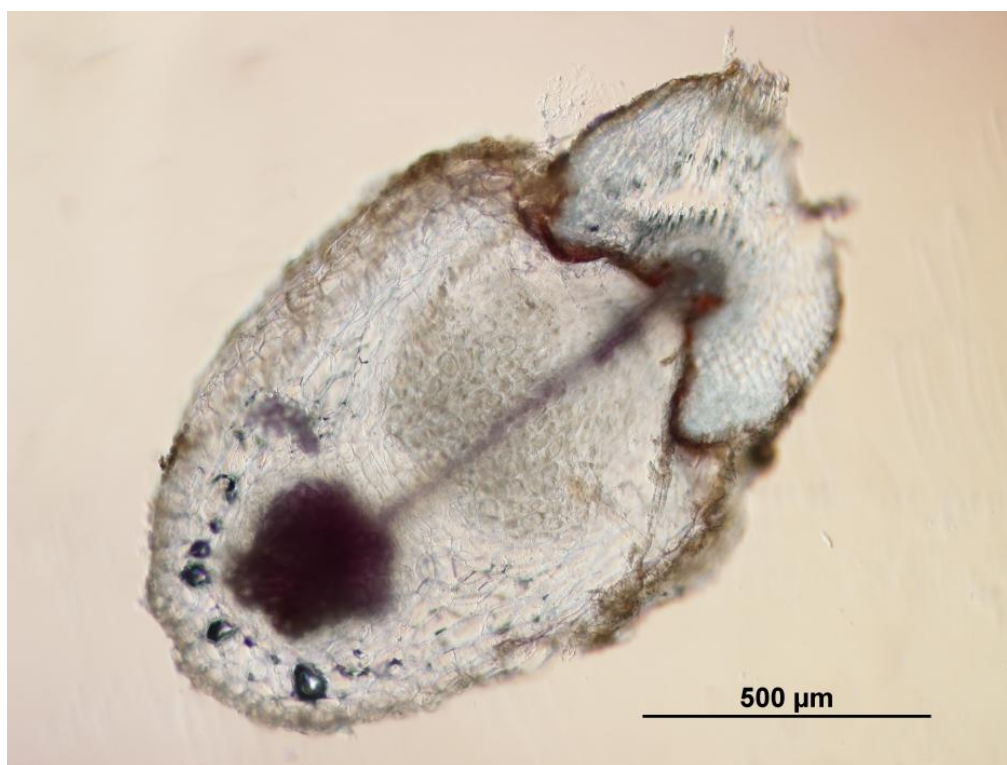


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Vybrané aspekty ekologie

Pedicularis sylvatica



Diplomová práce

Bc. et Bc. Petra Ebermannová

Školitel: RNDr. Jakub Těšitel, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Eva Holá, Ph.D.; prof. RNDr. Jan Lepš, CSc.

České Budějovice 2015

Ebermannová P. (2015): Vybrané aspekty ekologie *Pedicularis sylvatica*. [Selected aspects of ecology *Pedicularis sylvatica*. Mgr Thesis in Czech.] p. 43 Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The thesis deals with hemiparasitic species *Pedicularis sylvatica* (Orobanchaceae). The species was monitored in 2014 and 2015 for important aspects of its biology (host spectrum and interactions with the plant community). Identity of the host was determined using the DNA barcoding method.

Studie byla podpořena grantovými projekty: GA ČR 31-P505/12/1390

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou] elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. prosince 2015

.....

Petra Ebermannová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své konzultantce Evě Holé, která se mnou měla neskutečnou trpělivost a zasvětila mě do tajů molekulární biologie. Moc bych chtěla poděkovat také svému školiteli Jakubu Těšitelovi, bez něhož by se tato práce vůbec neuskutečnila. Dále bych ráda poděkovala Šárce Jiráské za úžasnou pomoc v terénu a Alžbětě Hesounové za pomoc se zpracováním vzorků. V neposlední řadě mé díky patří i Jirkovi Košnarovi za poskytnutí srovnávací databáze. Konečné poděkování patří mé rodině, jež mě podporuje na studiích a mým přátelům, kteří se starali o to, abych si udržela zdravý rozum.

Obsah

Úvod	1
1.1 Vliv na společenstva	2
1.2 Vazba na hostitele	3
2 Cíle práce	5
3 Materiál a metody	6
3.1 Popis lokalit	6
3.1.1 Ohrazení	6
3.1.2 PR Zubří	7
3.2 Analýza hostitelského spektra	7
3.2.1 Sběr dat v terénu	7
3.2.2 Preparace kořenových sond	8
3.2.3 Identifikace hostitelů molekulárními metodami	9
3.2.4 Terénní experimenty a pozorování	11
3.2.5 Testování vlivu mechanické disturbance na úspěšnost výsevu <i>Pedicularis sylvatica</i>	11
3.2.6 Korelace s biomasou	12
3.2.7 Vliv <i>Pedicularis sylvatica</i> na rostlinné společenstvo	13
4 Analýza dat	14
4.1.1 Sběr dat v terénu	14
4.2 Molekulární data	15
5 Výsledky	16
5.1 Analýza hostitelského spektra	16
5.1.1 Terénní práce sběr dat v terénu	16
5.1.2 Preparace kořenových sond	17

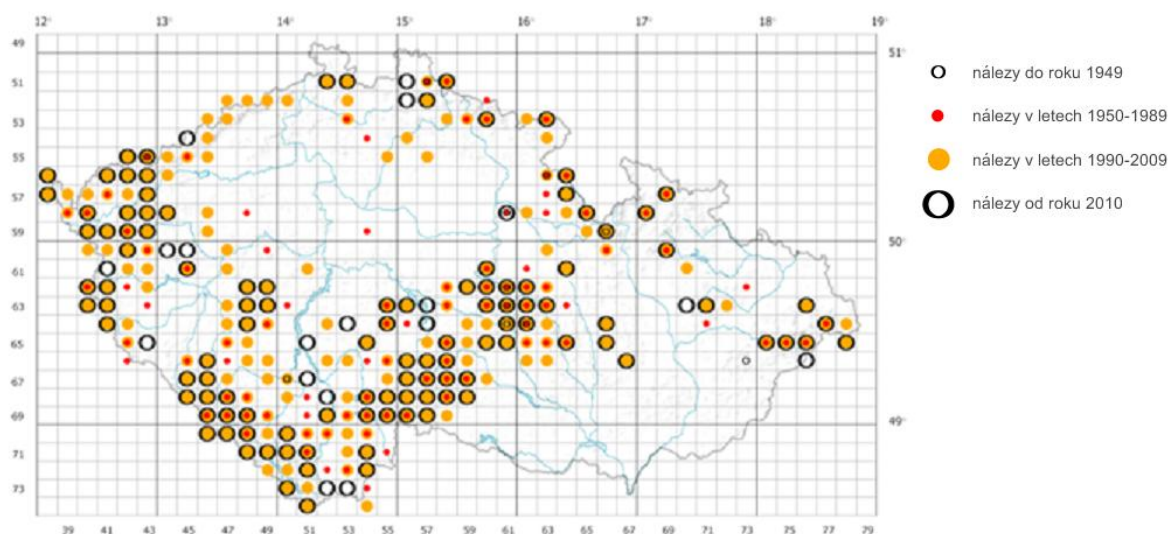
5.1.3	Identifikace hostitelů molekulárními metodami.....	18
5.1.4	Autoparazitismus.....	21
5.2	Terénní experimenty a pozorování.....	23
5.2.1	Testování vlivu mechanické disturbance na úspěšnost výsevu.....	23
5.2.2	Korelace s biomasou.....	24
5.2.3	Vliv <i>Pedicularis sylvatica</i> na rostlinné společenstvo.....	24
6	Diskuse.....	26
7	Závěr.....	30
8	Literatura.....	31
9	Přílohy.....	37

1 Úvod

Pedicularis sylvatica L. (všivec lesní) patří mezi poloparazitické rostliny z čeledi Orobanchaceae (zárázovité). Dříve byl řazen do čeledi Scrophulariaceae (krtičníkovité) (Weber 1987).

Čeď Orobanchaceae patří do řádu Lamiales, kam spadají jak nezelení parazité, tak zelení poloparazité, již se přiživují na kořenech hostitelských rostlin. V České republice se vyskytuje několik rodů, např. *Rhinanthus*, *Euphrasia*, *Odontites*, *Melampyrum*.

Poloparazité mají nejvyšší počet druhů a velmi častý výskyt v přírodních a polopřírodních loukách se špatnou dostupností živin, např. podmáčené louky (Těšitel et al. 2015). Sledovaný druh *Pedicularis sylvatica* je také vázaný na oligotrofní vlhká stanoviště, jichž množstvím i kvalitou během posledních desetiletí hodně ubývá (Obr. 1). Tyto lokality přestávají být obhospodařované a tím se zde hromadí biomasa, což podporuje šíření kompetičně silných druhů a zarůstání stromy a keři.



Obr.1: Orientační výskyt druhu *Pedicularis sylvatica* podle NDOP AOPK ČR (http://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=38600).

Podobně jako většina dalších poloparazitických druhů naší květeny je *Pedicularis sylvatica* monokarpickou rostlinou. Oproti ostatním druhům ze stejné čeledi je ale dvouletým hemikryptofytem, přezimujícím ve formě růžice listů složené v zimní pupen (Hegi 1975). V prvním roce semenáče dospějí do juvenilní růžice, která přezimuje ve formě zimního pupenu. Tato vývojová fáze semenáče je přitom nejvýznamnější pro přežívání populací.

Během ní totiž dochází k největší předčasné mortalitě, mezi jejíž hlavní faktory pravděpodobně patří kompetice s okolní vegetací. V druhém roce kvete a tvoří semena, což je důležité pro generativní množení.

Tento druh se nejčastěji vyskytuje na vlhkých, často zrašeliněných loukách a vřesovištích (Chytrý et al. 2001 a Dostál 1989). Preferuje kyselé a živinami chudé půdy. Je to konkurenčně slabý druh s vyššími nároky na světlo. Mudrák & Lepš (2010) tvrdí, že poloparazitické rostliny nemusí být vždy vázány na živinami chudší stanoviště, kde je jejich dopad na hostitele destruktivnější. Přesto je poměrně vysoký počet poloparazitických druhů rozšířených v polopřirozených mokřích loukách, které jsou na živiny chudší (Gibson & Watkinson 1992, Těšitel et al. 2015).

Pedicularis sylvatica je silně ohrožený druh C2 (Grulich 2012). Pravděpodobně proto, že mnoho lokalit zkoumaného druhu v posledních letech zaniklo vinou odvodňování, regulace vodních toků či rozorávání luk (Chán 1999) a také zarůstáním v důsledku neobhospodařování luk. *P. sylvatica* je obligátní nespecifický kořenový parazit s velkým počtem hostitelských druhů, na něž se napojuje pomocí haustorií (Weber 1976, Gibson & Watkinson 1989). Podle Maybrook (1917) dokonce parazituje i na jedincích svého vlastního druhu.

1.1 Vliv na společenstva

Některé druhy rostlin si vyvinuly kromě autotrofní výživy i poloparazitismus. Tato životní strategie pomáhá vykompenzovat ztráty v kompetici o půdní zdroje. Poloparazitické rostliny se vyznačují haustorií, což je orgán, který byl vyvinut pro penetraci kořene hostitelské rostliny; zde vytváří fyziologické spojení (Kuijt 1979). Podle Atsatt (1973) je haustorium přeměněný kořen; k přeměně došlo buď nahromaděním mutací, nebo vlivem mikrobiálního parazitismu. Haustoriové spojení propojuje cévní svazky v xylémové, dřevní části kořene poloparazita a hostitele. Propojení se nazývá xylémový můstek; přes něj dochází k přenosu látek (Irving & Cameron 2009). Podle nových studií xylémovým můstkem dochází k přenosu nejen vody a minerálních látek, ale i k přenosu organického uhlíku (Těšitel et al. 2010, Lepš & Těšitel 2015): buď přímo přes oskula (Dörr 1997) – malé trubky tvořené xylémovou buňkou poloparazita, která vede přímo do hostitelské cévy – nebo přes parenchymatickou buňku (Rümer et al. 2007).

Vztah hostitelské rostliny a kořenového poloparazita je velmi komplikovaný, jelikož se jedná o kombinaci parazitismu a kompetice (Fibich et al. 2010). Pro výsledky těchto vztahů je důležité, zda poloparazitismus vyváží ztráty způsobené kompeticí. Pro větší efektivitu je počet potenciálních hostitelů variabilní (Gibson & Watkinson 1989). Na druhou stranu vysoký počet hostitelů ve společenstvu může způsobit větší mortalitu semenáčů, proto, že je kompaktněji zapojený travní porost a příliš velká kompetice o světlo. Dospělci ovšem naproti tomu mohou dosáhnout vyššího reprodukčního úspěchu (van Hulst et al. 1987, Mudrák & Lepš 2010). Vliv hostitelského druhu na poloparazita potvrzují i Gibson & Watkinson (1991), kteří v květináčovém pokusu potvrdili, že poloparazit *Rhinanthus minor* na různých hostitelích prospívá různě a to hlavně v závislosti na množství živin v půdě. Například ve skleníkovém pokusu se *Rhinanthus minor* v normálním případě rozhodne parazitovat na *Trifolium repens* spíše než na *Lolium perenne*, ale pokud se poměr živin v půdě změní (např. se zvýší obsah dusíku), poměr mezi haustoriovým napojením na oba druhy se vyrovná a spíše inklinuje k *L. perenne* (Gibson & Watkinson 1991).

V delším časovém horizontu jsou ve společenstvu patrné cykly nárůstu poloparazita či dominanty, na které parazituje. Tyto cykly mohou probíhat jen za předpokladu, že v průběhu převládnutí poloparazita nebo hostitele nedojde k úplnému vyloučení daného druhého druhu ze společenstva (Ameloot et al. 2006).

Podobně jako jiné poloparazitické druhy zmíněné výše lze očekávat, že i *Pedicularis sylvatica* může mít výrazný vliv na vegetaci, v níž roste. Tento vliv je způsoben zejména potlačením růstu hostitele a oslabením jeho konkurenceschopnosti, ale i ovlivňováním toku živin ve společenstvu.

1.2 Vazba na hostitele

Zjišťování druhů kořenových hostitelů je poměrně složitá záležitost, jelikož na rozdíl od třeba stonkových parazitů se celý proces napojení odehrává pod zemí. Proto přehled hostitelských druhů není příliš známý (Piehl 1963). První používaná metoda byla založena na nepřímé identifikaci hostitelů na základě nepřímého pozorování společných výskytů na sledovaných lokalitách; pozorovány byly opakované výskyty ve společenstvech s poloparazitickým druhem (Hodgson 1973). Tyto metody se v pozdějších studiích ukázaly jako zavádějící (Suetsugu et al. 2008), což prokázala studie Gibson & Watkinson (1989): pomocí pozitivní asociace výskytu byli schopni pro poloparazita *Rhinanthus minor* zjistit

pouze dva druhy potenciálních hostitelů. Nadto dokonce jeden z předpokládaných hostitelských druhů – *Plantago lanceolata* – byl prokázán jako velmi špatný hostitel, haustoriová napojení zde byla téměř nefunkční (Cameron & Seel 2007, Rümer et al. 2007). Oproti tomu při přímém sledování kořene až k haustoriovému spojení byli Gibson & Watkinson (1989) schopni identifikovat 34 druhů hostitelských rostlin, hlavně ze skupiny trav a čeledi Fabaceae.

Podle dalších výzkumů (Cameron et al 2006, Cameron & Seel 2007 a Rümer et al. 2007) ani haustoriové spojení ještě nemusí dokazovat, že dochází k propojení poloparazita a hostitele, jak je popsáno výše. Potenciální hostitel se brání různými způsoby, například lignifikací buněk na hraně svého kořene, v jiných případech bylo lignifikované celé stéle až na několik floémových buněk. V některých případech bylo pozorováno, že rostlina nechá své napadené části odumřít; to může být energeticky méně náročné, než odevzdávat své cenné látky poloparazitovi (Cameron et al. 2006).

Určování skutečného hostitele v terénu metodou přímého pozorování, kdy je třeba nalézt v substrátu haustorium poloparazita a poté napojený kořen sledovat až k hostitelské rostlině, je velmi obtížné a ve většině půd skoro nemožné. Přesto se touto metodou podařilo zjistit hostitele u druhu *Rhinanthus minor* (22% haustorií patřilo Fabaceae a 30% do skupiny „graminoidů“; Gibson & Watkinson 1989). Tyto výsledky byly zjištěny ex situ. Oproti tomu Weber (1976) zjistil přímo pro *Pedicularis sylvatica* následující hostitelské druhy ze skupiny „graminoidů“: *Agrostis canina*, *Holcus lanatus*, *Deschampsia cespitosa*; z Fabaceae *Lotus corniculatus*, z Rosaceae *Potentilla erecta*, a několik dalších druhů *Centaurea jacea*, *Lychnis flos-cuculi*, *Picea abies*. Dokonce je znám parazitismus na jiném jedinci svého druhu (autoparazitismus) a to u druhu *Rhinanthus serotinus* (Prati et al. 1997).

Novou metodou sledování hostitelů je tzv. DNA barcoding (Taberlet et al. 2007 a Valentini et al. 2008). Tato metoda by mohla vyřešit problém s obtížností identifikace hostitele; stačí při ní totiž v substrátu najít napojené haustorium na hostitelský kořen, ale není již třeba sledovat hostitelský kořen až k nadzemní části rostliny. Namísto toho lze část kořene hostitele pomocí molekulárních metod osekvenovat a tak identifikovat druh. Pro identifikaci druhů rostlin byly zkoušeny různé úseky DNA: jaderné (např. ITS, Jackson et al. 1999) a chloroplastové DNA, např. *rbcL* (Newmaster 2006), *matK* (Yu et al. 2011), *trnL* intron (Taberlet et al. 2007). Zjistit vhodný univerzální marker pro identifikaci hostitelů je velmi obtížné.

2 Cíle práce

- Zjistit druhové spektrum hostitelů; vyhledat spojení konkrétního haustoria se zjištěným hostitelem a ověřit, zda je funkční.
- Zjistit, zda disturbance podpoří uchycování semenáčů sledovaného druhu.
- Zaznamenat vliv poloparazita na společenstvo v lokalitě za pomoci fytoecologického snímkování, vážení biomasy a pletí sledovaného druhu.

3 Materiál a metody

3.1 Popis lokalit

Terénní experimenty a odběry vzorků *Pedicularis sylvatica* byly prováděny na lokalitách Ohrazení a PR Zubří (Obr. 2). Jelikož je *P. sylvatica* zákonem chráněný, byla pro manipulace s tímto druhem a vstup do přírodní rezervace opatřena výjimka ze zákona 114/92Sb. poskytnutá Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR.



Obr.2: Červeně vyznačené výzkumné plochy s výskytem druhu *Pedicularis sylvatica*.

3.1.1 Ohrazení

Tato lokalita se nachází mezi vesnicemi Zaliny a Ohrazení, zhruba 12 kilometrů na jihovýchod od města Českých Budějovic (48,953257°N; 14,593130°E). Lokalita leží na Lišovském prahu, který je tvořen pararulami a granuity, granulitovými rulami. Zdejším převažujícím typem půdy, hlavně v zamokřených oblastech, jsou pseudogleje (Chábera et al. 1985). Chemické charakteristiky půdy na výzkumné ploše jsou shrnuty v Tab. 1. Oligotrofní louka je tvořena společenstvem *Molinion* s prvky *Violion caninae* (Lepš 2014). Louka je pravidelně dvakrát ročně sečena.

Dominantní trávy na lokalitě jsou *Molinia caerulea*, *Nardus stricta*, *Festuca rubra*, *Holcus lanatus*. Louka je druhově bohatá a vyskytuje se tu více než deset druhů ostřic (např.

Carex panicea, *C. hartmanii*, *C. nigra*, *C. pallescens*, *C. pilulifera*, *C. pulicaris*; (Danihelka 2012). Sledovaný druh *P. sylvatica* se zde vyskytuje ve stabilní populaci a odebráním vzorků nebyla narušena její existence.

Tab.1: Přehled chemických analýz půd pro sledované lokality. Pět vzorků svrchních 10 cm půdy odebraných půdní sondou o průměru 5 cm tvořilo směsný vzorek pro každou lokalitu. V laboratoři Botanického Ústavu Akademie věd ČR v Třeboni byly provedeny analýzy: analýza rostlinám dostupného fosforu (extrakce Mehlich III), analýza celkového dusíku, obsah vápníku, draslíku, hořčíku, pH půdy a ztrátu žiháním.

Identifik. Vzorku	pH K Cl	pH H2O	Corg. %	P-PO4 mg/kg	TN mg/kg	sušina %	Ca mg/kg	K mg/kg	Na mg/kg	Mg mg/kg
Zubří	4,40	5,51	13,22	12,73	5551,103	98,71	1,445	9,00	19,68	0,815
Ohrazení	4,15	5,41	13,48	13,08	4164,265	97,22	5,94	8,98	21,38	2,03

3.1.2 PR Zubří

Přírodní rezervace Zubří vyhlášená v roce 1990 má rozlohu 25 ha a nachází se v Železných horách, cca 2 km jihozápadně od obce Trhová Kamenice mezi osadami Zubří a Polom (49,775444° N, 15,793556° E). Geologické podloží území je tvořeno směsí rul a žul. Celkově jsou tu chudé půdy, které místy vytvářejí i malá rašeliniště. Převažujícím půdním typem jsou gleje a na méně zamokřených stanovištích i pseudogleje. Podrobnější chemické analýzy jsou uvedeny v Tab. 1. Vegetace je většinou tvořena smilkovými loukami a vřesovišti, společenstvem *Molinion* a přechodnými rašeliništi (Faltysová et al. 2002). Louka je pravidelně jednou ročně sečena.

Dominantní trávy jsou opět *Molinia caerulea*, *Nardus stricta*, *Festuca rubra*, *Holcus lanatus*. Rezervace je druhově bohatá, vyskytují se tu druhy jako *Drosera rotundifolia*, *Epipactis palustris*, *Menyanthes trifoliata*. Přímo v místě výzkumu se vyskytuje i *Dactylorhiza majalis* (Danihelky (2012)). I zde se vyskytuje velká populace *Pedicularis sylvatica* a naším zásahem nebyla ohrožena.

3.2 Analýza hostitelského spektra

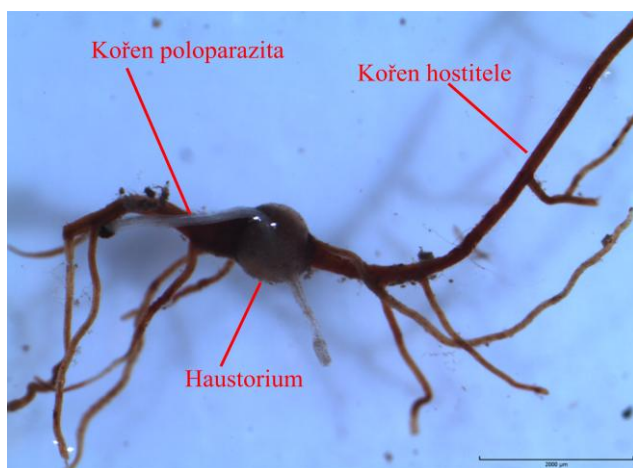
3.2.1 Sběr dat v terénu

Na lokalitě PR Zubří bylo odebráno 10 dospělců a 15 semenáčů v roce 2014 a v roce 2015 po 10 dospělcích a 10 semenáčkách *Pedicularis sylvatica*. V roce 2014 byly odebrány sondy i na lokalitě Ohrazení: 10 jedinců v obou fázích vývoje. Kolem odebraných jedinců byl vždy udělán kruhový fytoecologický snímek ($r=15$ cm), dokladové položky rostlin jsou uloženy ve fakultním herbáři (CBFS).

Vzdálenost mezi jedinci *Pedicularis sylvatica* byla minimálně jeden metr. Vybraní jedinci sloužili jako vzorek pro zjištění spektra hostitelských druhů. Tyto rostliny byly odebrány včetně svého kořenového systému pomocí půdní sondy ($r=5\text{ cm}$). Tato metoda byla otestována při výzkumu příbuzných poloparazitů *Rhinanthus major*, *R. minor* a *Melampyrum nemorosum* (Těšitel et al., ústní sdělení). Ukázala se jako efektivní nástroj, pomocí něhož lze velmi dobře odebrat velkou část kořenového systému poloparazitů, aniž by byla výrazněji ovlivněna okolní vegetace.

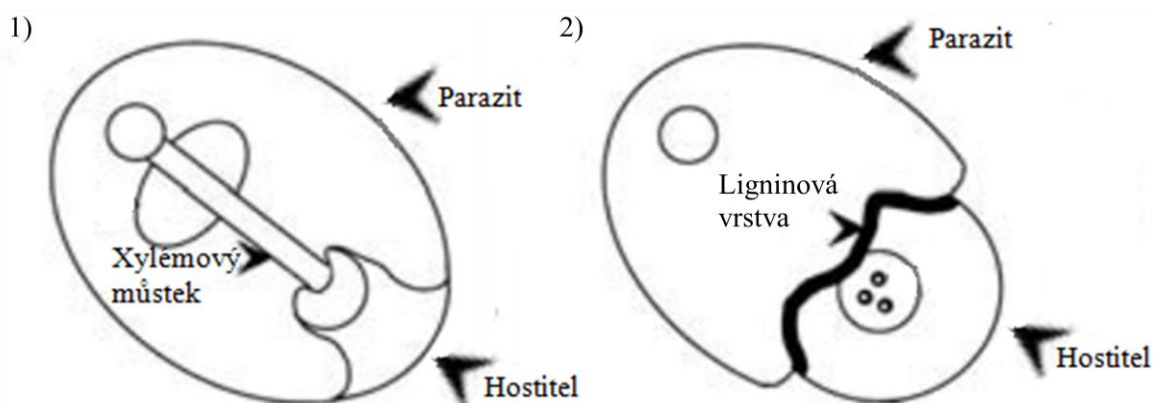
3.2.2 Preparace kořenových sond

Kořenové systémy druhu *Pedicularis sylvatica* v půdních vzorcích byly podrobeny detailnímu zkoumání s cílem nalézt spojení haustorium – hostitelský kořen (nebylo nutné sledovat kořen potenciálního hostitele až k rostlině). Vzorky kořenových sond (tj. hledání haustorií) je nutné zpracovat za čerstva, nejpozději 2. až 3. den od odebrání. Kořenové systémy byly pozorovány pod stereomikroskopem Olympus SZ-X7. V případě potřeby byly během pozorování omývány vodou. Nalezená haustoria byla odstřižena od kořenových systémů hostitele i poloparazita (Obr. 3). Z takto vzniklého vzorku byl odstřižen segment hostitelského kořene (min. velikost 0,2 cm; max. velikost 1 cm), a ten pak byl použit pro DNA barcoding.



Obr.3: Haustoriové spojení světlého kořene poloparazita a tmavého kořene hostitele.

Vlastní haustorium bylo pod stereomikroskopem nařezáno žiletkou na tenké řezy a následně obarveno floroglucinolem, který barví lignin v kyselém prostředí (H_2SO_4) do růžovo-fialové barvy. U každého řezu bylo zaznamenáno několik údajů (přítomnost xylémového můstku, který poukazuje na funkční spojení – Obr. 4, kvalita haustoria z hlediska stáří a ID, aby bylo možné později spojit druh hostitele s konkrétním haustoriem). Při podezření na autoparazitismus byla tato informace zaznamenána.



Obr.4: Nákres funkčního haustoria s xylémovým můstkem (1) a nefunkčního haustoria (2) (převzato z Cameron & Seel 2007).

3.2.3 Identifikace hostitelů molekulárními metodami

Kořeny byly v roce 2014 izolovány pomocí REDExtract – N-Amp Plant PCRkitu od firmy Sigma a v roce 2015 metodou CTAB (Koutecký & Košnar 2014). Pro izolaci byl vždy použit kompletní vzorek vypreparovaného kořene, relativně malé kusy (min. velikost 0,2 cm; max. velikost 1 cm – větší kořeny se bohužel nepodařilo vypreparovat). Proto v roce 2015 byla izolace dělána s novými vzorky. Domnívala jsem se, že nízký podíl úspěšné amplifikace mohl být způsobený typem izolace, ale tento předpoklad potvrzen nebyl.

Pro identifikaci jednotlivých hostitelů byla použita sekvenace intronu trnL (Taberlet et al. 1991; Tab. 2) v roce 2014 a ribozomální úsek ITS (White et al. 1990, Ralson & Friar 2000; Tab. 2) v roce 2015. Domnívala jsem se, že kromě změny izolace by podíl úspěšné amplifikace mohl být zvýšen použitím jiného úseku DNA. Tato změna byla provedena na základě předběžného testu úspěšnosti na základě osmi náhodně vybraných vzorků. V tomto předběžném testu se podařilo osekvenovat úsek ITS u sedmi vzorků z osmi a úsek trnL u pěti vzorků z osmi.

Tab.2: Sekvence použitých primerů (Taberlet et al. 1991, White et al. 1990, Ralson & Friar 2000).

Označení Sekvence 5'-3'

Tab C	CGAAATCGGTAGACGCTACG
Tab D	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
Tab F	ATTTGAACTGGTGACACGAG
ITS 1p	CTTTATCATTTAGAGGAAGGAAG
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS 4i	GGTAGTCCCGCCTGACCTGG
ITS 5i	AGGTGACCTGCGGAAGGATCATT

V roce 2014 obsahovala PCR reakce (0,6 µl H₂O; 1,2 µl Tab C; 1,2 µl Tab D; 5 µl PCR Mixu a 2 µl DNA) a v roce 2015 obsahoval PCR reakce (3 µl H₂O; 0,6 µl ITS 4; 0,6 µl ITS 1p; 5 µl PCR Mixu a 0,8 µl DNA). Pro všechny reakce byl používán PCR program specifikovaný v Tab. 3. PCR produkty byly otestovány pomocí 1,5% agarózového gelu TBE pufru na elektroforéze. V případě úspěšné amplifikace DNA byl vzorek odeslán na sekvenci. Sekvenační směs v roce 2014 pro metodu trnL obsahovala 5 µl H₂O, 1 µl Tab C a 1,5 µl DNA a byla odeslána do Laboratoře genomiky Biologické centrum AV ČR, v. v. i. V roce 2015 byla sekvenační směs 2,5 µl H₂O; 2,5 µl PCR produktu a 5 µl primeru ITS 1p; vzorky byly odeslány do sekvenační firmy GATC Biotech: DNA Sequencing and Bioinformatics.

Tab.3: Přehled cyklů v programu pro PCR.

(45 Cyklů)	Teplota [°C]	čas [min]
Počáteční denaturace	94	6:30
Cyklová denaturace	94	0:30
Nasedání primerů	50	1:00
Cyklová elongace	72	1:00
Finální elongace	72	10:00

V případě negativní amplifikace intornu trnL bylo přistoupeno k semi-nested PCR, tj. amplifikaci delšího úseku chloroplastové DNA s použitím primerů C a F (Taberlet et al. 1991) a následné amplifikaci s použitím primerů C a D. V případě negativní amplifikace ribozomálního úseku ITS byl předpoklad, že by vzorky mohly patřit do čeledi Cyperaceae. Proto byly vyzkoušeny primery ITS 4i, ITS 5i, vyvinuté kvůli analýze druhu *Eleocharis* (Roalson & Friar 2000). Celkem jsem osekvenovala 22 vzorků pomocí markerů trnL a 22 vzorků markery ITS 1p – 4. Pomocí metody semi – nested se nepodařilo zvýšit úspěšnost identifikace hostitelů, stejně jako primery ITS 4i-5i.

Sebrané listy druhů, vyskytujících se ve fytoocenologických snímcích kolem odebíraných kořenových sond, posloužily k vytvoření vlastní srovnávací databáze. Podle předběžných výsledků z databáze GenBank aplikace BLAST (Nucleotide Blast) bylo vybráno 15 nejčastěji se opakujících se druhů. Vzorky byly izolovány také metodou CTAB a PCR reakce obsahovala (3 μ l H₂O; 0,6 μ l ITS 4; 0,6 μ l ITS 1p; 5 μ l PCR Mixu a 0,8 μ l DNA) i pro tyto vzorky byl použit PCR program viz Tab. 3. Dále byly vzorky odeslány na sekvenci do firmy GATC Biotech: DNA Sequencing and Bioinformatics. Pro vzorky z roku 2014 byla použita srovnávací knihovna J. Košnara, která obsahovala sekvence intronu trnL prakticky pro všechny druhy nalezené ve fytoocenologických snímcích.

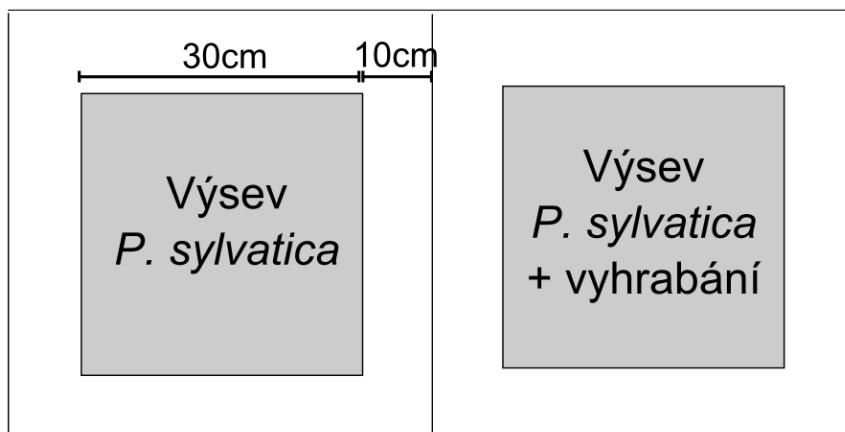
3.2.4 Terénní experimenty a pozorování

Abych zjistila více podrobností o druhu *Pedicularis sylvatica* a jeho vlivu na společenstvo, pokusila jsem se na něj aplikovat metody osvědčené ze studií jednoletých poloparazitických rostlin (Mudrák & Lepš 2010, Adamec 2012, Demey et. al 2014a, Mudrák et al 2014). Všechny pokusy probíhaly během dvou let 2014 a 2015.

3.2.5 Testování vlivu mechanické disturbance na úspěšnost výsevu *Pedicularis sylvatica*

Pokus probíhal na obou sledovaných lokalitách, kde byly zhotoveny pokusné párové plochy, každá o velikosti 0,5×0,5 m (sběr dat z centrálního čtverce 0,3×0,3 m; Obr. 5). Sedm ploch bylo vytyčeno na obou lokalitách během květu tak, aby se na nich *P. sylvatica* nevyskytoval, ale zahrnovaly vegetaci, podobnou té, v níž druh roste. Všechny plochy byly vytyčeny trvale pomocí pivních zátek. Do obou párových ploch bylo dne 20. 9. 2014 (Zubří) a 3. 10.2014 (Ohrazení) vyseto 50 semen *P. sylvatica* pocházejících z dané lokality (sebrána 15. 6. 2014 na Zubří a 13. 7.2014 na Ohrazení).

Jedna z párových ploch byla vždy před výsevem ostříhána a mechanicky disturbována vyhrabáním, biomasa byla odstraněna, aby netvořila stařinový pokryv. Přežívání semenáčů bylo následně monitorováno během sezóny 2015, kdy v dubnu proběhla na lokalitě Ohrazení kontrola klíčivosti semenáčů, a v květnu byly sčítány.



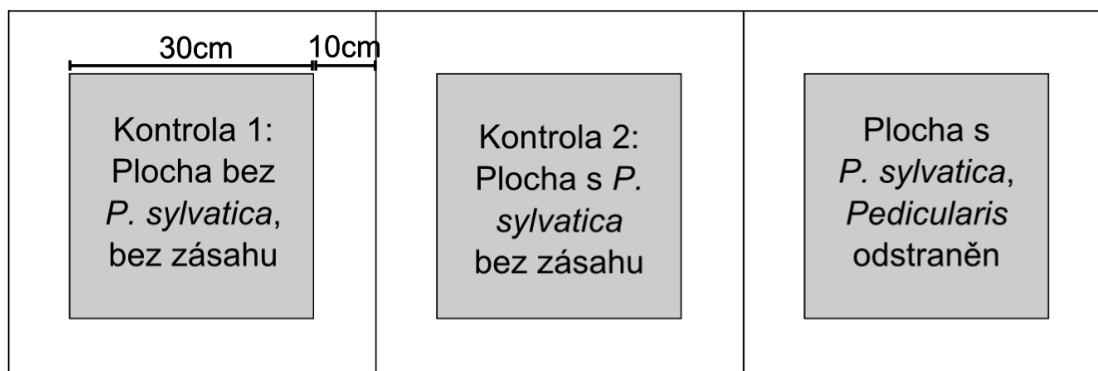
Obr. 5: Schéma párových ploch jednoho bloku pokusu na testování vlivu mechanické distrubance na přežívání semenáčů *Pedicularis sylvatica*.

3.2.6 Korelace s biomasou

Toto pozorování probíhalo pouze v roce 2014 v PR Zubří, kde bylo vybráno 10 párových ploch s velmi podobnou vegetací, v jedné, z nichž byl přítomen druh *Pedicularis sylvatica*. Plochy měly rozměr 30×30 cm s hraniční zónou 10 cm. Pro všechny plochy byly udělány fytoocenologické snímky. Pro všechny snímky byla použita škála (R, +, 1–15 po jednom procentu pokrývnosti a následně 15–100 po pěti procentech). Biomasa byla odebrána kromě *P. sylvatica*, která následně byla sušena v sušárně a vážena (váhy ERN EW max. 1500 g – min. 0,5 g). Všechny jména rostlin byly upraveny podle Danihelky (2012).

3.2.7 Vliv *Pedicularis sylvatica* na rostlinné společenstvo

Experimentální design sestával ze tří typů ploch. Na jedné byl *Pedicularis sylvatica* odstraněn vypletím, v druhé ploše byl *P. sylvatica* ve vegetaci ponechán pro kontrolu a třetí plocha byla kontrolní vegetace zcela bez výskytu sledovaného druhu. V ideálním případě byly plochy spojeny do jednoho bloku (Obr. 6); pokud to nebylo možné, byla kontrolní plocha bez *P. sylvatica* založena ve větší vzdálenosti od zbývajících dvou ploch. Velikost ploch je 50×50 cm, s tím, že sběr dat probíhal v centrálním čtverci 30×30 cm. Na každé lokalitě bylo založeno 7 bloků. Tento experiment byl zahájen v květnu 2014, kdy byla sebrána i výchozí data. Následná data zachycující vliv odstranění *P. sylvatica* pak byla sebrána v květnu 2015. Sběr dat probíhal formou fytoecologického snímkování. Pro všechny snímky byla použita škála (r, +, 1–15 po jednom procentu pokrývnosti a následně 15–100 po pěti procentech).



Obr. 6: Schéma jednoho bloku pokusu s odstraněním *Pedicularis sylvatica* z vegetace.

4 Analýza dat

4.1.1 Sběr dat v terénu

Rozdíl v produkci biomasy společenstva na plochách, kde je *Pedicularis sylvatica* přítomen a kde chybí, byl otestován pomocí permutační verze Wilcoxonova testu pro párová pozorování. Rozdíly ve složení vegetace byly testovány pomocí parciální RDA (Šmilauer & Lepš 2014), ve které vystupovala identita plochy jako kovariáta.

Vliv disturbancí na uchycení semenáčků byl testován pomocí permutační verze Wilcoxonova testu pro párová pozorování. Tento test byl proveden pro každou lokalitu zvlášť.

Vzhledem k tomu, že vypletí *Pedicularis sylvatica* nezpůsobilo vymizení druhu z vypletých ploch, nemělo smysl testovat efekt vypletí na vegetaci. Byl proveden alespoň test vlivu vypletí na pokryvnost *P. sylvatica*. Ten byl proveden pomocí lineárního modelu se smíšenými efekty, v němž vystupovala identita bloku jako náhodný faktor, rok a zásah a jejich interakce jako prediktory s pevnými efekty. Pro posouzení vlivu vypletí je zásadní interakce vypletí × rok.

Jednorozměrné statistické analýzy byly provedeny v programu R, verze 3.2.2 (R Core Team 2015). Pro permutační testy byly využity funkce knihovny coin (Hothorn et al. 2008). Mnohorozměrné analýzy byly provedeny v programu Canoco for Windows, verze 5.04 (ter Braak a Šmilauer 2012).

4.2 Molekulární data

Sekvence byly upraveny v programu Geneious 7.1.5 (Kearse et al. 2012) a porovnány s databází GenBank ([{{HYPERLINK "https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/"}}](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) a s našimi vlastními databázemi metodou „similarity method BLAST“. Při srovnávání sekvencí byla sledovaná similarita (podobnost), která musela být vyšší nebo rovna 97 %, protože 99-97 % je běžně používaná hranice (Bidartondo and Read 2008; Ryberg et al. 2008; White et al. 2010), aby sekvence byla přijata jako odpovídající pro daný druh.

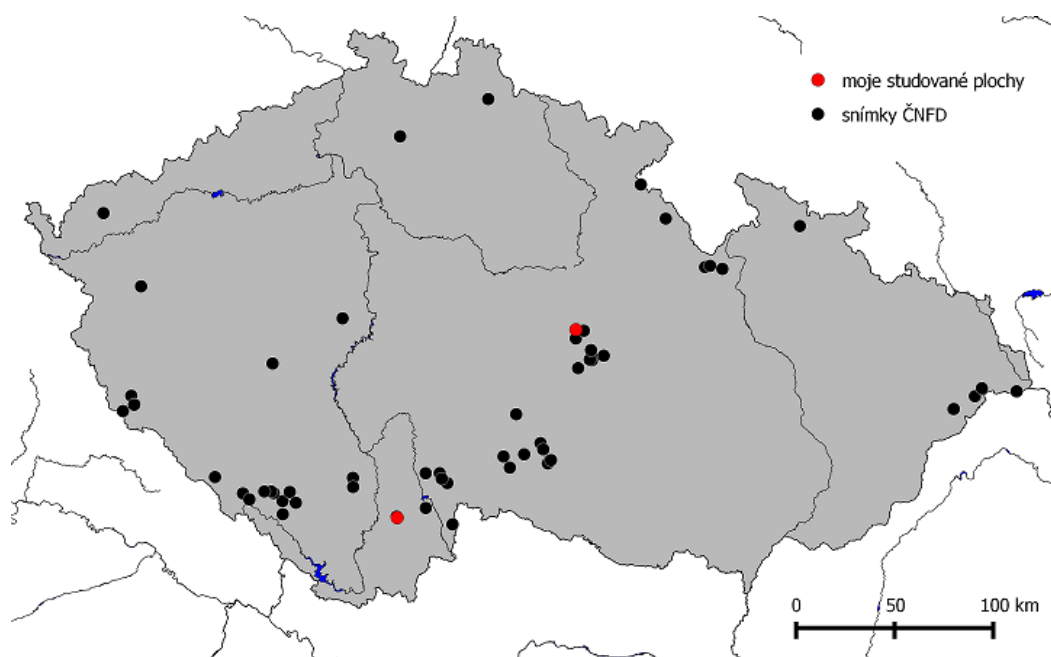
Několik sekvencí (sekvence s relativně nízkou kvalitou – nedostatečná délka nebo více nepřirazených bází) s nižší podobností než 97 % by nikdy neobstálo ve výsledcích. Proto byla použita kombinace metody „similarity method BLAST“ a hierarchického klastrování (neighbour joining tree), které umožnilo identifikaci druhu hostitele.

5 Výsledky

5.1 Analýza hostitelského spektra

5.1.1 Terénní práce sběr dat v terénu

Celkem bylo odebráno 65 kořenových sond z obou sledovaných ploch (ale ne všechny sondy byly použity pro zjišťování hostitelského spektra), to znamená i 65 fytoocenologických snímků. Ty jsem porovnávala s 62 snímky sebranými napříč českou republikou (Obr. 7) z České národní fytoocenologické databáze (ČNFD), abych zjistila, jak často se vyskytuje sledovaný druh v přítomnosti jiných známých druhů na lokalitách. Bylo sledováno 30 nejčastěji se vyskytujících druhů z databáze ČNFD a všechny druhy z mých fytoocenologických snímků. Lokalita Zubří se ukázala jako podobnější snímkům z ČNFD a prvních deset druhů v tabulce se vyskytuje se sledovaným druhem hojně i v našich plochách. Prvních deset nejčastějších druhů je v Tab. 4 s červeně vyznačenými hostiteli, které se nám podařilo identifikovat. Čísla uvedená v tabulce jsou procentuální poměr zastoupení výskytu ve fytoocenologických k počtu snímků z lokality a roku. Celková tabulka v přílohách (Příloha 1).



Obr.7: Přehled 62 fytoocenologických snímků z České národní fytoocenologické databáze.

Tab.4.: Prvních 10 nejčastějších druhů, které se vyskytují s *Pedicularis sylvatica*. Červeně jsou vyznačeny zjištění hostitelé. Hodnoty jsou poměr výskytu ve snímcích, ku počtu fytoocenologických snímků v daném roce a na daném místě.

dru/snímek [podíl]	ČNFD	Zubří semenáče 2014	Zubří dospělci 2014	Zubří semenáče 2015	Zubří dospělci 2015	Ohrazení semenáče 2014	Ohrazení dospělci 2014
<i>Potentilla erecta</i>	0,95	0,93	1,00	1,00	1,00	0,70	0,50
<i>Nardus stricta</i>	0,90	0,40	0,60	0,70	0,80	0,50	0,50
<i>Carex panicea</i>	0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	0,60	0,70
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	0,79	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	0,90
<i>Carex nigra</i>	0,77	0,80	0,90	0,80	0,90	0,20	0,50
<i>Festuca rubra</i>	0,77	0,80	0,80	0,40	0,80	0,10	0,40
<i>Luzula campestris</i>	0,74	0,60	0,40	0,40	0,40	0,00	0,00
<i>Ranunculus acris</i>	0,65	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80
<i>Briza media</i>	0,61	0,60	0,80	0,50	0,60	0,30	0,40
<i>Cirsium palustre</i>	0,61	0,33	0,30	0,10	0,20	0,30	0,30

5.1.2 Preparace kořenových sond

Ruční příprava anatomických řezů a barvení floroglucinolem se ukázala jako efektivní a rychlá pro studium spojení hostitele a zjištění přítomnosti xylémového můstku, jenž dokazuje funkčnost haustoria. Řezy jsou tím komplikovanější, čím jsou haustoria starší, jelikož je větší pravděpodobnost vyhnílosti anebo změkčení tkání. Všechny dostupné řezy osekvenovaných vzorků naleznete v přílohách (Příloha 2 = rok 2014, Příloha 3 = rok 2015).

5.1.3 Identifikace hostitelů molekulárními metodami

Celkem bylo vypreparováno z lokality Zubří v obou letech 178 haustorií. Osekvenovat hostitele se nám povedlo u 44 z nich, což je 25% úspěšnost. V roce 2014 (úsek trnL) bylo celkem 69 vzorků, z nichž se nám podařilo osekvenovat 22 hostitelů; to je 32% úspěšnost. V roce 2015 (marker ITS) to bylo 109 haustorií, z nichž jsem zjistila 22 hostitelů, což je 20% úspěšnost. Haustoria z lokality Ohrazení (2014) byla vypreparována, nařezána i obarvena. Při jejich zpracování v laboratoři (úsek trnL) se ale žádný vzorek nepodařilo amplifikovat.

V roce 2014 se mi podařilo osekvenovat 22 hostitelských kořenů z chloroplastového úseku trnL a následně určit identitu hostitelů (Tab. 5). V této tabulce (Tab. 5) uvádíme, zda byl xylémový můstek přítomen (označeno jako „1“), tj. zda haustorium bylo funkční. Pokud xylémový můstek nebyl pozorován („0“), může to znamenat chybný řez (řezy v ruce jsou příliš tlusté a tak je možné můstek minout), či že v haustoriu nedošlo k interakci mezi poloparazitem a daným druhem. Poslední možnost je, že se řez haustoriem nepodařilo provést (haustorium chybělo), nebo se jednalo o staré, zčásti vyhnílé haustorium („-“).

Tab.5: Tabulka druhů hostitelů zjištěných podle databáze GenBank a naší srovnávací databáze metodou trnL. Funkčnost haustoria: 1 = xylémový můstek byl přítomen, 0 = xylémový můstek nebyl pozorován, - = řez nebyl proveden.

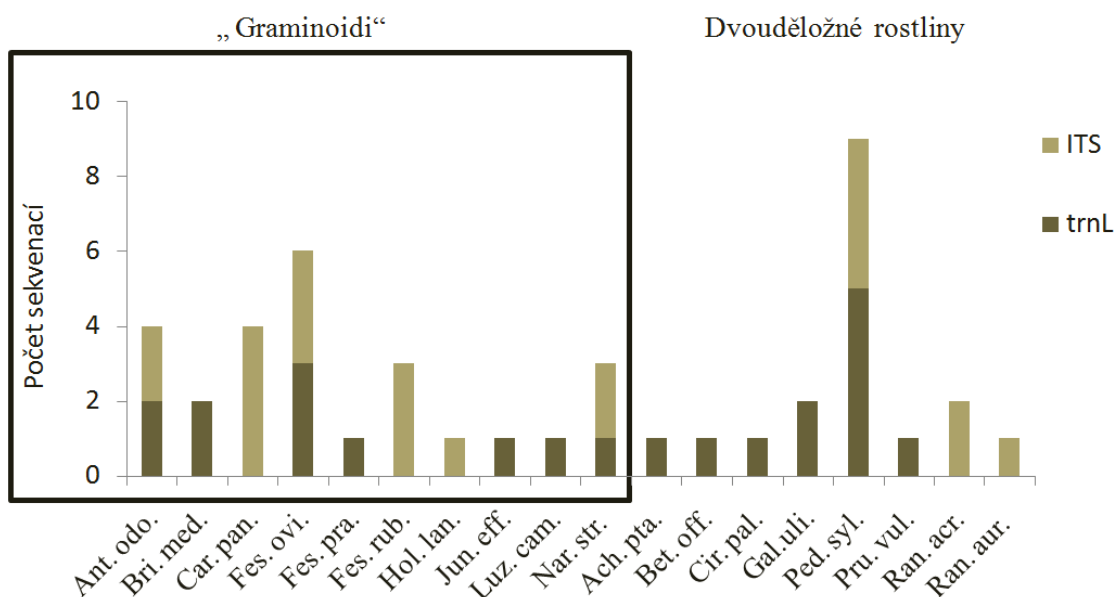
trnL 2014 ID vzorku	GenBank databáze		Vlastní srovnávací databáze		Funkčnost haustoria
	Druh	Shoda [%]	Druh	Shoda [%]	
M2_1	<i>Cirsium (více druhů)</i>	100,0	<i>Cirsium palustre</i>	100,0	1
M2_2	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	99,4	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	99,1	1
M2_3	<i>Galium uliginosum</i>	100,0	<i>Galium uliginosum</i>	99,3	-
M3_1	<i>Festuca rubra</i>	99,8	<i>Festuca ovina</i>	100,0	-
M4_1	<i>Briza media</i>	100,0	<i>Briza media</i>	100,0	1
M4_6	<i>Briza media</i>	100,0	<i>Briza media</i>	100,0	1
M5_1	<i>Pedicularis attollens</i>	97,7	<i>Pedicularis sylvatica</i>	99,8	-
M5_3	<i>Pedicularis attollens</i>	98,0	<i>Pedicularis sylvatica</i>	100,0	-
M6_2	<i>Achillea ptarmica</i>	99,7	<i>Achillea ptarmica</i>	99,7	1
M7_1	<i>Galium uliginosum</i>	100,0	<i>Galium uliginosum</i>	97,8	1
M10_6	<i>Prunella vulgaris</i>	100,0	<i>Prunella vulgaris</i>	100,0	1
V3_1	<i>Luzula campestris</i>	100,0	<i>Luzula campestris</i>	100,0	1
V3_3	<i>Stachys officinalis</i>	100,0	<i>Betonica officinalis</i>	97,9	1
V3_5	<i>Juncus effusus</i>	100,0	<i>Juncus effusus</i>	99,3	1
V4_1	<i>Nardus stricta</i>	99,4	<i>Nardus stricta</i>	99,4	0
V5_1	<i>Pedicularis attollens</i>	97,6	<i>Pedicularis sylvatica</i>	99,6	0
V5_2	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	100,0	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	99,8	0
V5_3	<i>Festuca ovina</i>	100,0	<i>Festuca ovina</i>	99,0	-
V7_1	<i>Pedicularis attollens</i>	98,4	<i>Pedicularis sylvatica</i>	100,0	1
V9_1	<i>Festuca ovina</i>	100,0	<i>Festuca ovina</i>	98,7	1
V10_1	<i>Festuca pratensis</i>	99,8	<i>Festuca pratensis</i>	99,8	-
V10_4	<i>Pedicularis resupinata</i>	99,0	<i>Pedicularis sylvatica</i>	100,0	1

V roce 2015 se podařilo osekvenovat 22 vzorků hostitelských kořenů a to z části ribozomální DNA ITS (Tab. 6.)

Tab.6: Tabulka druhů hostitelů zjištěných podle databáze GenBank a naší srovnávací databáze metodou ITS. Funkčnost haustoria: 1 = xylémový můstek byl přítomen, 0 = xylémový můstek nebyl pozorován, - = řez nebyl proveden.

ITS 2015	GenBank databáze		Vlastní srovnávací databáze		Funkčnost haustoria
ID vzorku	Druh	Shoda [%]	Druh	Shoda [%]	
M2_1	<i>Nardus stricta</i>	98,1	<i>Nardus stricta</i>	100,0	0
M2_2	<i>Pedicularis sylvatica</i>	97,8	<i>Pedicularis sylvatica</i>	100,0	0
M2_3	<i>Nardus stricta</i>	100,0	<i>Nardus stricta</i>	100,0	-
M3_2	<i>Pedicularis sylvatica</i>	80,0	<i>Pedicularis sylvatica</i>	80,9	0
M6_1	<i>Festuca roemeri</i>	98,3	<i>Festuca ovina</i>	99,8	1
M9_2	<i>Festuca ovina</i>	93,6	<i>Festuca ovina</i>	96,4	0
M10_5	<i>Carex panicea</i>	91,7	<i>Carex panicea</i>	90,7	-
V1_4	<i>Pedicularis sylvatica</i>	98,4	<i>Pedicularis sylvatica</i>	100,0	1
V3_9	<i>Pedicularis sylvatica</i>	98,3	<i>Pedicularis sylvatica</i>	99,8	1
V4_8	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	98,9	<i>Anthoxanthum Odoratum</i>	97,8	1
V5_2	<i>Festuca rubra</i>	96,0	<i>Festuca rubra</i>	95,0	0
V5_3	<i>Festuca sp.</i>	95,0	<i>Festuca rubra</i>	95,5	0
V5_6	<i>Carex parviflora</i>	94,3	<i>Carex panicea</i>	90,3	1
V5_9	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	86,3	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	85,9	1
V6_2	<i>Festuca roemeri</i>	98,0	<i>Festuca ovina</i>	99,1	1
V6_6	<i>Holcus lanatus</i>	99,0	<i>Holcus lanatus</i>	99,8	1
V7_9	<i>Ranunculus acris</i>	99,7	<i>Ranunculus acris</i>	99,8	0
V7_10	<i>Ranunculus acris</i>	100,0	<i>Ranunculus acris</i>	100,0	0
V7_11	<i>Carex panicea</i>	97,4	<i>Carex panicea</i>	95,2	0
V8_2	<i>Ranunculus variabilis</i>	95,5	<i>Ranunculus auricomus</i>	96,4	1
V10_5	<i>Carex panicea</i>	91,9	<i>Carex panicea</i>	90,0	1
V10_7	<i>Festuca rubra</i>	98,1	<i>Festuca rubra</i>	97,6	1

Sledovaný druh *Pedicularis sylvatica* parazituje jak na dvouděložných rostlinách, tak na skupině „graminodů“ kam řadíme čeledi Poace a Cyperaceae (Obr. 8).



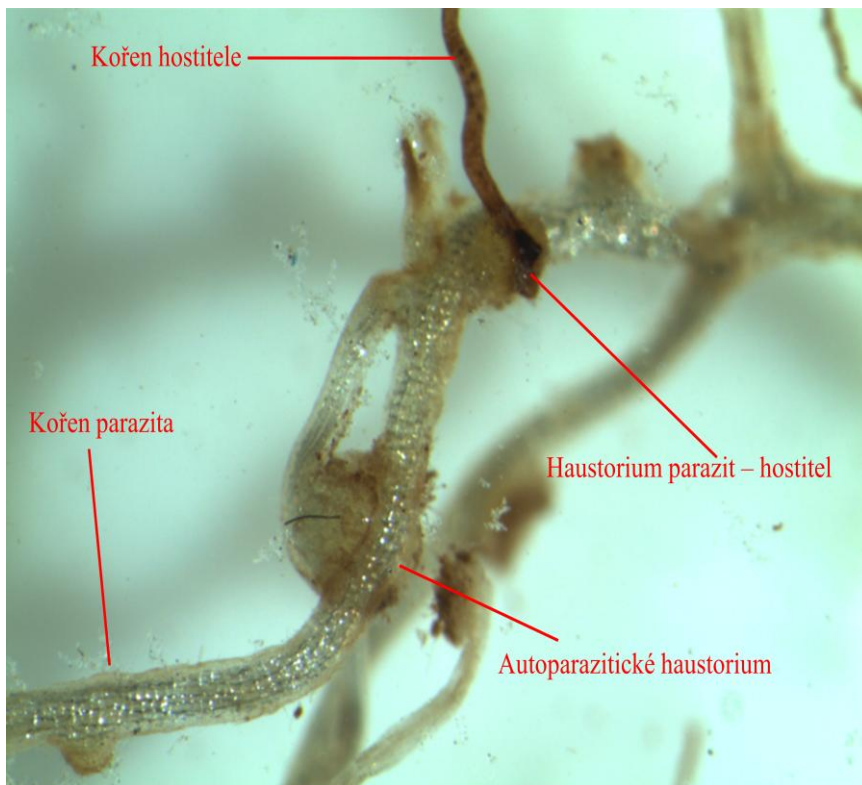
Obr.8: Přehled hostitelů podle četnosti haustorií.

5.1.4 Autoparazitismus

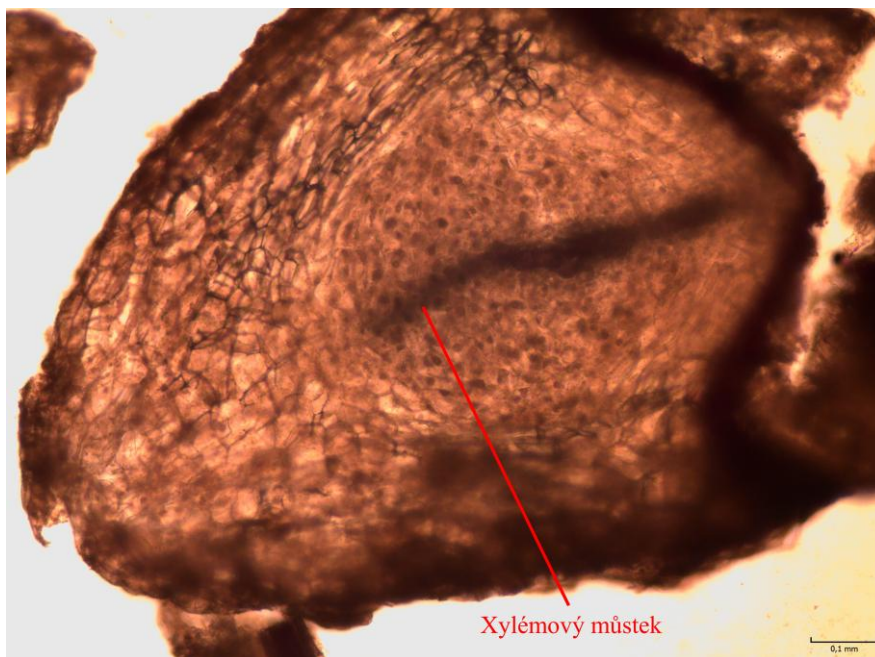
Zajímavým zjištěním byla i hojná parazitice druhu sama na sobě. Autoparazitické haustorium bylo pozorováno již přímo při rozebírání kořenových sond (Obr. 9). Podezření na autoparazitismus založené na výrazném bělavém zbarvení kořenů *Pedicularis sylvatica* jsem zaznamenávala již při rozebírání kořenových sond. Tyto apriorní předpoklady se většinou potvrdily po analýze osekvenovaných vzorků (Tab. 7). Dále bylo zaznamenáno ještě šest vzorků s podezřením na autoparazitismus, tyto vzorky se bohužel nepodařilo osekvenovat. Žádné jiné záznamy nebyly provedeny (neexistuje situace o záznamu podezření na autoparazita který se nepotvrdil). U těchto autohaustorií dochází k zjevnému propojení cévních svazků (hostitel *Pedicularis sylvatica* – poloparazit *P. sylvatica*), jak dokládá zjištění přítomnosti xylémového můstku (Obr. 10).

Tab.7: Osekvenovaných vzorků u nichž se vyskytl autoparazitismus (1 – podezření již při preparaci, 0 – neměla jsem podezření na autoparazitismus při preparaci).

ID vzorku	2014	ID vzorku	2015
M2_2	0	M5_1	0
M3_2	1	M5_3	1
V1_4	1	V5_1	1
V3_9	1	V7_1	1
		V10_4	1



Obr.9: Pozorované autoparazitické haustorium při rozebírání kořenových sond.

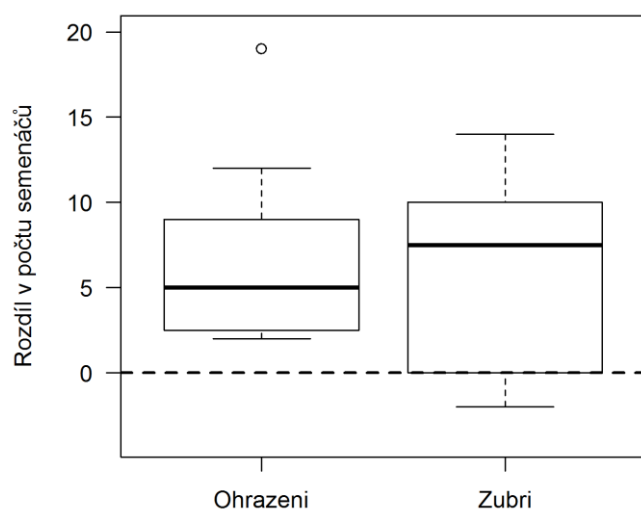


Obr.10: Autoparazitické haustorium s přítomným xylémovým můstkem.

5.2 Terénní experimenty a pozorování

5.2.1 Testování vlivu mechanické disturbance na úspěšnost výsevu

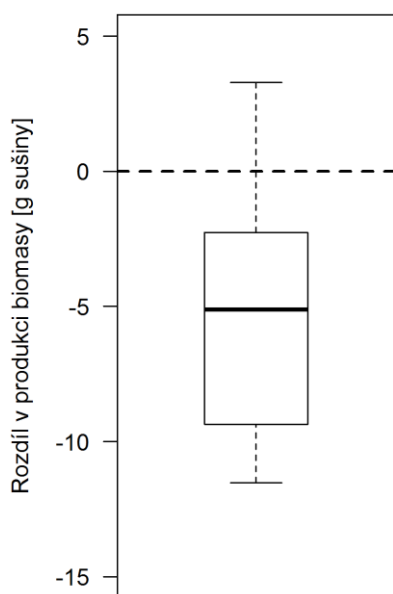
Pedicularis sylvatica na lokalitě Zubří nevyšel průkazný rozdíl mezi uchycením na disturbovaných plochách a na plochách se zapojeným terénem průkazně (Obr. 11, $p=0,12$). Naopak, na lokalitě Ohrazení se rozdíl mezi sledovanými plochami ukázal jako průkazný ($p=0,01$). Na této lokalitě je průkazně víc semenáčků na disturbovaných plochách (Obr. 10).



Obr.11: Rozdíl v počtu uchycených semenáčků na párových plochách: disturbováno vs. nedisturbovaná kontrola.

5.2.2 Korelace s biomasou

Na plochách bez *Pedicularis sylvatica* je průkazně ($p=0,01$) víc biomasy ostatních druhů než na plochách s *P. sylvatica* (Obr. 12). Analýza rozdílu ve vegetaci mezi párovými plochami s *P. sylvatica* a bez něj vyšla neprůkazně (pseudo - $F=1,00$; $p=0,39$) parciální RDA s kovariátami – Monte Carlo permutační test – v blocích definovaných kovariátami.



Obr.12: Rozdíl v nadzemní biomase mezi párovými plochami s přítomností *Pedicularis sylvatica* a bez něj na lokalitě Zubří.

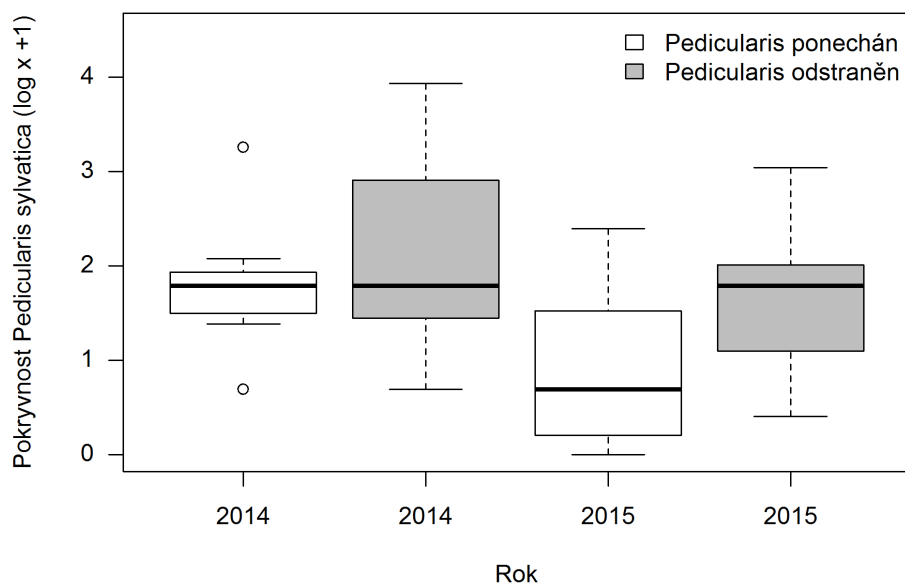
5.2.3 Vliv *Pedicularis sylvatica* na rostlinné společenstvo

Jednorázové vypletí *Pedicularis sylvatica* nezabránilo výskytu druhu na vypletých plochách v následujícím roce (Obr. 13). Vypletí dokonce ani nemělo průkazný vliv na pokryvnost druhu (Tab. 7).

Tab.7: Přehled výsledků testu pokryvnosti pro oba sledované roky.

	DF model	DF resid.	F	p
Rok	1	12	3,8015	0,0750
Vypletí	1	6	2,2204	0,1868
Rok x vypletí	1	12	0,2316	0,6390

Obr. 13 shrnuje efekt vypletí v roce 2014 na pokryvnost *P. sylvatica* v roce 2015. Testy jsou založené na lineárním modelu se smíšenými efekty, kde identita párové plochy vystupuje jako náhodný faktor.



Obr.13: Vliv pletí *Pedicularis sylvatica* na pokryvnost druhu. Vypletí bylo provedeno po monitoringu pokryvnosti v roce 2014.

6 Diskuse

Odebírání kořenovou sondou ($d=5\text{ cm}$) se ukázalo jako dostatečné, přestože se někdy vyskytl problém s odebíráním v rámci silně podmáčené půdy na lokalitě. Problematické odebírání spočívá v tom, že při velkém podmáčení se kořenová sonda propadla dosti hluboko a samotný odebíraný vzorek se nechtěl odpojit od podloží. Proto bylo potřeba zvětšit jámu kolem a oddělit vzorek od podloží ručně, velmi opatrně aby nedošlo k jeho poškození.

Ruční řezání anatomických řezů haustorií a jejich barvení floroglucinolem se ukázalo jako velmi efektivní metoda, která dokáže zachytit anatomii haustoria a doložit funkčnost spojení. Nevýhoda této metody je, že preparát není trvalý, což jsem vyřešila pomocí fotografování řezu přes mikroskop. Oproti tomu fixovat pryskyřicí celá haustoria a poté je řezat na poloténkové řezy je časově a finančně mnohem náročnější a výsledky jsou stejné (Těšitel ústní sdělení).

V porovnání s diplomovou prací Průšová (2010), která vypreparovala 48 vzorků a z nich identifikovala pouze 9, je tato práce mnohem úspěšnější: během dvou let bylo vypreparováno 178 haustorií, z nichž se nám podařilo osekvenovat 44 vzorků, to je 25% úspěšnost. Všechny vypreparované kořeny byly poměrně malé a celé byly využity na izolaci, proto nebylo možné izolaci zopakovat. To představuje určité omezení celé metody, protože pokud nevyizolujeme dostatečné množství DNA napoprvé, je vzorek nepoužitelný. Ani použití metody semi-nested PCR bohužel nedokázalo zvýšit úspěšnost. Stejně tak nevyšly úspěšnost ani primery ITS (4i a 5i), vyvinuté primárně pro druh *Eleocharis* z čeledi Cyperaceae (Roalson & Friar 2000). Nejúspěšnější se jeví využití úseku trnL, kdy se podařilo z 69 vzorků určit hostitele ve 22 případech (32 %). To je dost paradoxní s ohledem na to, že všechny vzorky z lokality Ohrazení mi nevyšly. Vzorky byly izolovány a skladovány stejně jako vzorky ze Zubří, ale zpracování (PCR amplifikace) probíhala výrazně později cca o 3 – 4 měsíce. Sice byly klasicky zamrazeny, ale je možné, že ve vzorcích probíhala degradace DNA nebo namnožení sekundárních metabolitů. Naproti tomu markery ITS tak úspěšné nebyly, jelikož ze 109 vzorků se podařilo určit také jen 22 hostitelů (20%). Bohužel byly časté kontaminace jinými druhy nebo houbami či myšmi a to pravděpodobně z důvodu přenosu malých množství DNA z půdy. Je zajímavé, že amplifikace a sekvenace ITS zachytila jako poměrně hojné některé „graminoidy“ (*Carex pallescens*, *Festuca rubra*), jejichž sekvence se vůbec neobjevily při sekvenaci úseku trnL. Pro budoucí práci bych doporučila kombinaci více úseků, což by mohlo zvýšit úspěšnost identifikace hostitelů.

Výsledné sekvence byly porovnány s databází GenBank, jež se neukázala jako plně spolehlivá, jelikož je to databáze mezinárodní a obsahuje mnoho druhů, jež se u nás nevyskytují. Mnohem spolehlivější je proto vytvořit si vlastní srovnávací databázi z druhů vyskytujících se na sledované lokalitě. Je vhodné do této databáze zahrnout všechny nalezené druhy, jelikož v tomto výzkumu se nepotvrdila preference pro určitou skupinu rostlin. Ze skupiny „graminoidů“ (Poace, Cyperaceae) jsem zjistila 9 hostitelských druhů; oproti tomu ve skupině dvouděložných rostlin jsem zaznamenala 8 druhů hostitelů, z nichž jeden je samotný poloparazitický druh. Na rozdíl od toho například *Rhinanthus minor* hojně napadá a úspěšně parazituje traviny (Cameron et al. 2006, Rümer et al. 2007, Cameron a Seel 2007). V případě *Pedicularis sylvatica* výsledky ukazují na víceméně rovnoměrné rozložení parazitismu mezi skupinu „graminoidů“ a dvouděložných rostlin. Bao (2015) ostatně také zaznamenal haustoriová napojení druhu *Pedicularis kansuensis* na různé skupiny rostlin. Mimo Poaceae to byly i zejména čeledi Rosaceae a Fabaceae.

Dalším zajímavým výzkumem by bylo zjistit, zda u některých zjištěných druhů dochází k obranné reakci blokující přístup haustoria do cévních svazků hostitele. To bylo zkoumáno například u *Rhinanthus minor*, jenž hojně napadá *Plantago lanceolata* (Gibson & Watkinson 1989), avšak není schopen ho účinně parazitovat, jelikož *P. lanceolata* blokuje haustoriové napojení (Cameron et al. 2006). To by mohl být stejný případ, jako spojení *Pedicularis sylvatica* s osekvenovaným druhem *Ranunculus acris*; zde byly všechny řezy haustoria bez xylémového můstku, což může být způsobeno nějakou formou inhibice ze strany hostitelského druhu. Pro konečné ověření této teorie by bylo třeba provést podrobnější kultivační pokus.

Celkem jsem osekvenovala jako autoparazitické haustorium devět vzorků, z toho sedm jsem už při preparování samotných haustorií označila jako pravděpodobné autoparazitické haustorium. Tento jev je u poloparazitických rostlin znám a to jak u klonálních jedinců, tak u nepříbuzných jedinců svého druhu (Prati et al. 1997). Přestože u těchto výsledků nikdy nelze plně vyloučit vliv kontaminace, apriorní odhad, že se jedná o autoparazitická haustoria, se ve většině případů potvrzuje – jde skutečně o autoparazitická haustoria.

Výsevový pokus byl průkazný, což znamená, že vliv disturbovaného místa na uchycení semenáčů je poměrně důležitý; to potvrzuje i studie (Demey 2015), v níž se uvádí, že poloparazit samotný vytváří ve společenstvu mezery, které zvyšují uchycení semenáčů

některých druhů. Mohou být tedy velmi důležité i k uchycení poloparazita samotného. To může souviset s tím, že většina lučních druhů jsou trvalky, zatímco poloparazitické rostliny bývají převážně jednoleté, případně monokarpické jak tomu je u *Pedicularis sylvatica*. Podle Svenssona et al. (2001) je možné, že se z tohoto důvodu dokonce nevyvinulo šíření semen a jen tak vypadávají v blízkosti mateřské rostliny. To může mít tři důvody: 1) rostlina je schopná vnímat, že její napojení na hostitele je natolik kvalitní, že dokázala vytvořit semena; tudíž je dost pravděpodobné, že když se její semenáče napojí na stejného hostitele, opět budou stejně úspěšní (Svensson et al. 2001). Za druhé odumřelá mateřská rostlina může vytvořit příhodnou mezeru v porostu k uchycení semenáče – mikrostanoviště vhodnější pro klíčení (Demey et al. 2014a). Třetí důvod může být, že opad z odumírající mateřské rostliny je velmi bohatý na živiny, hlavně na dusík (Demey 2013a, Demey et al. 2014b). To, že je disturbance vhodná pro uchycení semenáčů, může potvrdit i častý výskyt jedinců *P. sylvatica* na disturbovaných místech podél cest (vlastní pozorování).

Poloparazitické rostliny mohou být považovány za takzvané základní druhy (keystone species), které ovlivňují celé společenstvo, i opylovače a herbivory (Press & Phoenix 2005). To se v této studii nepotvrdilo, jelikož se plocha s *Pedicularis silvatica* a plocha bez poloparazita průkazně nelišila v druhovém složení. Naproti tomu Mudrák & Lepš (2010) pozorovali nárůst abundance parazitovaných druhů po vypletí *R. minor*, což interpretovali tak, že tyto druhy byly v přítomnosti *R. minor* potlačené.

Zásadní roli zřejmě hraje množství haustorií a způsob napojení na hostitele a druh hostitele, což limituje schopnost přijímat živiny. Tyto faktory mají následně zásadní vliv na růst poloparazitických rostlin (Cameron et al. 2006).

Experimentální zásah v podobě jednorázového vypletí se neukázal jako vhodný přístup pro studium interakcí *Pedicularis sylvatica* a hostitelské vegetace. Ve sledovaných plochách, kde měl být daný druh odstraněn, se jedinci následující rok přesto objevili a vypletí dokonce ani nemělo průkazný vliv na jejich pokryvnost. Pravděpodobnou příčinou nárůstu *P. sylvatica* v odstraněných plochách je přehlédnutý nějaký velmi malý semenáček a následně nebyla dostatečná konkurence dalších poloparazitů, a tudíž sledovaný jedinec vzrostl.

Kořeny poloparazitických rostlin mají velký vliv na rostlinné společenstvo, který se projevuje velkými rozdíly jak mezi hostitelskými druhy, tak i v rámci funkčních skupin. To je pravděpodobně i důvod, proč se poloparazitickým rostlinám říká „ekosystémová inženýři“

(Lepš & Těšitel 2015). *Pedicularis sylvatica* je striktně dvouletý, což způsobuje oscilaci množství rostlin na ploše. Tento faktor mohl mít vliv na pokus pletí sledovaného druhu, jelikož pokus byl zakládán v roce s nižší abundancí kvetoucí kohorty a tudíž bylo jednodušší přehlédnout později klíčící semenáčky, jichž bylo větší množství. Podle Jensen (2004) má druh *Pedicularis palustris* až pětiletou dormanci semen. I tento fakt by mohl mít vliv na výsledky pokusu s vypletem druhu *P. sylvatica*, pokud má i tento druh podobně dlouhou dormanci semen.

V odstraněných plochách se vyskytuje méně druhů, což upravuje konkurenční rovnováhu (Bao 2015). Bylo pozorováno, že hodnoty nadzemní biomasy se snižovaly po osetí *Rinathus minor* a přitom celková biomasa se zahrnutým *R. minor* nebyla ovlivněna (Westbury et al. 2006). Ovšem podle Demey (2013b) nemělo pletí významný vliv na plochy s *Pedicularis sylvatica* na nárůst biomasy na sledovaných plochách. Demey et al. (2014a) tvrdí, že po vypletem *Pedicularis sylvatica* se zvýšila pouze skupina Juncaceae jako jediná ze skupiny „graminoidů“, ale vliv se liší v rámci formálních skupin.

7 Závěr

Celkem se podařilo identifikovat 18 druhů hostitelů v celkem 44 vzorcích. Metoda ruční přípravy anatomických řezů s následným barvením floroglucinolem se ukázala jako efektivní pro studium anatomie haustorií a identifikaci funkčnosti spojení cévních svazků. Dále se prokázalo, že disturbovaný povrch má pozitivní vliv na uchycení a vyklíčení semenáčů druhu *Pedicularis sylvatica*. Rozdíl v množství biomasy z ploch s *P. sylvatica* a z plochy bez něj se ukázal, jako průkazný, což mohlo být ovlivněno neodebráním samotného *P. sylvatica*. Složení společenstva na obou sledovaných plochách podle výsledků nebylo ovlivněno přítomností poloparazitického druhu. Pokus s vypletím sledovaného druhu se ukázal jako neúspěšný. Bylo by potřeba *P. sylvatica* častěji plít. Doporučovala bych s výzkumem pokračovat k větší determinaci hostitelského spektra, popřípadě vytvořit skleníkový pokus s druhem *Ranunculus acris*, který se mi podařilo osekvenovat jako hostitele, ale nebylo potvrzeno spojení s poloparazitem — v řezu haustorií nebyl nalezen xylémový můstek.

8 Literatura

- Adamec V.** (2012): Biologie poloparazitického druhu *Melampyrum nemorosum*. Magisterská diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.
- Ameloot E., Verheyen K., Bakker J. P., De Vries Y., Hermy M.** (2006): Long-term dynamics of the hemiparasite *Rhinanthus angustifolius* and its relationship with vegetation structure. *Journal of Vegetation Science* 17: 637–646.
- Atsatt P. R.** (1973): Parasitic flowering plants: how did they evolve? *The American Naturalist* 107: 502–510.
- Bao G., Suetsugu K., Wang H., Yao X., Liu L., Ou J., Li CH.** (2015): Effects of the hemiparasitic plant *Pedicularis kansuensis* on plant community structure in a degraded grassland. *The Ecological Society of Japan* 30: 507–515.
- Bidartondo M. I. & Read D. J.** (2008) Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* 17: 3707–3716.
- Cameron D. D., Coats A. M., Seel W. E.** (2006): Differential resistance among host and nonhost species under the variable access of the hemi-parasitic plant *Rhinanthus minor*. *Annals of Botany* 98: 1289–1299.
- Cameron D. D. & Seel W. E.** (2007): Functional anatomy of haustoria formed by *Rhinanthus minor*: linking evidence from histology and isotope tracing. *New Phytologist* 174: 412–419.
- Danihelka J., Chrtek J., Kaplan Z.** (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. *Preslia* 84: 647–811.
- Demey A., Staelens J., Baeten L., Boeckx P., Hermy M., Kattge J., Verheyen K.** (2013a) Nutrient input from hemiparasitic litter favors plant species with a fast-growth strategy. *Plant Soil* 371: 53–66.
- Demey A.** (2013b) Impacts of hemiparasitic plants on the vegetation and biogeochemical cycling in two contrasting semi-natural grassland types. PhD thesis, Ghent University, Ghent, Belgium, 148p.
- Demey A., De Frenne P., Baeten L., Verstraeten G., Hermy M., Boeckx P., Verheyen K.** (2014a): The effects of hemiparasitic plant removal on community structure and seedling establishment in semi-natural grasslands. *Journal of Vegetation Science* 10: 1–12.

- Demey A., Rütting T., Huygens D., Staelens J., Hermy M., Verheyen K., Boeckx P.** (2014b): Hemiparasitic litter additions alter gross nitrogen turnover in temperate semi-natural grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 68: 419–428.
- Demey A., De Frenne P., Baeten L., Verstraeten G., Hermy M., Boeckx P., Verheyen K.** (2015): The effects of hemiparasitic plant removal on community structure and seedling establishment in semi-natural grasslands. *Journal of Vegetation Science* 26: 409–420.
- Dörr I.** (1997): How *Striga* parasitizes its host: a TEM and SEM study. *Annals of Botany* 79: 463–472.
- Dostál J.** (1989): *Nová květena ČSSR 2*. Academia, Praha.
- Faltysová H., Bárta F. a kol.** (2002): Pardubicko. In: Mackovčín P. a Sedláček M. (eds.): *Chráněná území ČR, svazek IV*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno, Praha, 316 pp.
- Fibich P., Lepš J., Berc L.** (2010): Modelling the population dynamics of root hemiparasitic plants along a productivity gradient. *Folia Geobotanica*, 45: 425–442.
- Gibson C. C. & Watkinson A. R.** (1991): Host selectivity and the mediation of competition by the root hemiparasite *Rhinanthus minor*. *Oecologia* 86: 81–87.
- Gibson C. C. & Watkinson A. R.** (1992): The role of the hemiparasitic annuals *Rhinanthus minor* in determining grassland community structure. *Oecologia* 89: 62–68.
- Gibson C. C. & Watkinson A. R.** (1989): The host range and selectivity of parasitic plant: *Rhinanthus minor* L. *Oecologia* 78: 401–406.
- Grulich V.** (2012) Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. Dedicated to the centenary of the Czech Botanical Society. *Preslia* 84: 631–645.
- Hegi G.** (1975): *Pedicularis* L., *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* VI: 261–315
- Hothorn T., Hornik K., van de Wiel M. A., Zeileis A.** (2008): Implementing a class of permutation tests: the coin package. *Journal of Statistical Software* 28: 1–23.
- Chábera S., Demek J., Hlaváč V., Kříž H., Malecha A., Novák V., Odehnal L., Suk M., Tomášek M., Zúška V.** (1985): *Jihočeská vlastivěda. Neživá příroda*. Jihočeské nakladatelství, České Budějovice.

- Chán V.** (1999): Komentovaný Červený seznam květeny jižní části Čech. Příroda, Praha 16: 1–284.
- Chytrý M. et al.** (2001): Katalog biotopů České republiky. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.
- Irving L. J. & Cameron D. D.** (2009): You are what you eat. *Advances in Botanical Research* 50: 88–138.
- Jackson R. B., Moore L. A., Hoffmann W. A., Pockman W. T. & Linder C. R.** (1999): Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 11387–11392.
- Jensen K.** (2004): Dormancy patterns, germination ecology, and seed – bank type of twenty temperate fen grassland species. *Wetlands* 24: 152–166.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A.** (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Koutecký P. & Košnar J.** (2014): Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice, Protokoly a návody pro praktikum. Laboratoř molekulární biologie rostlin. Přírodovědecká fakulta JU (verze 2013–2014), 1–59.
- Kuijt J.** (1979): Host selection by parasitic angiosperm. *Symposia Botanica Uppsala XXII*: 4: 194–199.
- Lepš J.** (2014): Scale and time-dependent effects of fertilization, mowing and dominant removal on a grassland community during a 15-year experiment. *Journal of Applied Ecology* 51: 978–987
- Lepš J. & Těšitel J.** (2015): Root hemiparasites in productive communities should attack competitive host, and harm them to make regeneration gaps. *Journal of Vegetation Science* 26: 407–408.
- Maybrook A. C.** (1917): On the haustoria of *Pedicularis vulgaris* Tournef. *Annals of Botany* 31: 499–511.

- Mudrak O, Mladek J, Blaek P, Lepš J, Doleal J, Nekvapilova E, Těšitel J.** (2014). Establishment of hemiparasitic *Rhinanthus spp.* in grassland restoration: lessons learned from sowing experiments. *Applied Vegetation Science* 17: 274–287.
- Mudrak O. & Lepš J.** (2010): Interactions of hemiparasitic species *Rhinanthus minor* with its host plant community at two nutrient levels. *Folia Geobotanica* 45: 407–424.
- Newmaster S. G., Fazekas A. J., Ragupathy S.** (2006): DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany*, 84: 335–341.
- Prati D., Matthies D., Schmid B.** (1997): Reciprocal parasitism in *Rhinanthus serotinus*: a model system of physiological interaction in clonal plants. *Oikos* 78: 221–229.
- Press C. M. & Phoenix G.K.** (2005): Impacts of parasitic plants on natural Communities. *Tansley review* 166: 737–751.
- Průšova M** (2010): Ekologie populace jednoleteho poloparazitickeho druhu *Melanpyrum pratense*. Diplomova prace, Pırodovedeka fakulta, Jihoeska univerzita v eskych Budějovicich, eska republika.
- R Core Team** (2015): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Roalson, E. H., & Friar E. A.** (2000): Infrageneric classification of *Eleocharis* (Cyperaceae) revisited: Evidence from the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. *Systematic Botany* 25: 323–336.
- Rümer S., Cameron D. D., Wacker R. Hartung W., Jiang F.** (2007): An anatomical study of haustoria of *Rhinanthus minor* attached to roots of different hosts. *Flora* 202:194–200.
- Ryberg M., Nilsson R. H., Kristiansson E., Töpel M., Jacobsson S., Larsson E.** (2008) Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: A case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evolutionary Biology* 8: 50.
- Suetsugu K., Kawakita A., Kato M.** (2008): Host range and selectivity of the hemiparasitic plant *Thesium chinense* (Santalaceae). *Annals of Botany* 102: 49–55.

- Svensson M. B., Seel E. W., Nilsson C. H., Carlsson A. B.,** (2001): Roles played by timing of seedling development and host identity in determining fitness of an annual, subarctic, hemiparasitic plant. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*. 33: 299–305.
- Šmilauer P. & Lepš J.** (2014): Multivariate analysis of ecological data using CANOCO 5. University of South Bohemia. 1–318.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F. et al.** (2007): Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* 35: e14.
- Taberlet P., P., Gielly L., Patou G., Bouvet J.** (1991): Universal primers for amplification of green non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- ter Braak C. J. F. & Šmilauer P.** (2012): Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Micro komputer Power, Ithaca, USA, 496 pp.
- Těšitel J., Plavcová L., Cameron D. D.** (2010): Heterotrophic carbon gain by the root hemiparasites, *Rhinanthus minor* and *Euphrasia rostkoviana* (Orobanchaceae). *Planta* 231: 1137–1144.
- Těšitel J., Fibich P., De Bello F., Chytrý M., Lepš J.** (2015): Habitats and ecological niches of root-hemiparasitic plants: an assessment based on a large database of vegetation plots. *Preslia* 87: 87–108
- Valentini A., Pompanon F. & Taberlet P.** (2008): DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology and evolution* 24: 110–117.
- van Hulst R., Shipley B. & Trériault A.** (1987): Why is *Rhinanthus minor* (Scrophulariaceae) such a good invader? *Canadian Journal of Botany* 11: 2373–2379.
- Weber H. Chr.** (1976): Über Wirtspflanzen und Parasitismus einiger mitteleuropäischer Rhinanthoideae (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* 125: 97–107.
- Weber H. Chr.** (1987): *Pedicularis groenlandica* Retz. And *Pedicularis rosea* Wulf. Two hemiparasitic members of Scrophulariaceae. Weber H. Chr. et Forstreuter W. Philipps-Universität, Marburg. 200–391.

- Westbury D. B., Davies A., Woodcock B. A., Dunnett N. P.** (2006): Seeds of change: The value of using *Rhinanthus minor*. *Journal of Vegetation science* 17: 435–446.
- White J. R., Navlakha S., Nagarajan N., Ghodsi M. R., Kingsford C., Pop M.,** (2010): Alignment and clustering of phylogenetic markers – implications for microbial diversity studies. *BMC Bioinformatics* 11:152.
- White T., Burns T., Lee S., Tailor J. W.** (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes of phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications* 64: 315–322.
- Yu J., Xue J., Zhou S.** (2011): New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution* 49: 176–181.

9 Přílohy

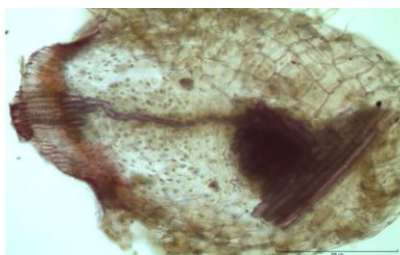
Příloha 1: Porovnání výskytu druhů z mých fytoecologických snímků s Českou národní fytoecologickou databází. Zajímavé je, že na sledovaných lokalitách se nenašly druhy *Achillea ptarmica* a *Festuca praitensis*. Červeně vyznačené druhy jsou zjištěni parazité na lokalitě Zubří. Hodnoty uvedené v tabulce je podíl výskytu sledovaného druhu ku počtu ploch na lokalitě v daném roce; u české národní fytoecologické databáze je to ku počtu všech snímků s *Pedicularis sylvatica* (62).

dru/snímek [%]	ČNFD	Zubří semenáče 2014	Zubří dospělci 2014	Zubří semenáče 2015	Zubří dospělci 2015	Ohrazení semenáče 2014	Ohrazení dospělci 2014
<i>Potentilla erecta</i>	0,95	0,93	1,00	1,00	1,00	0,70	0,50
<i>Nardus striga</i>	0,90	0,40	0,60	0,70	0,80	0,50	0,50
<i>Carex panicea</i>	0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	0,60	0,70
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	0,79	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00	0,90
<i>Carex nigra</i>	0,77	0,80	0,90	0,80	0,90	0,20	0,50
<i>Festuca rubra</i>	0,77	0,80	0,80	0,40	0,80	0,10	0,40
<i>Luzula campestris</i>	0,74	0,60	0,40	0,40	0,40	0,00	0,00
<i>Ranunculus acris</i>	0,65	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80
<i>Briza media</i>	0,61	0,60	0,80	0,50	0,60	0,30	0,40
<i>Cirsium palustre</i>	0,61	0,33	0,30	0,10	0,20	0,30	0,30
<i>Carex echinata</i>	0,56	0,13	0,40	0,10	0,60	0,50	0,20
<i>Holcus lanatus</i>	0,53	0,67	0,30	0,50	0,70	1,00	0,90
<i>Succisa pratensis</i>	0,50	0,07	0,10	0,10	0,00	0,10	0,20
<i>Carex pallescens</i>	0,48	0,00	0,00	0,30	0,20	0,50	0,60
<i>Agrostis canina</i>	0,47	0,33	0,80	0,20	0,90	0,50	0,20
<i>Carex pilulifera</i>	0,47	0,40	0,00	0,60	0,10	0,20	0,10
<i>Plantago lanceolata</i>	0,47	0,07	0,10	0,10	0,00	0,10	0,10
<i>Rumex acetosa</i>	0,47	0,20	0,20	0,50	0,20	0,10	0,00

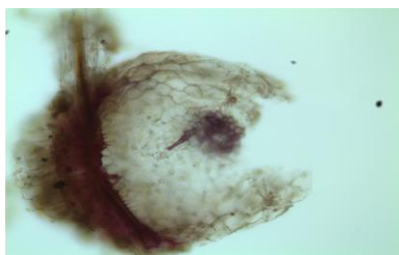
dru/snímek [%]	ČNFD	Zubří semenáče 2014	Zubří dospělci 2014	Zubří semenáče 2015	Zubří dospělci 2015	Ohrazení semenáče 2014	Ohrazení dospělci 2014
<i>Lychnis flos-cuculi</i>	0,45	0,27	0,20	0,00	0,00	0,30	0,30
<i>Viola palustris</i>	0,45	0,07	0,10	0,00	0,00	0,10	0,00
<i>Myosotis palustris</i>	0,42	0,27	0,20	0,00	0,40	0,20	0,30
<i>Prunella vulgaris</i>	0,42	0,67	0,40	0,60	0,60	0,30	0,30
<i>Deschampsia cespitosa</i>	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Eriophorum angustifolium</i>	0,37	0,27	0,20	0,70	0,30	0,00	0,00
<i>Galium uliginosum</i>	0,37	0,73	0,60	0,30	0,80	0,50	0,70
<i>Sanguisorba officinalis</i>	0,37	0,40	0,30	0,30	0,20	0,00	0,00
<i>Achillea millefolium</i>	0,35	0,07	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
<i>Danthonia decumbens</i>	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10
<i>Valeriana dioica</i>	0,35	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00
<i>Polygala vulgaris</i>	0,35	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
<i>Achillea ptarmica</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,30
<i>Ajuga reptans</i>	0,00	0,07	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Angelica sylvestris</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
<i>Anemone nemorosa</i>	0,00	0,47	0,40	0,60	0,30	0,00	0,00
<i>Angelica sylvestris</i>	0,00	0,13	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Betonica officinalis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,10
<i>Betula sp. (pendula)</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20
<i>Calluna vulgaris</i>	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Cardamine pratensis</i>	0,00	0,20	0,10	0,10	0,30	0,00	0,00
<i>Carex ovalis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
<i>Carex flava</i>	0,00	0,07	0,20	0,00	0,10	0,00	0,00
<i>Carex hartmanii</i>	0,00	0,27	0,70	0,60	0,30	0,00	0,00
<i>Carex pulicaris</i>	0,00	0,27	0,50	0,60	0,40	0,00	0,00
<i>Crepis paludosa</i>	0,00	0,07	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00
<i>Dactylorhiza majalis</i>	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00

dru/snímek [%]	ČNFD	Zubří semenáče 2014	Zubří dospělci 2014	Zubří semenáče 2015	Zubří dospělci 2015	Ohrazení semenáče 2014	Ohrazení dospělci 2014
<i>Epilobium palustre</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
<i>Equisetum sylvaticum</i>	0,00	0,13	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00
<i>Equisetum arvense</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
<i>Festuca ovina</i>	0,00	0,87	0,60	1,00	0,90	0,10	0,40
<i>Galium palustre</i>	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,40	0,00
<i>Hypericum maculatum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Juncus effusus</i>	0,00	0,07	0,20	0,00	0,20	0,70	0,10
<i>Lathyrus pratensis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,70
<i>Luzula multiflora</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,60
<i>Lysimachia vulgaris</i>	0,00	0,33	0,10	0,00	0,20	0,70	0,50
<i>Molinia arundinacea</i>	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,90	0,80
<i>Mentha sp.</i>	0,00	0,07	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Poa sp.</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ranunculus auricomus</i>	0,00	0,60	0,60	0,40	0,70	0,10	0,00
<i>Ranunculus flammula</i>	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,30	0,20
<i>Rhinanthus minor</i>	0,00	0,07	0,00	0,10	0,30	0,00	0,00
<i>Salix aurita</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,20
<i>Scirpus sylvaticus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,40
<i>Scutellaria galericulata</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Selinum carvifolia</i>	0,00	0,13	0,40	0,00	0,00	0,10	0,30
<i>Veronica officinalis</i>	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Vicia cracca</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,20
<i>Viola canina</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00

Příloha 2: Řezy vzorků z roku 2014 barveny floroglucinolem. Pro dva vzorky bohužel nemohu doložit fotografie vinou špatného stavu haustorií.



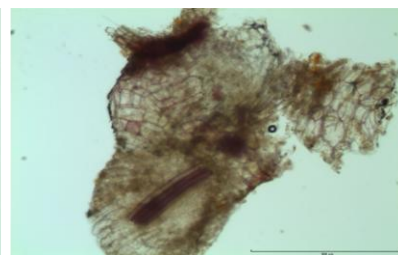
Řez s *Cirsium palustre* (M2_1).



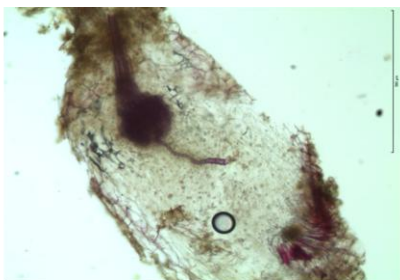
Řez s *Anthoxanthum odoratum* (M2_2).



Řez s *Galium uliginosum* (M2_3).



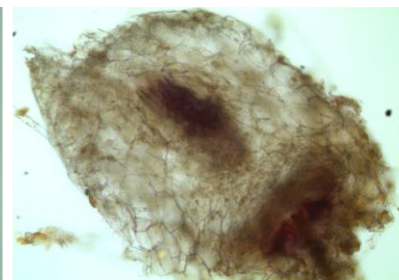
Řez s *Briza media* (M4_1).



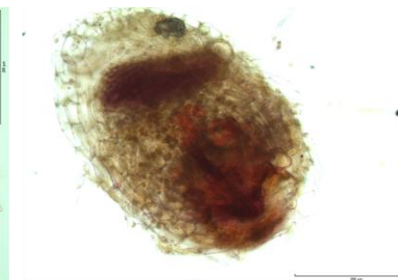
Řez s *Briza media* (M4_6).



Řez s *Pedicularis sylvatica* (M5_3).



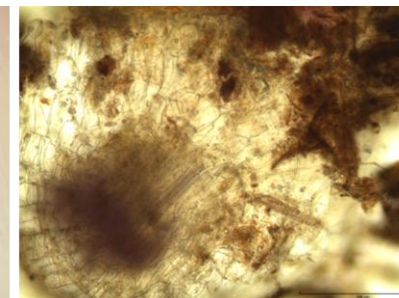
Řez s *Achillea ptarmica* (M6_2).



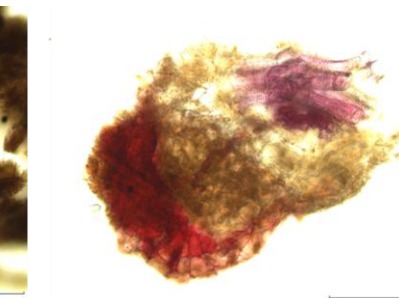
Řez s *Galium uliginosum* (M7_1).



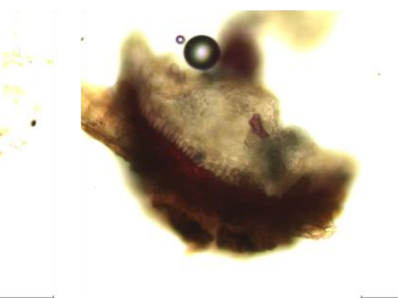
Řez s *Prunella vulgaris* (M10_6).



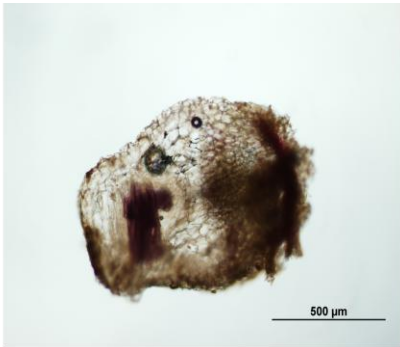
Řez s *Luzula campestris* (V3_1).



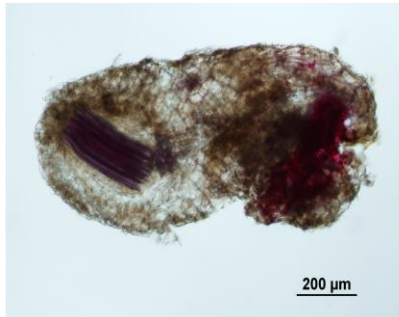
Řez s *Betonica officinalis* (V3_3).



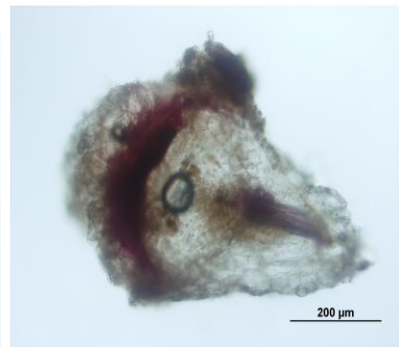
Řez s *Juncus effesus* (V3_5).



Řez s *Nardus stricta* (V4_1).



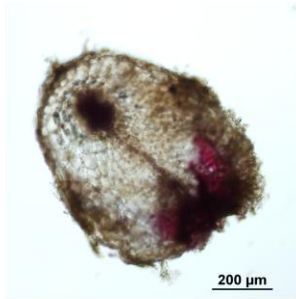
Řez s *Pedicularis sylvatica* (V5_1).



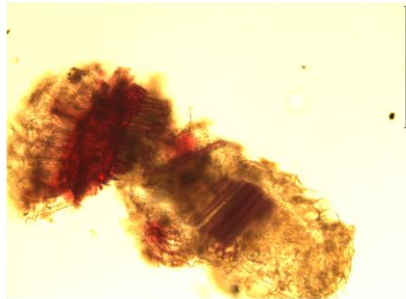
Řez s *Antoxanthum odoratum* (V5_2).



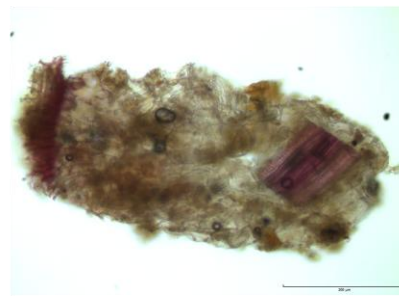
Řez s *Festuca ovina* (V5_3).



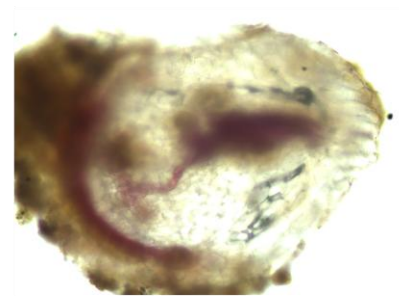
Řez s *Pedicularis sylvatica* (V7_1).



Řez s *Festuca ovina* (V9_1).

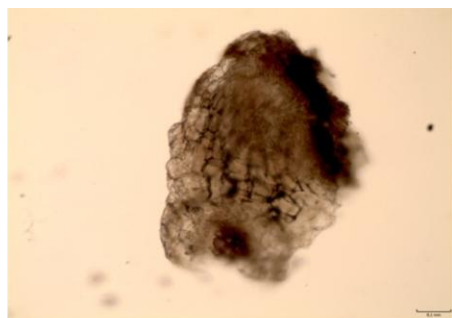


Řez s *Festuca pratensis* (V10_1).

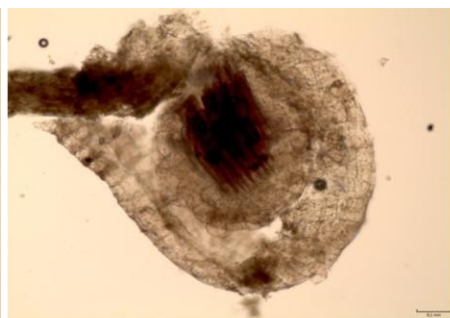


Řez s *Pedicularis sylvatica* (V10_4).

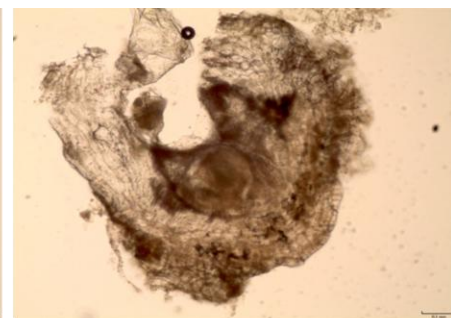
Příloha 3: Řezy vzorků z roku 2015 barveny floroglucinolem. Pro tři vzorky bohužel nemohu doložit fotografie vinou špatného stavu haustorií.



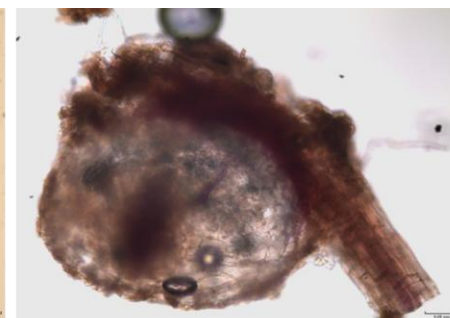
Řez s *Nardus stricta* (M2_1).



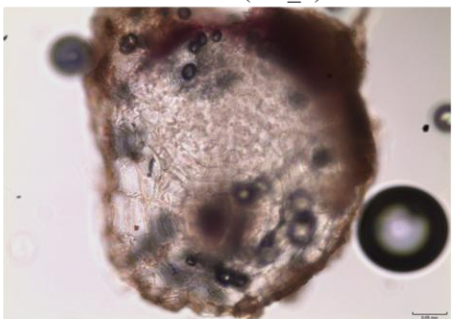
Řez s *Pedicularis sylvatica* (M2_2).



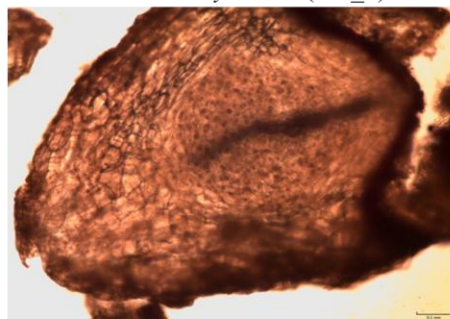
Řez s *Pedicularis sylvatica* (M3_2).



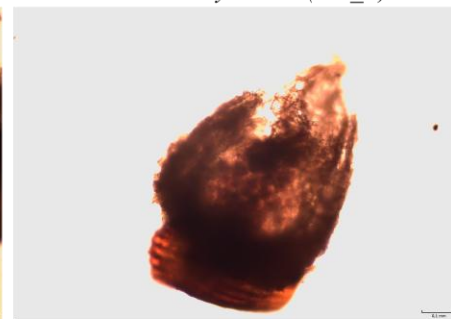
Řez s *Festuca ovina* (M6_1).



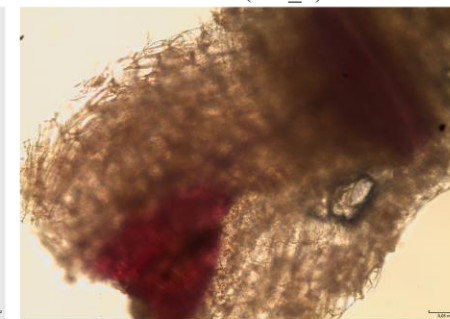
Řez s *Festuca ovina* (M9_2).



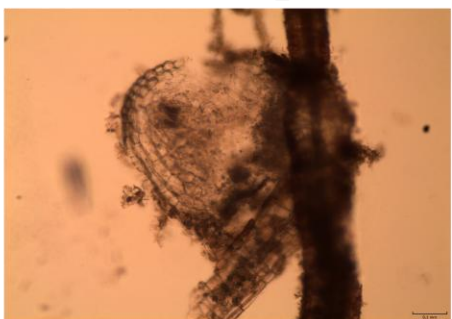
Řez s *Pedicularis sylvatica* (V1_4).



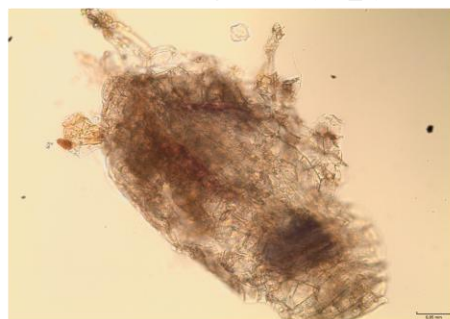
Řez s *Pedicularis sylvatica* (V3_9).



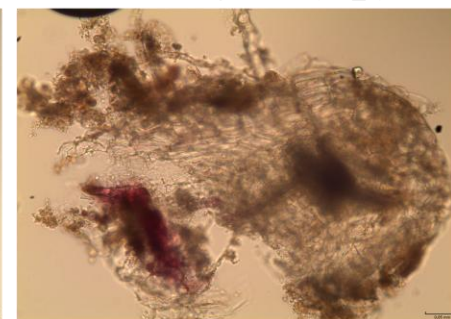
Řez s *Antoxanthum odoratum* (V4_8).



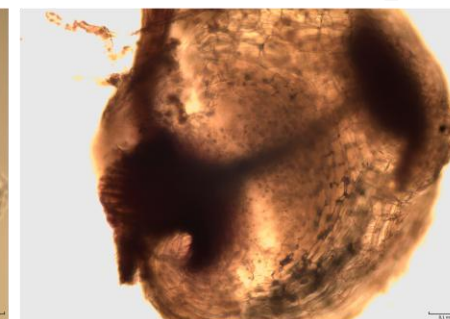
Řez s *Festuca rubra* (V5_3).



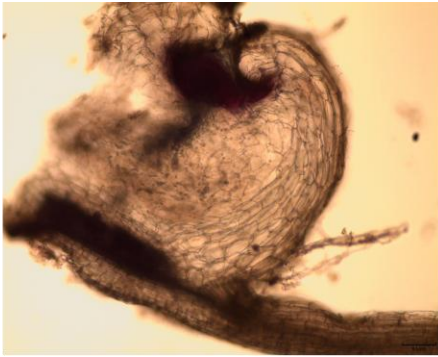
Řez s *Carex panicea* (V5_6).



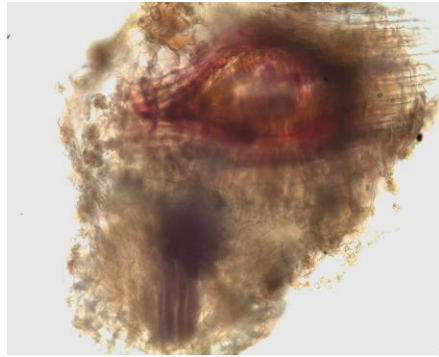
Řez s *Antoxanthum odoratum* (V5_9).



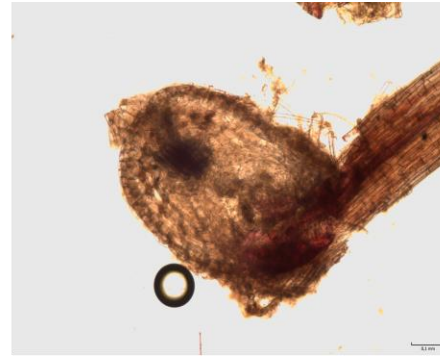
Řez s *Festuca ovina* (V6_2).



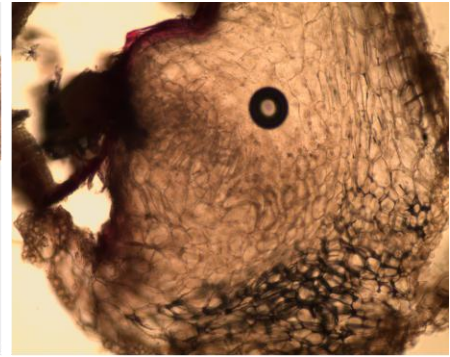
Řez s *Holcus lanatus* (V6_6).



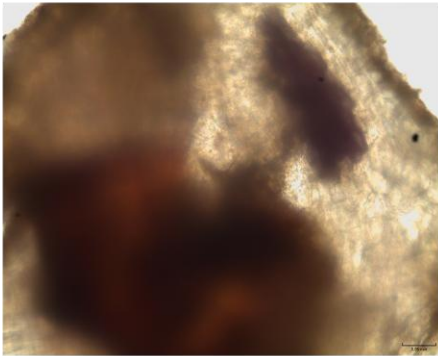
Řez s *Ranunculus acris* (V7_9).



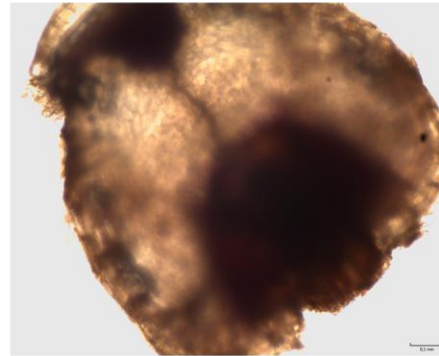
Řez s *Ranunculus acris* (V7_10).



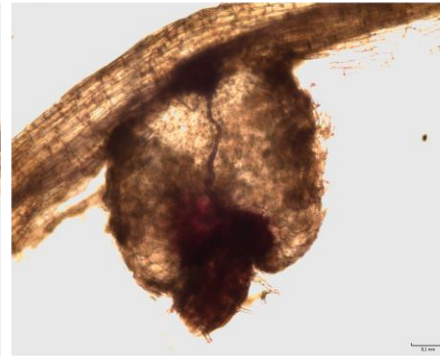
Řez s *Carex panicea* (V7_11).



Řez s *Ranunculus auricomus* (V8_2).



Řez s *Carex panicea* (V10_5).



Řez s *Festuca rubra* (V10_7).