift, pleiotropy, and history in the evolution of bee foraging behavior. *Advances in the Study of Behavior* 36: 305-354.
- Real, L., Ellner, S. & Harder, L. D. (1990): Short-term energy maximisation and risk-aversion in bumblebees: a reply to Possingham et al. *Ecology* 71: 1625-1628.
- Renner, S. S. (2006): Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition on their evolution. *Plant-Pollinator Interactions: From Specialization to Generalization* (eds. N. M. Waser & J. Olerton), pp. 123-144. University of Chicago Press, Chicago.
- Ridley, M. (1996): The theory of natural selection. *The theory of natural selection* (ed. M. Ridley), pp. 121-123. Blackwell, Cambridge.
- Roy, B. A. & Widmer, A. (1999): Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon. *Trends in Plant Science* 4: 325-330.
- Schemske, D. W. & Bierzychudek, P. (2001): Perspective: Evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*: Wright revisited. *Evolution* 55: 1269-1282.
- Smithson, A. (2001): Pollinator preference, frequency dependence, and floral evolution. *Cognitive ecology of pollination: Animal behaviour and evolution* (eds. L. Chittka & J. D. Thomson), pp. 237-257. Cambridge University Press, Cambridge.
- Smithson, A. (2009): A plant's view of cheating in plant-pollinator mutualisms. *Israel Journal of Plant Sciences* 57: 151-163.
- Smithson, A. & Macnair, M. R. (1996): Frequency-dependent selection by pollinators: Mechanisms and consequences with regard to the behaviour of bumblebees *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Evolutionary Biology* 9: 571-588.
- Smithson, A. & Macnair, M. R. (1997): Negative frequency-dependent selection by pollinators on artificial flowers without rewards. *Evolution* 51: 715-723.
- Snustad, D. P. & Simmons, M. J. (2009): Genetika. Masarykova univerzita, Brno.
- StatSoft, Inc. (1984-2009): Statistica (data analysis software system), version 9.0. Tulsa, USA, www.statsoft.com.
- ter Braak, C. J. F. & Šmilauer, P. (2002): *CANOCO* reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Biometris, Wageningen.
- Tremblay, R. L. & Ackerman, J. D. (2001): Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 47-62.

- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. & Calvo, R. N. (2005): Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: A spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54.
- van der Cingel, N. A. (1995): An atlas of orchid pollination. European orchids. A. A. Balkema, Rotterdam.
- van der Kinderer, G. (1995): A method for the study of field germinated seeds of terrestrial orchids. *Lindleyana* 10: 68-73.
- van Waes, J. M. (1984): *In vitro* studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideën, PhD. diplomová práce. Univerzita Gent. [non vidi]
- van Waes, J. M. & Deberg, P. C. (1986): Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* 66: 435-442.
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D. & Thibeault, G. (2000): Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany* 86: 79-86.
- Warren, J. & Mackenzie, S. (2001): Why are colour combinations not equally represented as flower-colour polymorphisms? *New Phytologist* 151: 237-241.
- Weiss, M. R. (1995): Floral color change: a widespread functional convergence. *American Journal of Botany* 82: 167-185.
- Wood, C. B. & Pritchard, H. W. (2004): Determination of intra-specific variation in orchid seed viability using fluorescein diacetate. *Seed Science and Technology* 32: 629-635.
- Yoshida, K., Toyama-Kato, Y., Kameda, K. & Kondo, T. (2003): Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrod. *Plant and Cell Physiology* 44: 262-268.
- Zbiral, J., Honsa, I. & Malý, S. (1997): *Analýza půd III. Jednotné pracovní postupy*, pp. 107-118. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Brno.

7 Přílohy

Příloha 1

Seznam lokalit, z nichž byla sebrána data pro tento experiment. (N – severní šířka, E – východní délka, m n. m. – nadmořská výška lokality, pH – vodné, RVK – retenční vodní kapacita (% obj.), MKVK – maximální kapilární vodní kapacita (% obj.))

Česká republika

Kód lokality	Název lokality	N	E	m n. m.	pH	RVK	MKVK
CD	Černý Dvůr - Krkonoše	50°38'34.9"	15°42'40"	692	5,0	27,1	34,1
COT2	U Čotků 2*	49°17'31.5"	18°08'42.3"	467	5,4	45,8	50,7
COT3	U Čotků 3	49°17'32.7"	18°08'27.9"	630	5,3	43,2	48,7
G1	Galovské lúky 1	49°16'48.8"	18°07'06.1"	733	5,2	48,1	54,4
G2	Galovské lúky 2	49°16'44.6"	18°07'18.6"	748	5,4	42,6	47,5
G3	Galovské lúky 3	49°16'45.9"	18°07'27.0"	734	5,1	37,9	42,7
G4	Galovské lúky 4	49°16'43.7"	18°07'28.6"	753	5,3	35,5	40,2
G5	Galovské lúky Hrachovec*	49°16'52.4"	18°07'21.2"	745	5,2	44,6	50,2
JAN	U Jančů	49°16'34.5"	18°07'55.9"	702	5,6	42,0	47,1
JAV	Louky pod Javornou*	49°17'22.2"	18°08'27.1"	664	5,9	38,8	44,5
JK	Javorník - Šumava	49°07'43.9"	13°39'35.34"	895	5,3	24,8	30,7
KRI1	Křižný 1	49°21'50.8"	18°08'34.5"	672	5,3	39,5	44,1
KRI2	Křižný 2	49°21'51.9"	18°08'39.5"	691	5,3	39,7	44,1
KRI5	Křižný 5	49°21'56.0"	18°08'58.6"	599	5,2	35,8	39,7
LOU	Louchov - Krušné hory	50°25'24.7"	13°11'20.4"	530	4,8	-	-
PIL	Včelná pod Boubínem u pily	49°1'8.98"	13°51'16.09"	900	4,8	31,0	37,4
RAD	Radešov	49°14'40.8"	18°04'30.9"	861	5,2	40,7	45,5
RET	Řenenice - Šumava	49°07'52.6"	13°36'14.44"	880	4,9	28,5	35,9
SIV	U Sivků	49°19'18.7"	18°05'50.9"	676	5,7	40,1	44,4
SK1	Sklenářovice 1 - Krkonoše	50°38'35.53"	15°51'14.18"	821	5,0	29,6	35,0
SK2	Sklenářovice 2 - Krkonoše	50°38'32.21"	15°51'24.69"	813	5,0	-	-
SR	Srní – Krušné hory	50°22'20.6"	13°03'31.7"	690	4,7	-	-
SS	Slunečná stráň - Krkonoše	50°38'0.26"	15°49'34.87"	645	5,3	44,3	50,0
STD	Štědroňov	49°14'44.8"	18°03'04.7"	595	5,4	42,5	47,0
TRT	U Trtíků	49°16'12.8"	18°06'05.1"	582	5,3	45,5	49,9
ZAK1	Zákopčí*	49°25'17.6"	18°11'38.3"	653	5,7	32,1	38,2
ZAK2	Zákopčí (nad cesou)	49°25'18.4"	18°11'41.9"	675	5,5	30,6	35,5
ZK2	Zbeličné kopečky 2	49°17'43.0"	18°07'02.1"	562	5,6	30,7	35,9

* Lokality, na kterých byl prováděn opylovací experiment.

Francie

Kód lokality	Jméno lokality	N	E	m n. m.	pH
FRDS1	La Pezade-Canals	43°89'72.6"	43°89'72.6"	781	7,8
FRDS10	Col de la Seyrrière	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1300	6,5
FRDS11	Laupiettes-Dourbies	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1001	5,7
FRDS12	Laupiettes-Dourbies 2	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1057	5,0
FRDS13	L'airiette-L'espérou	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1255	5,9
FRDS14	Luge-L'espérou	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1207	5,5
FRDS15	Pré-Lac des Pises	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1238	4,9
FRDS16	La Roquarie	43°89'72.6"	43°89'72.6"	944	7,6
FRDS17	Bois de Licide	43°89'72.6"	43°89'72.6"	904	7,6
FRDS18	Randals-Foulquarié	43°89'72.6"	43°89'72.6"	861	7,7
FRDS19	Latour-Lanuéjols	43°89'72.6"	43°89'72.6"	921	8,1
FRDS2	Labastide-LesRives	43°89'72.6"	43°89'72.6"	832	6,5
FRDS20	Les Mazes-Lanuéjols	43°89'72.6"	43°89'72.6"	961	7,5
FRDS3	Labastide-LesRives	43°89'72.6"	43°89'72.6"	841	6,5
FRDS3BIS	Les sièges	43°89'72.6"	43°89'72.6"	839	5,8
FRDS4	L'espérou	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1243	4,9
FRDS5	Camprieu vers StSauv.	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1066	6,4
FRDS6	Après Villemagne	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1097	5,3
FRDS7	Perte du Bonheur	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1097	6,5
FRDS8	Le Devois-Camprieu	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1111	5,7
FRDS9	Baraque vieille-Camprieu	43°89'72.6"	43°89'72.6"	1147	6,5

Itálie

Kód lokality	Jméno lokality	N	E	m n. m.	pH
IT1	-	39°21'19,3"	16°31'34,5"	1149	6,0
IT2	-	39°18'22,4"	16°25'37,7"	1690	5,4
IT3	-	39°18'08,1"	16°25'43,1"	1685	5,6
IT4	-	39°17'53,1"	16°26'14,1"	1680	5,5
IT5	-	39°18'02,26"	16°26'02,8"	1676	5,0
IT6	-	39°22'19,5"	16°31'49,2"	1180	5,8
IT7	-	39°23'29,3"	16°34'40,1"	1279	6,0
IT8	-	39°23'38,8"	16°34'51,1"	1290	5,9
IT9	-	39°23'59,9"	16°28'28,6"	1159	5,9
IT10	-	39°20'09,4"	16°23'55,2"	1622	5,5
IT11	-	39°19'55,7"	16°23'51,0"	1642	5,7
IT12	-	39°19'14,2"	16°24'00,7"	1702	5,8
IT13	-	39°18'47,9"	16°24'11,6"	1709	5,0
IT14	-	39°18'38,8"	16°24'59,1"	1689	5,4
IT15	-	39°18'41,5"	16°24'55,6"	1705	5,3
IT16	-	39°20'04,1"	16°23'50,3"	1625	4,9
IT17	-	39°21'3"	16°31'5"	1149	5,1
IT18	-	45°59'21,4"	11°19'27,7"	1510	5,8
IT19	-	45°57'08,1"	11°24'23,3"	1240	5,6
IT20	-	45°56'43,2"	11°21'14,4"	1250	5,7

Německo

Kód lokality	Jméno lokality	N	E	m n. m.	pH
G1g	Harsten, západní svah	49°48'09" N	07°45'49" E	275	4,3
G2g	Harsten, na vrcholu východně	49°48'09" N	07°46'04" E	290	4,8
G3g	Schwarzfels, vrchol	49°39'13" N	07°57'02" E	420	4,3
G4g	Drosselfels, úpatí	49°39'28" N	07°57'12" E	445	4,3
G5g	Auf dem Bäder, vrchol	49°48'27" N	07°54'03" E	230	4,4
G6g	Auf dem Bäder, sousední vršek	49°48'35" N	07°54'08" E	220	5,9
G7g	Katharinenwald	49°48'36" N	07°53'39" E	270	4,4
G8g	Siefersheimer Höll	49°47'26" N	07°57'22" E	225	4,4
G9g	Vogelgesang, neobděláný svah	49°47'37" N	07°54'56" E	200	4,8
G10g	Vogelgesang, vrchol	49°47'41" N	07°54'54" E	230	5,6
G11g	Ölberg, severní svah	49°48'25" N	07°56'36" E	270	4,7
G12g	Höllberg	49°48'02" N	07°56'23" E	175	5,1
G13g	Dämmerberg	49°48'49" N	07°53'24" E	260	4,4
G14g	Berlachsberg	49°47'31" N	07°53'49" E	215	5,0
G15g	Götzenfels	49°49'14" N	07°49'59" E	290	4,8
G16g	Rotenfels, vrchol	49°49'03" N	07°50'05" E	320	4,5
G17g	NSG Haarberg	49°48'22" N	07°55'32" E	180	4,7
G18g	GLB Haarberg	49°48'27" N	07°55'27" E	180	5,1
G19g	Bremroth, střed	49°46'58" N	07°50'44" E	270	4,5
G20g	Bremroth, východ	49°46'59" N	07°50'49" E	270	4,2
G21g	Bremroth, západ	49°46'59" N	07°50'40" E	270	4,8

Rakousko

Kód lokality	Jméno lokality	N	E	m n. m.	pH
G-C-2G-AU	Glashütten C	48°03'05" N	16°01'18" E	540	5,6
GAR3AU	Glashütten A	48°03'28" N	16°01'24" E	515	5,9
GB4RAU	Glashütten B	48°03'18" N	16°01'14" E	535	6,0
GNGAU	Groisbach, severní svah	48°02'43" N	16°03'47" E	453	5,6
GSGAU	Groisbach, jižní svah	48°02'39" N	16°03'42" E	459	4,7
H1AU	Hocheck	48°04'30" N	16°07'30" E	420	4,7
R1gAU	Gollitsch	48°45'15" N	15°56'32" E	310	4,8
R2GAU	Mittelberg	48°45'25" N	15°56'00" E	295	4,8
R3gAU	Parapluieberg	48°45'55" N	15°56'07" E	335	5,1
W1gAU	Voitsau	48°25'50" N	15°19'20" E	750	6,1
W2gAU	Münichreith, vrchol	48°24'00" N	15°17'48" E	820	5,5
W3gAU	Leopolds	48°25'30" N	15°17'43" E	770	5,2
W4gAU	Münichreith, svah	48°24'08" N	15°17'19" E	770	5,5
W5gAU	Wernhies, svah	48°24'00" N	15°21'10" E	680	5,1

Příloha 2

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

