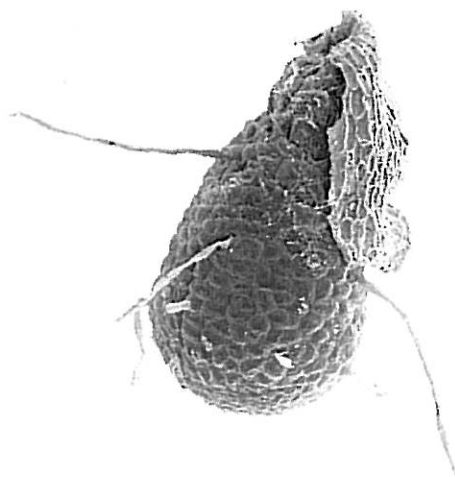


Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta

Bakalářská diplomová práce

**Průběh klíčení a mykorhizní asociace  
čtyř druhů rodu *Epipactis***



Tamara Malinová

Školitel: RNDr. Jana Jersáková, PhD.

České Budějovice 2006



**Malinová T. 2006.** Průběh klíčení a mykorhizní asociace čtyř druhů rodu *Epipactis* [Germination course and mycorrhizal associations in four *Epipactis* species, Bc. Thesis; in Czech]. – 48 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace**

Mycorrhizal ecology of four *Epipactis* species (*E. albensis*, *E. atrorubens*, *E. helleborine*, *E. purpurata*) was studied. Habitat preferences of adult plants were analyzed using phytosociological relevés from the Czech Phytosociological Database. A field experiment was carried out to determine course of germination of *Epipactis* seeds sown in different habitat types. Roots of adult plants were examined for the fungal colonization rate and fungus-specific morphological features. Decline in seed viability during storage was observed.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury



V Českých Budějovicích, dne 9. 5. 2006

### **Poděkování**

Je mi velkým potěšením poděkovat na tomto místě všem, kteří se jakkoliv podíleli na vzniku této práce. Můj vděk patří především mé školitelce Janě Jersákové za neustálou ochotu poradit a pomoci s každým mykorhizním problémem (ačkoliv mykorhiza není zrovna "její" obor) a za cenné připomínky a trpělivost během sepisování této práce, Pavlu Kindlmannovi hlavně za to, že mě přivedl ke studiu orchideoidní mykorhizy.

Děkuji mé rodině za její velkou morální podporu během celého studia a za pomoc s dopravou na hůře dostupné lokality. Velké díky patří Jakubovi za to, že mi byl neustále pevnou oporou a ochotně naslouchal mým nekonečným dotazům a pochybám o smyslu a výsledku mojí práce, a hlavně za nedocenitelnou pomoc se statistickým zpracováním mých dat.

Děkuji Jardovi Rydlovi za upřímný zájem o mou práci, ubytování v Osečku, veškerou literaturu o kruštíku polabském a také za vynikající šípkové víno ☺. Marc-André Selosse, Marrie-Pierre Dubois a Mélanie Roy děkuji za uvedení do světa molekulárních metod používaných v orchideoidní mykorhize. Janě Nebesářové a celé laboratoři elektronové mikroskopie, Majce Šmilauerové, Blance Divišové a Pavlu Cudlínovi patří díky za jejich pomoc s barvením a pozorováním mykorhiz. Šuspovi moc děkuji za pomoc v boji se statistikou.

Chtěla bych také poděkovat algologům a bryologům, že mi ochotně zapůjčovali své vybavení, které na naší katedře chybí; mnoha botaniků i nebotanikům, kteří mi radili, kde nalézt lokality vzácnějších kruštíků; jihomoravskému krajskému úřadu za umožnění experimentovat v PP Pekárna. Chtěla bych také poděkovat všem přátelům a kamarádům na fakultě i doma, kteří zde vytváří příjemnou inspirativní atmosféru a nejednou mi pomohli překonat nečekané problematické situace.

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b>	<b>1</b>
1.1 Epiparazitické rostliny specializované na VAM houby	2
1.2 Epiparazitické rostliny specializované na EM houby	2
1.2.1 Játrovky	2
1.2.2 Monotropoideae	3
1.2.3 Orchidaceae	3
1.3 Cíle práce	7
<b>2. METODIKA</b>	<b>8</b>
2.1 Charakteristika studované skupiny	8
2.1.1 <i>Epipactis albensis</i>	8
2.1.2 <i>Epipactis atrorubens</i>	9
2.1.3 <i>Epipactis helleborine</i>	9
2.1.4 <i>Epipactis purpurata</i>	9
2.2 Analýza vegetačních snímků	10
2.3 Vysévací experiment	10
2.3.1 Popis lokalit	10
2.3.2 Uspořádání pokusu	12
2.3.3 Hodnocení klíčení semen	13
2.4 Studium houbové kolonizace kořenů dospělých rostlin	14
2.5 Sledování vitality semen	14
2.5.1 Tetrazoliový test	14
2.5.2 Optimalizace doby vápnění pro jednotlivé druhy	15
2.5.3 Změny ve vitalitě semen během roku	15
2.6 Statistické zpracování dat	15
2.6.1 Analýza vegetačních snímků	15
2.6.2 Vysévací experiment	16
<b>3. VÝSLEDKY</b>	<b>17</b>
3.1 Analýza vegetačních snímků	17
3.2 Vysévací experiment	20
3.2.1 Klíčivost semen	20
3.2.2 Průběh klíčení	24
3.3 Houbová kolonizace kořenů dospělých rostlin	26
3.3.1 Přímé pozorování nenabarvených kořenů	26
3.3.2 Pozorování nabarvených kořenů	29
3.4 Vitalita semen	29
3.4.1 Optimalizace doby vápnění pro jednotlivé druhy	29
3.4.2 Změny ve vitalitě semen během roku	31
<b>4. DISKUSE</b>	<b>33</b>
4.1 Ekologické preference dospělých rostlin	33
4.2 Klíčení semen <i>in situ</i>	34
4.3 Růst embryí	35
4.4 Mykobionti protokormů a dospělých rostlin	36
4.5 Vitalita semen	38
4.6 Závěr	40
<b>5. LITERATURA</b>	<b>43</b>
Příloha 1	
Příloha 2	

## 1. ÚVOD

Soužití hub a kořenů vyšších rostlin, neboli mykorhizní symbióza, je v rámci rostlinné říše značně rozšířené. Vznik této symbiózy se datuje pravděpodobně do období ordoviku před cca 460 miliony let (Redecker et al. 2000) a účastní se jí až 90% všech vyšších rostlin a zástupci tří oddělení hub (Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota; Selosse & Le Tacon 1998). Obecně je toto soužití považováno za mutualistické. Mutualismus hub a rostlin je často možné definovat jako vzájemně rovnovážný parasitismus přinášející prospěch oběma partnerům (Bidartondo 2005). Zjednodušeně řečeno, v mykorhizní symbióze poskytuje rostlina houbě asimiláty a houba na oplátku rostlině vodu a minerální látky (Smith & Read 1997). Tento model výživy mykorhizních symbióz však platí pouze velmi obecně; při změně podmínek prostředí může docházet k narušení mutualistické rovnováhy mezi partnery. Dále existují speciální typy symbióz, u kterých je zřejmé, že se jedná o symbiózy parazitické, vzhledem k úplné heterotrofii rostlinných symbiontů či jejich přechodné heterotrofii během ontogenetického vývoje.

Zcela nezelených rostlin, které neparazitují přímo na kořenech jiných autotrofních rostlin, roste na Zemi více než 400 druhů (Leake 1994). Tyto rostliny byly dříve nesprávně považovány za saprofyty – tedy organismy živící se rozkladem humusu a organického opadu (např. Kincl & Faustus 1977). Později byly v kořenech „saprofytů“ objeveny mykorhizní struktury (Reissek 1847, Wahrlich 1886) a pomocí radioaktivních izotopů se prokázalo, že rostliny získávají živiny od houby (např. Björkman 1960, Smith 1967). Tento způsob výživy byl pojmenován mykoheterotrofií, příp. mykotrofií (Dressler 1981, Leake 1994). První studii, která naznačila, že trofické vztahy těchto druhů mohou být daleko složitější, provedl Björkman (1960) na *Monotropa hypopitys*. Pomocí značených izotopů prokázal, že houba, která tvoří endotrofní mykorhizu v kořenech této rostliny, tvoří zároveň ektotrofní mykorhizu na kořenech blízko rostoucího smrku a zprostředkovává přenos asimilátů smrku do kořenů mykotrofa. Pro tento nepřímý parasitismus poprvé použil termín epiparazitismus.

Epiparazitismus mykoheterotrofních rostlin je (obvykle) definován jako trojstranné soužití mezi parazitickým organismem, zprostředkujícím mykobiontem a finálním autotrofním hostitelem (Bidartondo 2005). Díky současnému rozvoji molekulárních metod se (v posledních letech) tento speciální typ výživy postupně rozpoznává u stále širšího spektra mykotrofních rostlin. Přestože tento fenomén vznikl několikrát nezávisle na sobě napříč rostlinnou říší, všechny epiparazitické rostliny spojuje těsná závislost na určité skupině druhů hub z jednoho, či více blízkce příbuzných rodů. Úzká specializace na hostitelskou houbu pravděpodobně umožňuje heterotrofní rostlině lepší přizpůsobení fyziologii houby, což zřejmě zefektivňuje přenos látek (Bruns, Bidartondo & Taylor 2002). Parazitované houby se zároveň účastní mutualistických ektomykorhizních nebo vesikulo-arbuskulárních mykorhizních symbióz, které jsou naopak většinou považovány za velmi málo specifické ve vztahu k houbovému symbiontu (Smith & Read 1997).

Epiparazitické rostliny tak můžeme rozdělit na ty, které využívají vesikulo-arbuskulární (VAM) nebo ektomykorhizní houby (EM).

### **1.1 Epiparazitické rostliny specializované na VAM houby**

Většina nezelených mykotrofních rostlin tvoří mykorhizu se zástupci oddělení Glomeromycota. Těžištěm výskytu mykoheterotrofů jsou tropické lesy, kde je symbióza s VAM houbami dominantním typem mykorhiz (Smith & Read 1997). Tyto rostliny se řadí především do čeledí Burmanniaceae (přes 80 druhů), Triuridaceae (přes 50 druhů), Gentianaceae (přes 20 druhů) a Corsiaceae (přes 20 druhů) (Leake 2004). Endosymbiotické struktury vykazují velké strukturální přizpůsobení (v porovnání s běžnou VAM) a často velmi složité uspořádání, které umožňuje maximální využití mykobionta (např. Imhof 1997, Imhof 1999, Imhof 2003, Dominguez & Sersic 2004).

Dosavadní molekulární determinace houbových symbiontů několika nezelených druhů z těchto čeledí vždy odhalily úzkou specializaci rostlin na rozdílné zástupce rodu *Glomus* (Glomeraceae, *Glomus* skupina A). U sesterských druhů nebyl zaznamenán žádný překryv symbiontů ani na lokalitách, kde rostly sympatricky. Úzká specializace není proto založena jen na lokální nedostupnosti vhodného mykobionta. Mykobionti z kořenů byli detekováni i v kořenech okolních fotosyntetických bylin i dřevin (Bidartondo *et al.* 2002, Yamato 2001).

Ačkoliv v těchto studiích nebylo provedeno izotopové potvrzení přenosu asimilátů z okolních zelených hostitelů do kořenů mykoheterotrofa, je toto uspořádání vysoce pravděpodobné. VAM houby jsou totiž obligátní biotrofové, neschopní rozkladu organického materiálu v půdě, a tudíž zcela závislí na příjmu uhlovodíků od svého fotosyntetického partnera (Smith & Read 1997).

### **1.2 Epiparazitické rostliny specializované na EM houby**

#### **1.2.1 Játrovky**

Ačkoliv játrovky nemají kořeny, u mnohých z nich byly v rhizoidech nalezeny mykorhizní struktury, jejichž fyziologický význam zatím nebyl ve většině případů vyjasněn (např. Read *et al.* 2000). Všechny bazální skupiny játrovek se pojí se zástupci Glomeromycota. U odvozenějších skupin došlo ke ztrátě symbionta, zřejmě v důsledku přechodu z terestrického způsobu života na epifytický. V některých případech došlo k opětovnému několikanásobnému vzniku symbiózy u druhů rostoucích terestricky na humusu či hnijícím dřevě, tentokrát se však vytvořily mykorhizní vztahy se zástupci skupin Basidiomycota a Ascomycota (Kottke & Nebel 2005). Ve skupině Aneuraceae (řád Metzgeriales), jedné z čeledí lupenitých játrovek, se vyvinulo spojení s houbami řádu Tulasnellales (Homobasidiomycetes), do kterého se řadí převážně saprotrofní (mj. běžní symbionti orchidejí), ale i ektomykorhizní zástupci. U jediného nezeleného zástupce této čeledi, druhu *Cryptothallus mirabilis* se experimentálně prokázala epiparazitická závislost na druzích *Betula pendula* a *Pinus pinaster* přes sdílené hyfy zástupce rodu *Tulasnella* (Bidartondo *et al.* 2003).

### 1.2.2 Monotropeidae

Nezelení zástupci podčeledi Monotropeidae (čeleď Ericaceae), tvoří zvláštní typ ektendomycorhizní symbiózy, tzv. monotropoidní mykorhizu. Houby vytvářejí kolem kořene rostliny vnější bal, ale zároveň pronikají i do vnitřního prostředí buňky pomocí zvláštních kuličkovitých útvarů. Monotropoidní rostliny jsou vázané na temperátní lesy severní polokoule, kde rostou v těsném spojení s kořeny stromů, kolem kterých vytvářejí vlastní hustý kořenový bal (Smith & Read 1997, Leake 1994).

Podčeleď Monotropeidae je nejlépe prozkoumanou skupinou epiparazitických rostlin. Všechny monotropoidní druhy se pojí s různými zástupci šesti skupin obligátně ektomykorhizních Basidiomycota (z rodů *Rhizopogon*, *Tricholoma*, *Gauteria*, *Hydnellum* a čeledi Russulaceae a Thelephoraceae; Bidartondo & Bruns 2001, 2002, 2005, Yokoyama, Fukuda & Tsukaya 2005). Detailní fylogenetické studie většiny zástupců podčeledi a jejich mykobiontů ukazují na velmi těsnou koevoluci partnerů. Míra specifity těchto druhů se zdá být korelována s velikostí geografického areálu jednotlivých druhů; u druhů s menším areálem bylo nalezeno méně druhů hub než u druhů s velkým areálem (Bidartondo & Bruns 2001). Velmi zajímavá je skutečnost, že v jednotlivých částech areálu jsou rostliny velmi úzce přizpůsobeny svému mykorhiznímu partnerovi. Semena rostlin, které se lokálně pojí s určitým mykobiontem, klíčí lépe s mykobiontem své mateřské rostliny, než s mykobionty rostlin z jiných částí areálu, přestože se pořád jedná o tentýž druh rostliny (Bidartondo & Bruns 2005). Až neobvyklá míra koevoluce hub a rostlin byla pozorována u sesterských druhů *Sarcodes sanguinea* a *Pterospora andromeda*, které se výlučně pojí každý jen se dvěma druhy hub rodu *Rhizopogon*, které jsou si navzájem také nejbližšími příbuznými. Navzdory častému sympatrickému výskytu rostlin i jejich mykorhizních hub se mykobionti dospělých rostlin nepřekrývají (Bidartondo & Bruns 2001, 2002). Jiná situace je u klíčících semen, kde *in vitro* vysévací experimenty ukázaly, že oba druhy klíčí se všemi druhy hub nalezených u obou dospělých rostlin, jiné EM Basidiomycota však klíčící reakci nevyvolaly. Je tedy pravděpodobné, že chemický signál blízké příbuzných mykobiontů je velmi podobný a nespecificky spouští klíčení (Bruns & Read 2000).

### 1.2.3 Orchidaceae

Čeleď Orchidaceae je druhově velmi bohatá a ekonomicky významná, zároveň však silně ohrožená skupina rostlin. Komerční a ochranné snahy o pěstování orchidejí proto vedly k širokému zájmu vědecké i laické veřejnosti o výzkum jejich mykorhizy. Orchideoidní mykorhiza, charakteristická pouze pro tuto čeleď, je zvláštním typem endotrofní mykorhizy. Hyfy hub tvoří v buňkách kořene charakteristická klubička, tzv. pelotony. Přes dlouholetý výzkum však přesná definice vztahu mezi orchidejí a houbou zůstává stále nerozřešeným problémem. Dosud se totiž nepodařilo prokázat přenos asimilátů z kořene fotosyntetizující rostliny do houby, a nalézt tak odpověď na otázku, zda má mykorhizní houba ze soužití vůbec nějaký prospěch. Jisté však je, že ačkoliv je většina orchidejí v dospělosti autotrofní a nejspíš

nezávislá na příjmu uhlíkatých látek od hub (Alexander & Hadley 1985), rané stadium vývoje, tzv. protokorm, je heterotrofní s minimálním množstvím vlastních zásobních látek a zcela odkázané na výživu mykotrofií (např. Hadley 1984, Alexander & Hadley 1985).

#### Mykobionti zelených orchidejí lučních a jiných otevřených stanovišť

Běžnými mykorhizními partnery zelených orchidejí otevřených stanovišť jsou Basidiomycota ze složitěho polyfyletického komplexu hub označovaného jako *Rhizoctonia* agg., jehož zástupci jsou obecně považováni za saprotrofy či parazity rostlin (Rasmussen 2002). Skupina zahrnuje vzdáleně příbuzné skupiny Ceratobasidiales, Sebacinaceae a Tulasnellales, přičemž některé houbové linie mají schopnost tvořit i ektomykorhizy (Taylor *et al.* 2003). Pokusy o definici vztahu mezi zelenou orchidejí a houbou založené na kultivaci hub a morfologické determinaci mykobiontů většinou vedly k závěru, že tento vztah je velmi málo druhově specifický; mykobionti jednoho druhu často patřili k několika různým skupinám komplexu *Rhizoctonia* agg. (např. Currah, Smreciu & Hambleton 1990, Zelmer, Cuthbertson & Currah 1996). Tyto výsledky však mohou být zkresleny obtížemi s určením hub, neboť houby komplexu *Rhizoctonia* agg. málokdy tvoří pohlavní struktury, což stěžuje determinaci, a také tím, že z výsledků kultivací většinou nebylo možné rozlišit, zda nalezená houba je mykorhizní či nikoliv (Taylor *et al.* 2002).

Naopak studie provedené na australských orchidejích, kde byly kultivovány pouze houby z jednotlivých pelotonů (např. Warcup 1981), ukázaly výraznou druhovou specifitu – některé druhy orchidejí se napříč svým areálem pojily s jediným druhem či rodem hub a jen málo druhů tvořilo mykorhizu s více rody rhizoktonií. Navíc blízce příbuzné druhy orchidejí často tvořily mykorhizy s jediným druhem či rodem hub. K podobným závěrům o velké vyhraněnosti k houbovému partneru z komplexu *Rhizoctonia* agg. dospěli i autoři studie o třech severoamerických zelených orchidejích, tentokrát však založené na přesných molekulárních metodách (McCormick, Whigham & O'Neill 2004).

#### Mykobionti zelených a nezelených orchidejí lesních stanovišť

Specifický fenomén v obecném náhledu na orchideoidní mykorhizu představují jak nezelené orchideje neschopné autotrofní výživy, tak i zelené orchideje rostoucí ve velmi stinném lesním prostředí (hlavně zástupci tribu Neottieae), kde výnos fotosyntézy může pokrýt plně fyziologické potřeby rostlin jen částečně (např. Bidartondo *et al.* 2004, Selosse *et al.* 2004). Tyto orchideje netvoří mykorhizy se saprofytickými *Rhizoctonia*, ale s ektomykorhizními houbami, které díky skutečnosti, že finálním hostitelem je dlouhověký strom, nejspíš představují stabilnější zdroj živin ve srovnání se saprofytickými houbami (Rasmussen 2002).

A právě schopnost zástupců tribu Neottieae využívat EM houby a okolní autotrofní stromy je prvním a zatím jediným příkladem epiparazitismu autotrofních rostlin. Tyto druhy získávají uhlíkaté látky jak autotrofně z fotosyntézy, tak i heterotrofním způsobem od houby. Uvedený způsob výživy demonstrováný u těchto orchidejí pomocí stabilních izotopů uhlíku a



výměny CO<sub>2</sub> se nazývá mixotrofie (Gebauer & Meyer 2003, Bidartondo *et al.* 2004, Julou *et al.* 2005, Girlanda *et al.* 2006).

U tribu Neottieae, zahrnujícího rody jako např. *Epipactis*, *Cephalanthera* či *Limodorum*, ale také nezelené druhy *Neottia nidus-avis*, americkou *Cephalanthera austinae* a tropické druhy rodu *Aphyllorchis* (Dressler 1981), se považuje spojení s EM houbami za ancestrální jev. Epiparasitismus zřejmě umožnil předkům tribu Neottieae osídlit temné biotopy (Selosse *et al.* 2004) a předurčil je k opakovanému vzniku úplné mykoheterotrofie. Kromě primárně nezelených druhů se totiž můžeme v přírodě poměrně často setkat s albinotickými jedinci normálně zelených druhů (Procházka 1980, Salmia 1986).

V současné době je díky rozvoji molekulárních metod specifita několika málo nezelených druhů velmi dobře prozkoumána a výsledky jsou velice zajímavé. Všechny zkoumané druhy nezelených orchidejí se pojí s velmi úzkým spektrem fylogeneticky blízce příbuzných hub. Podobně jako u podčeledi Monotropoideae se mykobionti dospělých rostlin sympatricky rostoucích blízce příbuzných druhů nepřekrývají (Taylor & Bruns 1999). Mykobionty jsou buď ektomykorhizní Basidiomycota hlavně z čeledi Russulaceae (symbionti např. u *Corallorhiza maculata*, *C. mertesiana*; Taylor & Bruns 1997, 1999, Taylor, Bruns & Hodges 2004) a Thelephoraceae (např. u *Corallorhiza trifida*, *Cephalanthera austinae*; Taylor & Bruns 1997, McKendrick *et al.* 2000), či ektomykorhizní houby rodu *Sebacina* (*Neottia nidus-avis* a některé druhy rodu *Hexalectris*; Taylor *et al.* 2003, Selosse *et al.* 2002), které jsou ale jen vzdáleně příbuzné druhům ze skupiny *Rhizoctonia* agg. (Weiss *et al.* 2004). Na jemnější nuance ve specifitě a preferenci k různým druhům hub z jednoho rodu může mít potom vliv hned několik faktorů: jednak složení společenstva stromů na lokalitě, nadmořská výška a geografická vzdálenost lokalit (Selosse *et al.* 2004, Taylor & Bruns 1999) ale také genotyp jednotlivých rostlin (Taylor, Bruns & Hodges 2004).

Co se týče mixotrofních epiparazitických orchidejí, dosud byly detailně prostudovány pouze tři druhy z tribu Neottieae (Selosse *et al.* 2004, Julou *et al.* 2005, Girlanda *et al.* 2006), u ostatních druhů byly publikovány zatím spíše jen náznaky toho, se kterými mykobionty se orchideje pojí (Bidartondo *et al.* 2004). Nicméně již teď je zřejmé, že zelení zástupci tribu Neottieae se pojí se širším spektrem EM hub, než jejich zcela heterotrofní protějšky ze stejného tribu. *Limodorum* spp., které se díky nedostatečnosti své fotosyntézy více přibližuje způsobu výživy mykoheterotrofů, závisí převážně na třech sesterských druzích rodu *Russula* (Girlanda *et al.* 2006). Naopak fotosynteticky aktivnější orchideje tribu se pojí se širším spektrem mykobiontů, přičemž v mykorhize jsou zahrnuty i Ascomycota, což je zcela nečekaný a nový aspekt orchideoidní mykorhizy. *Cephalanthera damasonium* se pojí se třemi skupinami hub – s EM Basidiomycota z čeledi Thelephoraceae a Cortinariaceae, s EM Ascomycota z řádů Pezizales a Helotiales, či s tmavými sterilními mycelii (dark septate endophyte, DSE) a jinými endofyty, jejichž význam pro rostlinu není jasný (Bidartondo *et al.* 2004, Julou *et al.* 2005). *Epipactis microphylla* vykazuje silné preference k obligátně ektomykorhiznímu druhu *Tuber* spp. (Pezizales, Ascomycota), ale z kořenů byly vyzolováni i

zástupci čeledí Russulaceae či Sebacinaceae, vyskytující se často společně na jedné rostlině (Selosse *et al.* 2004). Podobný trend preference k vřeckovýtrusným houbám se ukazuje i u ostatních zástupců rodu *Epipactis*, např. *E. distans* obsahoval EM Ascomycota z rodu *Wilcoxina*, *E. helleborine* rod *Tuber* a několik rhizoktoniových izolátů. Nejširší spektrum hub bylo nalezeno u *E. atrorubens*, a to *Tuber*, *Wilcoxina*, basidiomyceta *Inocybe*, rhizoktoniové linie i DSE (Bidartondo *et al.* 2004).

Množství uhlíkatých látek získaných od houby bylo u *Cephalanthera damasonium* odhadnuto na 30 – 85% (Gebauer & Meyer 2003, Bidartondo *et al.* 2004, Julou *et al.* 2005). Široké rozmezí hodnot vypovídá o silném vlivu prostředí na relativní příspěvek autotrofie a heterotrofie k celkovému metabolismu uhlíku u mixotrofů, a možná může částečně vysvětlit i různé výsledky v míře specifity k mykobiontům (Girlanda *et al.* 2006).

Na tribu Neottieae lze také dobře demonstrovat pravděpodobné postupné evoluční kroky nutné pro vznik úplné mykoheterotrofie. Jsou to (i) posun od saprofytických mykobiontů k EM houbám představujícím stabilnější zdroj energie a umožňujícím mixotrofii orchidejí, (ii) specializace na úzké spektrum hostitelů a (iii) úplná ztráta zeleného barviva spojená s přechodem na plně heterotrofní výživu (Julou *et al.* 2005).

#### Mykobionti klíčících semen orchidejí

Symbiotické *in vitro* kultivace semen autotrofních i heterotrofních orchidejí, pokud se zdaří, většinou ukazují na poměrně malou specifitu klíčících semen (např. Smreciu & Currah 1989). Tyto výsledky však vypovídají spíše jen o fyziologické kompatibilitě semen, navíc mohou být velmi ovlivněny podmínkami kultivace (Gryndler 2004). Naopak z výsledků experimentálních výsevů semen heterotrofních orchidejí *in situ* a přesné molekulární determinace mykobiontů je zjevné, že semena se většinou pojí se stejným rodem hub jako dospělé rostliny. Formace pelotonů jiných rodů hub byla pozorována také, ale podstatně méně často (McKendrick *et al.* 2000, 2002).

U autotrofních druhů je situace méně jasná, neboť dosud byla provedena jen jediná studie popisující mykobionty protokormů pomocí přesných molekulárních metod (McCormick, Whigham & O'Neill 2004). U dvou druhů zelených orchidejí se protokormy pojily s velmi podobným spektrem mykobiontů jako dospělé rostliny, u jednoho se naopak výčet mykorhizních partnerů zcela lišil. Další vysévací pokusy, kde však determinace mykobiontů protokormů nebyla založena na molekulární determinaci, podávají zajímavé výsledky. Např. u semen některých druhů z rodů *Cypripedium*, *Platanthera*, *Spiranthes* a druhu *Epipactis helleborine* byly pozorovány hyfy s přezkami, ačkoliv u dospělých rostlin nebyly takové houby nikdy pozorovány (Salmia 1988, Voigt 1991, van der Kinderen 1995b, Zelmer, Cuthbertson & Currah 1996). Dosavadní výsledky však mohou být velmi ovlivněny velikostí areálu a variabilitou biotopů, kde bylo pozorování provedeno.

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že mykoheterotrofové jsou velmi málo prozkoumanou skupinou parazitických rostlin a jejich výzkum je úzce spojen s finančně náročnými molekulárními metodami. U velké většiny druhů tak stále hledáme odpověď na základní otázky týkající se specifity houbových partnerů, změn ve specifitě během ontogeneze a vlivu autotrofie na míru specifity. Žalostně málo informací existuje o tom, zda mohou blízké příbuzné druhy sdílet stejného mykobionta, a zda je afinita k určité houbové skupině korelována s geografickou vzdáleností nebo odlišností biotopů.

Změny ve specifitě během ontogeneze rostlin velmi úzce souvisí s ekologií klíčení orchidejových semen. Proces klíčení mnoha druhů byl detailně prozkoumán v laboratorních podmínkách, v přírodě byl však pozorován velmi zřídka. Je proto nutné hledat odpověď na otázky: Kdy nastává klíčení semen a jak dlouho přetrvávají rostliny v juvenilní fázi? Jaká je schopnost mykotrofů osídlit nové lokality vzhledem ke spektru hub indukujících klíčení?

Hledání odpovědi na výše uvedené otázky je velmi přínosné i pro praktickou ochranu orchidejí, které v mnoha případech představují silně až kriticky ohrožené druhy rostlin. Objasnění nutriční závislosti orchidejí na houbách a okolních stromech, které jsou nejdůležitější složkou jejich biotopu, taxonomická znalost houbových partnerů a specifita klíčících semen i dospělých rostlin je velmi důležitá jak pro (i) ochranu a management orchidejových stanovišť, tak pro (ii) ex-situ množení ohrožených taxonů.

### **1.3 Cíle práce**

Tato práce se zabývá čtyřmi druhy zelených epiparazitických orchidejí z rodu kruštík (*Epipactis*), které rostou ve společenstvech výrazně odlišných svou druhovou skladbou. Cílem práce je zodpovědět následující otázky:

- Je výskyt dospělých rostlin jednotlivých druhů korelován s některými druhy stromů?
- Má druhová skladba dřevin (příp. další podmínky prostředí indikované přítomností dospělých jedinců určitého druhu kruštíku) vliv na klíčení semen kruštíků z jiných lokalit?
- Jak probíhá postupný vývoj semen?
- Jaký je strukturní charakter mykobiontů dospělých rostlin a jaká je míra houbové kolonizace kořenů?
- Jak se mění životaschopnost semen při skladování v laboratorních podmínkách?

## 2. METODIKA

### 2.1 Charakteristika studované skupiny

Rod kruštík (*Epipactis* Zinn) je rozšířen v temperátní zóně Eurasie. Stanovištní preference pokrývají širokou škálu biotopů od bažin až po suché lesy. Všechny druhy jsou fotosynteticky aktivní avšak s častým výskytem achlorofylních jedinců. Rostliny jsou oddenkaté, s kořeny přetrvávajícími alespoň 3 roky. Živiny jsou během zimy skladovány v oddencích a kořenech. Rostliny jsou schopny přežít pod zemí průměrně tři roky (Rasmussen 1995), ale u *E. albensis* byla pozorována 12 let trvající dormance, u *E. helleborine* dokonce 18-letá dormance (Rydlo 1995, Light & MacConaill 2006). Rozsah mykorhizní infekce je u jednotlivých druhů variabilní (Rasmussen 1995).

Klíčení semen nastává pravděpodobně na jaře. Houba proniká do embrya na jeho bázi přes buňky suspensoru, odkud se šíří infekce. Zvětšující se apikální konec embrya zůstává bez infekce a později z něj vyrůstá vrcholový pupen. Embryo posléze nabývá hruškovitého tvaru a mění se v útvar pokrytý kořenovým vlášením, který nazýváme protokorm a který je silně infikován. Postupně v průběhu dalších sezón vyrůstá v mykorhizom s infikovanými kořeny. Semenáče vytvářejí fotosyntetizující prýt nejdříve ve věku tří let. Oddenek je v té době již bez houbové infekce. Nicméně délka trvání mykoheterotrofní fáze se může velmi lišit podle hloubky klíčení, nutričních podmínek a konkrétního druhu kruštíku (Rasmussen 1995).

#### 2.1.1 *Epipactis albensis* Nováková et Rydlo (kruštík polabský)

Samosprašný druh z okruhu *Epipactis helleborine* agg. Lodyhy jsou světle zelené, drobnějšího vzrůstu, obvykle 9,5 – 28 cm dlouhé. Růst nadzemních částí začíná v červnu, kvetení probíhá od srpna do poloviny září, produkce semen začíná koncem srpna (Nováková & Rydlo 1978).

*Epipactis albensis* roste na kyselých až slabě alkalických půdách, převážně vázán na biotop lužního lesa podél velkých nížinných řek, ve svazu jilmových doubrav *Alnion glutinoso-incanae* (Jatiová & Šmiták 1996). Nalézá se však i mimo zapojený les, v úzkých břehových porostech a topolových alejích, kde však bývají rostliny mohutnějšího vzrůstu, kvetoucí již v polovině července (Rydlo 1994). Na 95% lokalit roste pouze v bezprostřední blízkosti topolů *Populus nigra* a *P. x canadensis*. Zřídka jsou udávány i mikrolokality bez topolů, kde se však vyskytuje obvykle pouze jeden jedinec, pouze v Poodří byly nalezeny početnější lokality bez topolů (Rydlo 1989, Rydlo 1997).

Druh je střeoevropským endemitem. V České republice se vyskytuje roztroušeně. Největší ohrožení pro druh představují zásahy do stromové skladby, necitlivá probírka, likvidace původních porostů a vysazování nepůvodních druhů dřevin (Rydlo 1997). Druh je v Červeném seznamu zařazen do kategorie silně ohrožených taxonů (C2; Holub & Procházka 2000).

### 2.1.2 *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (kruštík tmavočervený)

Červenonachově naběhlá, vytrvalá rostlina, vysoká 20 – 40 (60) cm, často produkující nekvetoucí lodyhy (Procházka 1980). Růst nadzemních orgánů začíná v květnu, ke kvetení dochází v půlce června až července, produkce semen začíná v červenci. Druh je cizosprašný (Jersáková & Kindlmann 2004).

*E. atrorubens* roste pouze na vápnitěm podkladě, ve světlých, sušších, listnatých i jehličnatých (zejména borových) lesích, na skalách a v křovinách od nížin do subalpinského stupně. V ČR je vázán hlavně na fytocenózy svazu *Erico-Pinion* (Jatiová & Šmiták 1996).

Druh zaujímá téměř celou Evropu (Meusel *et al.* 1978). Na Moravě se vyskytuje velmi vzácně (recentně jen v Moravském krasu a Bílých Karpatech), v Čechách roztroušeně, místy hojně (Jatiová & Šmiták 1996). Zařazen do kategorie ohrožených taxonů (C3; Holub & Procházka 2000).

### 2.1.3 *Epipactis helleborine* (L.) Grantz (kruštík širolistý)

Statná vytrvalá rostlina, 20 – 50(100) cm vysoká, charakteristická častou produkcí nekvetoucích výhonků (Procházka 1980). Růst nadzemních orgánů začíná v červnu, kvetení probíhá v červenci – srpnu, produkce semen od srpna. Druh je cizosprašný (Jersáková & Kindlmann 2004).

Roste na živinami a bázemi bohatých půdách, v lesích a křovinách od nížin do vyšších poloh horského stupně. Někdy jej můžeme nalézt i na poloruderálních stanovištích (přikopy lesních cest, zarůstající haldy aj.) (Procházka 1980). V pahorkatinách a horských polohách roste často v listnatých a druhotných jehličnatých lesích ve společenstvech třídy *Quercus-Fagetea*. V teplých oblastech roste jak v lužních lesích, tak i v dubohabřinách a teplomilných doubravách.

Druh má nejrozsáhlejší rozšíření ze všech druhů rodu *Epipactis* (Evropa, Asie, sekundárně Severní Amerika; Hultén & Fries 1986). V České republice je zastoupen roztroušeně až hojně (Jatiová & Šmiták 1996) a je zařazen do kategorie vzácnějších taxonů vyžadujících pozornost (C4; Holub & Procházka 2000).

### 2.3.1 *Epipactis purpurata* Sm. (kruštík modrofialový)

Vytrvalá, modrofialově naběhlá rostlina, vysoká 20 – 60 (70) cm, často rostoucí v polykormonech 2 – 10 jedinců (Procházka 1980). Růst nadzemních orgánů začíná v červnu, kvetení probíhá od půlky července, produkce semen od srpna. Druh je cizosprašný (Jersáková & Kindlmann 2004).

Roste na neutrálním a bazičném substrátu, zpravidla v submontánním pásmu do 900 m. Jedná se o doprovodný druh habrových a bukových porostů svazů *Carpinion* a *Fagion*, méně často se vyskytuje ve smíšených lesích, obvykle však s chudým a nezapojeným bylinným patrem. Je to stínomilný druh, který vyhledává místa s vyšší vlhkostí.

Areál druhu zaujímá téměř celou Evropu (Hultén & Fries 1986). V České republice je zastoupen roztroušeně (Jatiová & Šmiták 1996) a je zařazen do kategorie ohrožených taxonů (C3; Holub & Procházka 2000)

## 2.2 Analýza vegetačních snímků

Za účelem zjištění, zda je výskyt dospělých rostlin jednotlivých druhů korelován s určitými druhy dřevin, byla provedena analýza vegetačních snímků se zastoupením kruštíků získaných z České národní fytoecologické databáze (Chytrý & Rafajová 2003). Pro určení frekvenčního zastoupení dřevin na lokalitách jednotlivých druhů kruštíků byly použity snímky z databáze, navíc k lokalitám *E. albensis* byla přidána data ze sumární tabulky osmi fytoecologických snímků z publikace Nováková & Rydlo (1978). Do analýzy byly zahrnuty i vegetační snímky získané v rámci této diplomové práce. Celkový počet lokalit zahrnutý v analýze pro jednotlivé druhy byl pro *E. albensis* 21, *E. atrorubens* 73, *E. helleborine* 45, *E. purpurata* 50.

## 2.3 Vysévací experiment

Abych zjistila, zda vybrané druhy kruštíků mohou klíčit i na lokalitách, kde roste jiný druh kruštíku, a zda má na jejich klíčení vliv skladba stromového patra, provedla jsem vysévací experiment s faktoriálním designem. Vybrala jsem si 7 lokalit: po jedné s druhu *E. albensis* a *E. atrorubens*, dvě s druhem *E. purpurata* a tři s druhem *E. helleborine*, které svým stromovým složením připodobňují lokality předchozích tří druhů.

### 2.3.1 Popis lokalit

#### 1. **Libice nad Cidlinou** (okres Nymburk, Středočeský kraj)

GPS lokalizace: 50° 07' 23" s.š., 15° 09' 38" v.d.

Druh kruštíku: *E. albensis*

Dominantní dřeviny: *Populus x canadensis*, *Acer platanoides*, *Acer campestre*, *Fraxinus excelsior*

Lokalizace: Libice n. Cidl.: 1,4 km JZ kostela v obci (Libický luh)

Biotop: otevřená topolová alej v komplexu lužních lesů

Datum odběru semen: 27. 8. 2004

Kód lokality: **Alb**

#### 2. **Čepice** (okres Klatovy, Plzeňský kraj)

GPS lokalizace: 49° 16' 09" s.š., 13° 35' 20" v.d.

Druh kruštíku: *E. atrorubens*

Dominantní dřeviny: *Pinus sylvestris*, *Populus tremula*

Lokalizace: Sušicko-Horažďovické vápence, Čepice: 0,5 km SZ kostela v obci

Biotop: opuštěný vápencový lom, rozvolněné mladé porosty *Pinus sylvestris*

Datum odběru semen: 3. 9. 2004

Kód lokality: **Atr**

3. **Milovice** (okres Břeclav, Jihomoravský kraj)

GPS lokalizace: 48° 50' 36" s.š., 16° 42' 52" v.d.

Druh kruštíku: *E. helleborine*

Dominantní dřeviny: *Tilia cordata*

Popis: Milovická pahorkatina, Milovice: 1,6 km JV kostela v obci

Biotop: stinný kulturní les

Datum odběru semen: 21. 8. 2004

Kód lokality: **HMi**

4. **Lednice** (okres Břeclav, Jihomoravský kraj)

GPS lokalizace: 48° 47' 55" s.š., 16° 49' 08" v.d.

Druh kruštíku: *E. helleborine*

Dominantní dřeviny: *Populus x canadensis*, *Acer campestre*, *Cornus sanguinea*, *Prunus avium*

Lokalizace: Lednice: 1,5 km V kostela v obci

Biotop: otevřená topolová alej v komplexu lužních lesů

Datum odběru semen: 18. 8. 2004

Kód lokality: **HLe**

5. **Kamenný Újezd** (okres České Budějovice, Jihočeský kraj)

GPS lokalizace: 48° 53' 41" s.š., 14° 24' 41" v.d.

Druh kruštíku: *E. helleborine*

Dominantní dřeviny: *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Corylus avelana*

Lokalizace: Kamenný Újezd: 3 km VVJ kostela v obci (Rančická strouha)

Biotop: světlý suchý les na vápenitém podloží

Datum odběru semen: 7. 9. 2004

Kód lokality: **HKU**

6. **Milovice** (okres Břeclav, Jihomoravský kraj)

GPS lokalizace: 48° 50' 12" s.š., 16° 41' 22" v.d.

Druh kruštíku: *E. purpurata*

Dominantní dřeviny: *Carpinus betulus*, *Tilia cordata*, *Populus tremula*

Lokalizace: Milovická pahorkatina, Milovice: 2 km JJZ kostela v obci

Biotop: stinný okraj dubohabřiny

Datum odběru semen: 21. 9. 2004

Kód lokality: **PMi**

7. **Brno-Bystrc** (okres Brno-venkov, Jihomoravský kraj)

GPS lokalizace: 49° 12' 46" s.š., 16° 31' 09" v.d.

Druh kruštíku: *E. purpurata*

Dominantní dřeviny: *Tilia cordata*, *Carpinus betulus*, *Populus tremula*

Lokalizace: Bystrc: 2,5 km JJZ kostela v obci (PP Pekáma)

Biotop: stinná dubohabřina karpatského typu

Datum odběru semen: 18. 9. 2004

Kód lokality: **PPe**

Kompletní vegetační snímky všech lokalit jsou v příloze 1.

### 2.3.2 Uspořádání pokusu

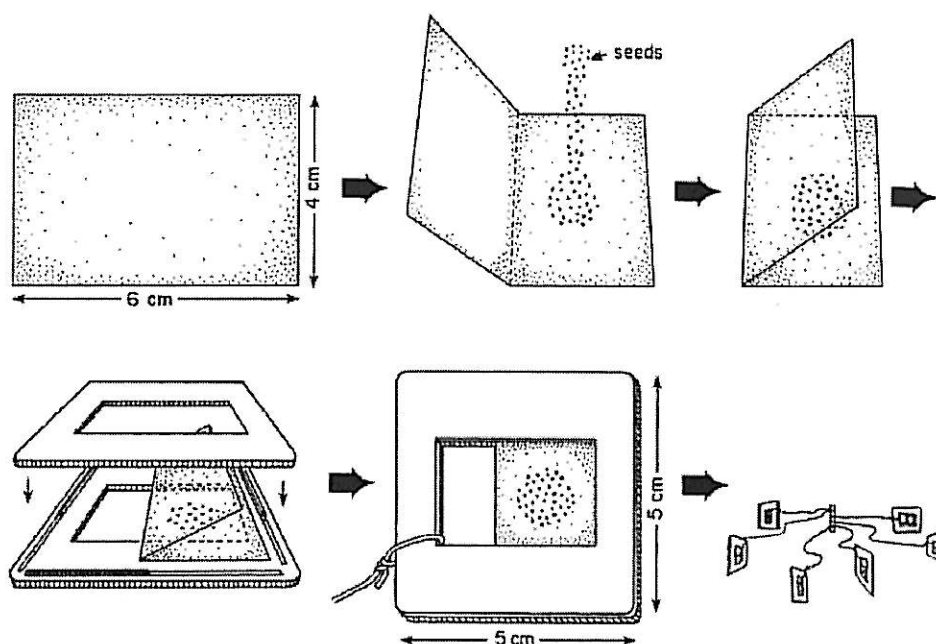
Na každé lokalitě byla v průběhu sezóny 2004 sebrána zralá semena studovaných druhů (směsný vzorek semen několika rostlin). Semena byla prohlédnuta pod binokulárním lupou, zda jsou vhodná k výsevu (tj. mají dobře vyvinutá embrya). Semena byla až do doby vysetí skladována v lednici při 4°C. Výsev proběhl 14. – 29. října 2004.

K výsevu semen byla použita diarámečková metoda podle Rasmussen & Whigham (1993)(Obr. 1), umožňující kontrolu nad miniaturními semeny, která jsou přitom pěstována téměř v přirozených podmínkách. Přibližně 250 semen jednoho druhu bylo uzavřeno do jemné nylonové sítky o rozměrech 4 x 6 cm a velikostí oka 40 µm (tento rozestup umožňuje vniknutí hyf hub, ale zabraňuje vypadnutí semen orchidejí). Přehnutá síťka byla vložena do plastového rámečku na diapozitivu. Rámečky byly označeny kódem druhu a lokality původu pomocí lihového fixu a barevného drátku. Pomocí rybářského vlasce byly připevněny po skupinách ke kovové závlačce pro pozdější vyhledání pomocí minohledačky.

Rámečky byly umístovány v blocích, protože toto uspořádání usnadňuje postupné vytažení patřičného množství rámečků. Každý blok obsahoval vždy dvě opakování každé kombinace druhu a lokality (tj. 14 rámečků v jednom bloku). Na každou lokalitu bylo umístěno deset takových bloků, přičemž jeden sloužil jako zkušební pro sledování průběhu ontogeneze. Na každé lokalitě bylo tedy umístěno 140 rámečků, dohromady 980. Každá kombinace druhu a lokality má na jedné lokalitě 20 opakování. Jednotlivé bloky byly umístovány ve vzdálenosti menší než 0,5 m od dospělé rostliny. Rámečky byly v rámci bloku rozmístěny náhodně. Do půdy byly zasouvány pomocí ostrého nože kolmo do hloubky cca 5 cm.

Původní záměr byl vytahovat skupiny se třemi bloky v 6-měsíčních intervalech od doby vysetí. Po prohlédnutí zkušebních rámečků vytažených z různých lokalit po 6 a následně 9 a 10 měsících se však ukázalo, že takto brzké vytažení semen není vhodné vzhledem k pomalému vývoji protokormů. První třetina bloků byla proto vytažena až po 12 měsících v půdě. Zbylé dvě třetiny bloků byly ponechány v půdě pro pozdější zpracování.





Obr. 1. Diarámečková metoda výsevu semen orchidejí *in situ*. Převzato z Rasmussen & Whigham (1993), upraveno.

### 2.3.3 Hodnocení klíčení semen

Zkušební rámečky vytažené po 6, 9 a 10 měsících na třech lokalitách byly bezprostředně po vytažení prohlédnuty pod binokulární lupou a u největších semen byla pomocí světelného mikroskopu změřena šířka a délka.

Celkem 294 rámečků (21 bloků), vytažených ze země po 12-ti měsících, bylo až do doby zpracování skladováno ve vlhku a v chladu v lednici. Klíčící semena ve všech rámečcích byla kvantifikována a zařazena do kategorií podle tvaru a velikosti embrya a tvarových změn na testě (osemení) (tab. 1.).

Tab. 1. Velikostní kategorie klíčících semen.

Kategorie	Popis kategorie
0	<i>Neklíčící semena</i> žádné objemové změny, citronovitý tvar embrya, šířka embrya < 125 $\mu$ m, délka < 225 $\mu$ m
1	<i>Změny před deformací testy</i>
1a	Bobtnání embryí, oválný tvar, šířka < 150 $\mu$ m, délka < 250 $\mu$ m
1b	Zvětšení průsvitnosti embrya, zřídka houbová infekce, šířka < 300 $\mu$ m, délka < 350 $\mu$ m
2	<i>Změny po deformaci a praskání testy</i> Kulovitý až oválný tvar embrya, pravidelná tvorba pelotonů, šířka < 400 $\mu$ m, délka < 500 $\mu$ m
3	<i>Hruškovitý tvar embrya (tj. protokorm)</i> Silná kolonizace houbou, produkce rhizoidů

Zjištění absolutního počtu klíčících semen bylo provedeno pouze u kategorií 1b, 2 a 3, protože kategorie 1a nastane vždy ve vlhkém prostředí i bez přítomnosti vhodné mykorhizní houby. Pokud v rámečcích byla zjištěna klíčící semena z těchto kategorií, byla vždy změřena šířka a délka u největšího z nich, a také u všech protokormů z kategorie 3. U změřených semen byl spočten objem podle rovnice  $V = \pi \cdot B^2 \cdot L / 6$  (B...šířka embrya, L...délka embrya; Hadley & Williamson 1971), aby byla zjištěna kvantitativní míra vývoje. Tento vzorec je založen na předpokladu, že protokorm sestává ze dvou spojených půl-elipsoidů. Jako veličina charakterizující velikost semen byla použita třetí odmocnina vypočteného objemu.

## **2.4 Studium houbové kolonizace kořenů dospělých rostlin**

Ze všech lokalit kromě PPe byly v srpnu 2005 (3. 8. Atr, HKU; 21. 8. Alb, HLe, HMi, PMi) odebrány dvě dospělé rostliny, za účelem připravit vzorky pro budoucí molekulární studii a následně popsat a kvantifikovat houbové struktury v kořenech. Kořenový systém byl propláchnut pod tekoucí vodou, povrch kořenů byl jemně očištěn zubním kartáčkem.

Byla změřena celková délka kořenového systému, ten byl následně rozřezán na přibližně 1cm dlouhé úseky. Z těch bylo náhodně vybráno 30 kusů, u nichž byly provedeny tenké příčné řezy (s výjimkou jedné rostliny *E. albensis*, která měla příliš krátký kořenový systém a bylo tedy vybráno jen 12 úseků). Mykorhizní houba byla velmi dobře patrná i na živém materiálu, řezy proto nebyly barveny, ale prohlédnuty pod binokulární lupou přímo. Zařadila jsem je do 5 kategorií (A – E) podle procenta primární kořenové kůry obsahující pelotony (0%, 1-25%,...76-100%). Silně infikované kusy kořenů byly pro budoucí zpracování buď vysušeny v silikagelu, nebo uloženy do mrazícího boxu při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Zbytek kořenů byl uložen do absolutního ethanolu, příp. glutaraldehydu, a uskladněn v lednici při  $4^{\circ}\text{C}$ . Struktura mykobintů byla pozorována pomocí světelného a elektronového mikroskopu.

Protože mykobionti z komplexu *Rhizoctonia* agg. nejsou pod binolupou na první pohled patrní (Baláž, osobní sdělení), byly vybrané kořeny kruštitků ze všech odběrových lokalit barveny standardním postupem pro barvení arbuskulárních mykorhiz. Podle délky původního kořenového systému a míry nalezené infekce bylo náhodně vybráno 10 až 20 kusů 1 cm dlouhých úseků kořenů bez patrné infekce, fixovaných v ethanolu. Vzorky byly projasňovány dvouminutovým varem v hydroxidu draselném. Dále následoval standardní postup barvení dle Vierheilig, Schweiger & Brundrett (2005). Jako barvicí látka byla použita chlorazolová čern E. Roztlačené podélné řezy kořene byly prohlédnuty pod světelným mikroskopem.

## **2.5 Sledování vitality semen**

### **2.5.1 Tetrazoliový test**

Pro testování vitality semen byla použita metoda tetrazoliového barvení modifikovaná pro semena terrestrických orchidejí podle metodiky van Waes & Debergh (1986a). Semena jsou máčena v roztoku chlorového vápna  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  pro zvýšení propustnosti osemení, dále jsou

promývána v destilované vodě a postoupena tetrazoliovému testu vitality. Tetrazoliová sůl je v živých buňkách účinkem iontů vodíku redukována na červené barvivo, které zbarví živé embryo do karmínově ruda. Mrtvá embrya zůstanou nenabarvená. Metoda bohužel není jednoznačná a mezi oběma extrémy jsou četné barevné přechody.

### 2.5.2 Optimalizace doby vápnění pro jednotlivé druhy

Tloušťka a propustnost osemení orchidejových semen se druh od druhu liší a pro *E. albensis* a *E. purpurata* nebyla dosud zveřejněna optimální doba vápnění. Optimální doba vápnění byla zjišťována experimentálně; semena všech studovaných druhů byla ponechávána v roztoku chlorového vápna 0 – 20 hodin (příp. až 28 hodin u *E. albensis*), s rozestupem vytahování dvě hodiny. Semena byla dále podrobena klasickému tetrazoliovému testu.

Semena byla během barvení držena v planktonní síťce uzavřené v rámečku na diapozitivu. Pro každou dobu barvení byla provedena tři opakování. V rámečku bylo cca 200 semen. Embrya byla zařazena do 3 kategorií podle zabarvení, a to červené (tj. živé), žluté (tj. mrtvé) a růžové (nejasný status).

### 2.5.3 Změny ve vitalitě semen během roku

Pro porovnání jak se mění vitalita semen délkou skladování v různých teplotních podmínkách, byla semena skladována v lednici při 4°C a při pokojové teplotě při cca 20°C. Semena byla barvena v měsíčních intervalech od doby sběru po dobu 6 – 7 měsíců. Doba vápnění odpovídala době zjištěné v bodě 2.5.2. Princip hodnocení byl stejný jako v bodě 2.5.2.

Semena byla poprvé barvena bezprostředně po sběru, s výjimkou *E. atrorubens*. Ten byl poprvé barven až jeden měsíc po sběru, protože jiná semena, která měla být původně využita, se ukázala jako nevhodná a musela být nahrazena. Použitá semena byla před prvním barvením skladována 3 týdny v pokojové teplotě a následně 1 týden v lednici.

## 2.6 Statistické zpracování dat

### 2.6.1 Analýza vegetačních snímků

Pro zpracování fytoecnologických snímků byla použita lineární diskriminační analýza (LDA), jejímž cílem je najít takové proměnné (ordinační osy), které vysvětlují maximální podíl variability mezi *a priori* definovanými skupinami (zde skupiny snímků charakterizované určitým druhem kruštíku) při současné minimalizaci variability uvnitř těchto skupin (Lepš & Šmilauer 2003). Druhové spektrum dřevin ve snímcích bylo použito jako soubor vysvětlujících proměnných, vysvětlovanou proměnnou byla druhová příslušnost kruštíku (příp. kruštíků) v daném snímku. V případě výskytu dvou druhů kruštíku v jednom snímku, byl tento snímek zařazen do analýzy dvakrát, s každým druhem zvlášť, a oběma kopiím snímku byla v analýze přiřazena poloviční váha. Ordinační skóre vysvětlujících proměnných

podává informaci o tom, jak moc jsou druhy dřevin specifické pro skupinu snímků s daným druhem kruštíku. Jako vstupní data analýzy byly použity snímky s pokryvnostmi vyjádřenými v sedmistupňové Braun-Blanquetově škále (transformované na stupnici 1-7).

Kromě ordinační analýzy byla z fytoocenologických snímků zpracována frekvenční tabulka, která shrnuje informaci o tom, v kolika procentech snímků obsahujících daný druh kruštíku se vyskytuje určitý druh dřeviny.

## 2.6.2 Vysévací experiment

### Analýza klíčivosti semen

Klíčivost *in situ* kultivovaných semen byla hodnocena analýzou variance. Testovány byly následující efekty: zdrojová lokalita (tj. lokalita původu semen; faktor s pevným efektem), lokalita výsevu a jejich interakce a dále efekt bloku, který byl hierarchicky vložen do efektu lokality výsevu (faktory s náhodnými efekty). Kromě vlivu zdrojové lokality byl zvlášť testován také vliv druhu kruštíku (faktor s pevným efektem). Proměnná charakterizující počet klíčících semen byla získána vážením absolutního počtu semen podle velikostního stadia, kterého semena dosahovala (semena ve stádiu 2b byla násobena dvěma, ve stádiu 3 třemi). Výsledná proměnná vykazovala Poissonovu distribuci, a proto byly její hodnoty upraveny odmocninou transformací.

### Kontrastování meziskupinových faktorů

Pro zhodnocení vlivu druhového složení stromového patra či vlivu druhu kruštíku rostoucího na dané lokalitě na klíčení vysetých semen byla použita metoda kontrastování meziskupinových faktorů. Kontrastovací analýza umožňuje specifikovat v podstatě jakýkoliv typ skupin a zanalyzovat rozdíly mezi nimi. Testováno bylo, zda se liší (i) klíčivost semen vysetých na své vlastní zdrojové lokalitě oproti klíčivosti těchto semen na ostatních lokalitách, (ii) klíčivost semen vysetých na své vlastní zdrojové lokalitě a na lokalitě simulující druhové složení dřevin na zdrojové lokalitě oproti klíčivosti těchto semen na ostatních lokalitách, (iii) klíčivost semen jednotlivých druhů kruštíků na lokalitě/ách vlastního druhu, oproti lokalitám s jiným druhem (což se pro *E. atrorubens* a *E. albensis* shoduje s testem v bodě (i)). Testována byla také celková klíčivost mezi semeny jednotlivých druhů kruštíků.

### Korelace objemu největšího semene a počtu klíčících semen v rámečku

Proměnné charakterizující objem klíčících semen a počet klíčících semen v rámečku (tj. suma počtu semen v kategoriích 1b, 2 a 3) vykazovaly pozitivně šikmé rozdělení a byly proto transformovány dekadickým logaritmem. Většina hodnot objemu se pohybovala v úzkém rozmezí, byla proto před transformací násobena deseti, k počtům byla připočtena 1. Do grafu pro *E. helleborine* byla zahrnuta klíčící semena ze všech zdrojových lokalit.

---

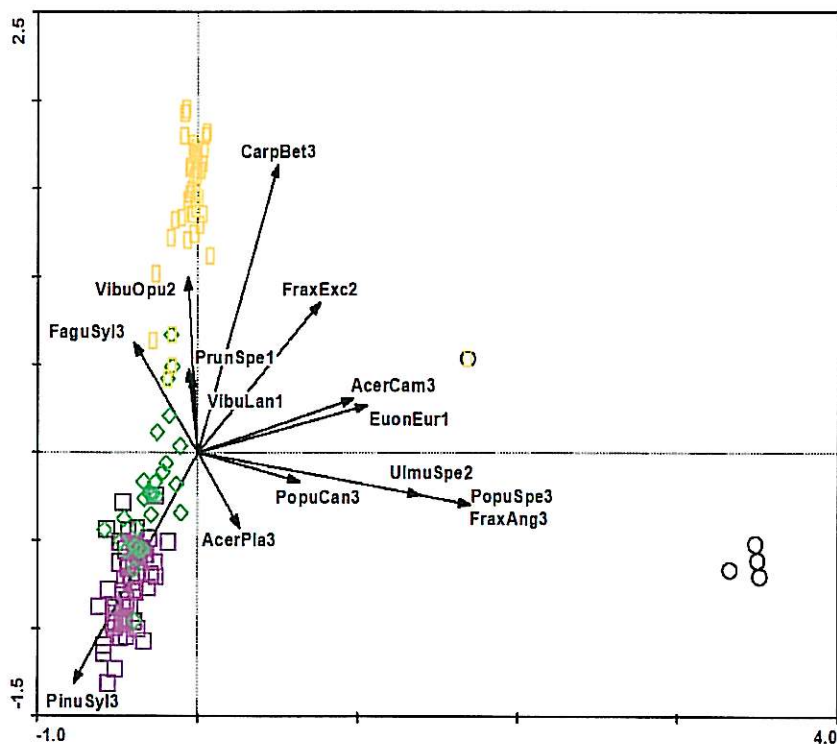
Pro statistické výpočty a vizualizaci dat byl použit softwarový balík Statistica 6.0 for Windows (StatSoft Inc. 2001), Canoco for Windows (ter Braak & Šmilauer 2002) a R 2.2 (R Development CoreTeam 2005).

### 3. VÝSLEDKY

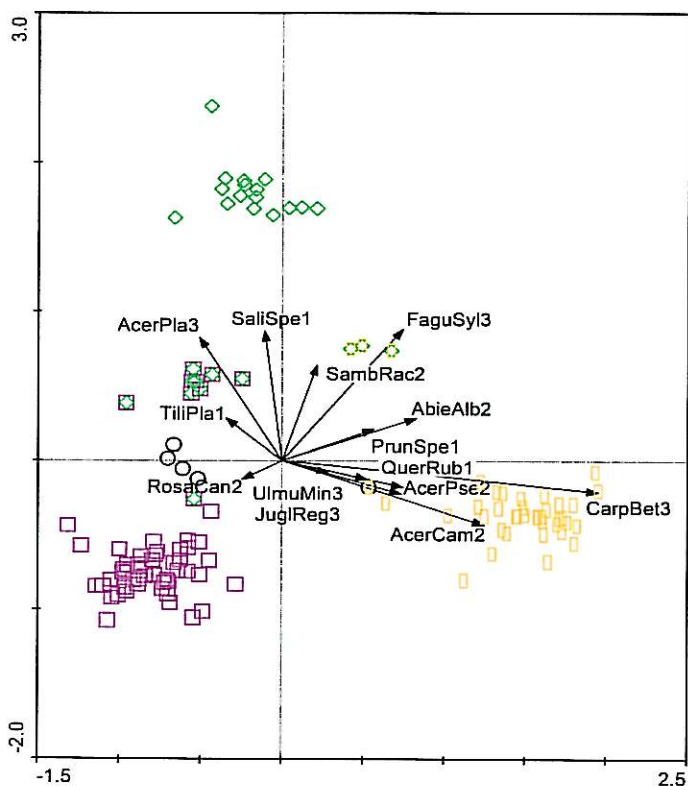
#### 3.1 Analýza vegetačních snímků

Vegetační snímky s jednotlivými druhy kruštíků jsou v ordinačním prostoru LDA (obr. 2) poměrně dobře odděleny, s výjimkou snímků zahrnujících dva druhy kruštíků současně. Z ordinačních diagramů je patrné, že první diskriminační osa velmi zřetelně odděluje snímky s *E. albensis* od zbytku hlavně na základě přítomnosti *Populus nigra*, *Fraxinus angustifolia* a *Ulmus* sp., druhá a třetí osa pak separují snímky s ostatními druhy. *E. atrorubens* je pozitivně korelován s *Pinus sylvestris*, snímky s *E. purpurata* jsou vydělovány dřevinami *Carpinus betulus*, *Viburnum opulus* a *Fagus sylvatica*. Snímky *E. helleborine* nejsou odlišeny žádným specifickým druhem dřeviny.

Výsledky frekvenční tabulky (tab. 2) však ukazují, že mnoho druhů dřevin je hojně sdíleno více druhy kruštíků. Mezi takové patří např. *Tilia cordata*, *Carpinus betulus*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*, *Acer campestre* či *Corylus avellana*.



- AbieAlb-Abies alba*
- AcerCam-Acer campestre*
- AcerPla-Acer platanoides*
- AcerPse-Acer pseudoplatnus*
- CarpBet-Carpinus betulus*
- EuonEur-Euonymus europaeus*
- FaguSyl-Fagus sylvatica*
- FraxAng-Fraxinus angustifolia*
- FraxExc-Fraxinus excelsior*
- JuglReg-Juglans regulus*
- PinuSyl-Pinus sylvestris*
- PopuCan-Populus xcanadensis*
- PopuSpe-Populus sp.*
- PrunSpe-Prunus sp.*
- QuerRub-Quercus rubra*
- RosaCan-Rosa canina*
- RosaSpe-Rosa sp.*
- SaliSpe-Salix sp.*
- SambRac-Sambucus racemosa*
- TiliPla-Tilia platyphyllos*
- UlmuMin-Ulmus minor*
- UlmuSpe-Ulmus sp.*
- VibuOpu-Viburnum opulus*
- VibuLan-Viburnum lantana*



○ *E. albensis*    □ *E. atrorubens*    ◇ *E. helleborine*    □ *E. purpurata*

**Obr. 2.** Ordinační diagramy lineární diskriminační analýzy zobrazující prostorové rozložení vegetačních snímků všech studovaných druhů kruštitků v závislosti na skladbě dřevin. Na diagramu nahoře je zobrazena první a druhá kanonická osa, na diagramu dole druhá a třetí kanonická osa. První LDA osa vysvětluje 32,5% variability, druhá osa 31,5%, třetí osa 28,5%. Číslo za zkratkou dřeviny udává příslušnost k vegetačnímu patru (3 = E3, 2 = E2, 1 = E1). Výsledek Monte-Carlo permutačního testu pro všechny kanonické osy:  $F = 2,527$ ,  $p < 0,001$  (999 permutací).

**Tab. 2.** Frekvenční zastoupení jednotlivých druhů dřevin ve fytoocenologických snímcích s kruštíky. V tabulce jsou zahrnuty pouze ty dřeviny z vegetačních pater E2 a E3, které se alespoň u jednoho druhu kruštíku vyskytovaly ve více než 10% snímků. Dřeviny jsou seřazeny sestupně dle frekvenčního zastoupení ve snímcích.

Patro	Dřevina	<i>E. albensis</i>	<i>E. atrorubens</i>	<i>E. helleborine</i>	<i>E. purpurata</i>
E3	<i>Tilia cordata</i>	85.7	9.6	20.0	46.0
E3	<i>Carpinus betulus</i>	33.3	15.1	24.4	68.0
E3	<i>Quercus robur</i>	47.6	12.3	15.6	26.0
E3	<i>Acer campestre</i>	47.6	9.6	6.7	20.0
E3	<i>Fraxinus excelsior</i>	47.6	5.5	8.9	12.0
E3	<i>Betula pendula</i>	14.3	5.5	20.0	22.0
E3	<i>Ulmus minor</i>	19.0	4.1	4.4	8.0
E3	<i>Acer platanoides</i>	9.5	5.5	15.6	2.0
E3	<i>Quercus petraea</i>		4.1	17.8	52.0
E3	<i>Picea abies</i>		15.1	20.0	14.0
E3	<i>Abies alba</i>		4.1	17.8	20.0
E3	<i>Acer pseudoplatanus</i>		6.8	13.3	20.0
E3	<i>Fagus sylvatica</i>		11.0	33.3	28.0
E3	<i>Alnus glutinosa</i>	23.8		2.2	2.0
E3	<i>Tilia platyphyllos</i>	14.3	1.4		4.0
E3	<i>Pinus sylvestris</i>		42.5	26.7	
E3	<i>Larix decidua</i>		4.1		12.0
E3	<i>Populus tremula</i>			2.2	10.0
E3	<i>Prunus padus</i>	19.0			
E3	<i>Populus nigra</i>	52.4			
E3	<i>Ulmus laevis</i>	28.6			
E3	<i>Fraxinus angustifolia</i>	14.3			
E3	<i>Populus sp.</i>	14.3			
E2	<i>Tilia cordata</i>	33.3	5.5	13.3	54.0
E2	<i>Corylus avellana</i>	9.5	38.4	22.2	16.0
E2	<i>Cornus sanguinea</i>	28.6	12.3	13.3	22.0
E2	<i>Fraxinus excelsior</i>	23.8	6.8	6.7	28.0
E2	<i>Carpinus betulus</i>	9.5	9.6	6.7	34.0
E2	<i>Acer campestre</i>	14.3	4.1	2.2	26.0
E2	<i>Lonicera xylosteum</i>	4.8	11.0	4.4	18.0
E2	<i>Fagus sylvatica</i>		4.1	28.9	14.0
E2	<i>Crataegus laevigata</i>	9.5	5.5		28.0
E2	<i>Euonymus europaea</i>	19.0	4.1		12.0
E2	<i>Rosa sp.</i>		13.7	11.1	8.0
E2	<i>Picea abies</i>		15.1	11.1	6.0
E2	<i>Acer pseudoplatanus</i>	4.8	5.5	4.4	16.0
E2	<i>Crataegus monogyna</i>		12.3	8.9	8.0
E2	<i>Crataegus sp.</i>	19.0	2.7		4.0
E2	<i>Quercus robur</i>	4.8	13.7	4.4	
E2	<i>Abies alba</i>		1.4	6.7	10.0
E2	<i>Daphne mezereum</i>			24.4	24.0
E2	<i>Quercus petraea</i>		2.7		28.0
E2	<i>Prunus padus</i>	23.8	2.7		
E2	<i>Ligustrum vulgare</i>		12.3	13.3	
E2	<i>Sorbus aucuparia</i>		8.2		14.0
E2	<i>Viburnum opulus</i>			4.4	14.0
E2	<i>Berberis vulgaris</i>		17.8		

## 3.2 Vysévací experiment

### 3.2.1 Klíčivost semen

Výrazné klíčení semen nastalo pouze u dvou druhů kruštíků a to *Epipactis atrorubens* a *E. helleborine*. *E. albensis* klíčil ve velmi malé míře (obr. 3). *E. purpurata* nevyklíčil vůbec ani v jednom případě a z tohoto důvodu nebyl tento druh zahrnut do následujících analýz. Nakonec byly tedy testovány efekty pěti zdrojů semen (zahrnující tři druhy kruštíků) a sedmi lokalit výsevu. Výsledky analýzy variance a následných mnohonásobných porovnání jsou shrnuty v tab. 3 – 5. Průkazné rozdíly v klíčivosti byly prokázány jak mezi semeny pocházejících z různých lokalit, tak i mezi jednotlivými bloky v rámci lokality a dále interakcí lokality výsevu a zdroje semen. Vliv lokalit výsevu byl též průkazný, ale pouze těsně.

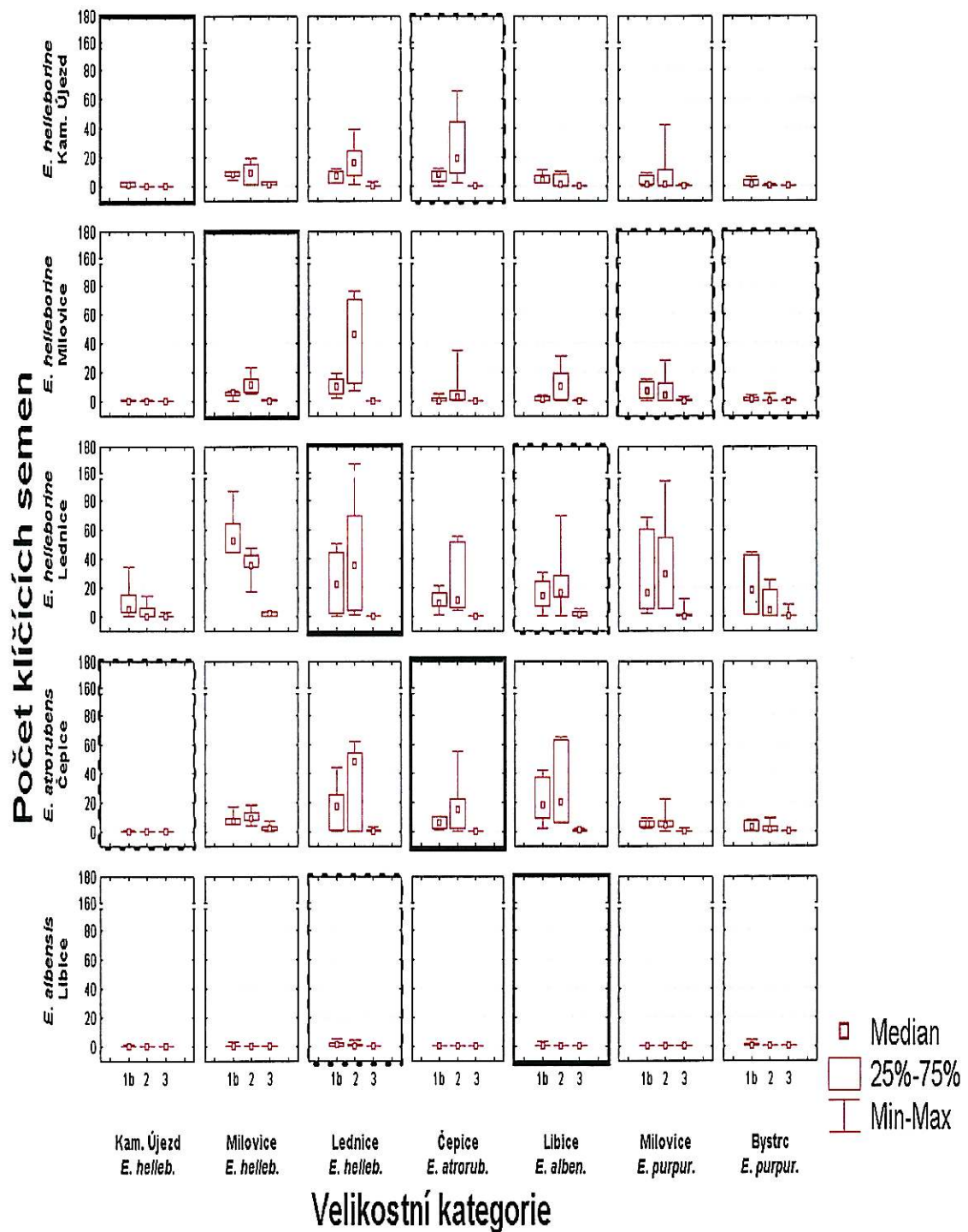
*E. albensis* rostl nejhůře, semena *E. helleborine* z Lednice rostla nejlépe, mezi semeny z ostatních zdrojových lokalit nebyl průkazný rozdíl (tab. 4). Výrazné rozdíly jsou patrné také mezi jednotlivými lokalitami (tab. 5); semena klíčila nejlépe na lokalitě Lednice (HLe), příp. Milovice (HMi), nejhůře na lokalitách Kamenný Újezd (HKU) a Brno-Bystrc (PPe).

Procentuální shrnutí celkové klíčivosti semen ze zdrojových lokalit a klíčivosti semen na lokalitách výsevu jsou v tab. 6 a 7. Přestože semena nejpočetněji klíčila na lokalitě Lednice, velikostní kategorie 3 dosahovala mnohem častěji na lokalitách Milovice (HMi), příp. Libice (Alb). Na lokalitě Čepice (Atr) nebyl pozorován žádný protokorm velikostní kategorie 3 (tab. 6). Klíčení semen *E. helleborine* z Lednice nastalo téměř v každém rámečku a průměr klíčících semen v rámečku výrazně převyšuje všechny ostatní zdroje semen. Semena *E. albensis* nikdy nedosáhla velikostního stádia protokormu (tab. 7).

Metoda kontrastování meziskupinových faktorů (tab. 8 – 11) ukázala, že klíčení semen na své zdrojové lokalitě, příp. na své zdrojové lokalitě a lokalitě s totožným druhovým složením, se ve většině případů neliší od klíčivosti těchto semen na ostatních lokalitách (s výjimkou semen ze zdroje HKU a Atr; tab. 8 a 9). Semena *E. helleborine* rostou průkazně lépe na lokalitách, kde se nacházejí dospělé rostliny tohoto druhu (tab. 10).

Kontrastování mezi klíčovostí jednotlivých druhů kruštíků ukázalo, že semena *E. helleborine* i *E. atrorubens* klíčí průkazně lépe než semena *E. albensis*. V klíčivosti semen *E. helleborine* a *E. atrorubens* není průkazný rozdíl (tab. 11).





**Obr. 3.** Přehled klíčení semen krušticů na všech lokalitách. V řádcích jsou vyneseny jednotlivé druhy krušticů a lokalita původu semen, ve sloupcích pak lokality výsevu. V grafech je znázorněno rozložení počtů klíčících semen v jednotlivých velikostních kategoriích. V každém dílčím grafu jsou vyneseny hodnoty z celkem šesti rámečků. Plná čára označuje domovskou lokalitu semen, přerušovaná čára označuje lokalitu, která druhovým složením stromů simuluje podmínky na původní lokalitě.

Tab. 3. Výsledek analýzy variance celkového modelu.

	Efekt	Suma čtverců	Počet stupňů volnosti	F	p
lokality výsevu	Náhodný	705.5	6	2.71	0.042
skupina(lokality)	Náhodný	465.4	14	5.87	$< 10^{-6}$
zdroj semen	Pevný	1130.9	4	17.81	$< 10^{-5}$
lokality*zdroj	Náhodný	381.1	24	2.81	$< 10^{-4}$
Error		911.1	161		

Tab. 4. Mnohonásobná porovnání, Tukey HSD test. Porovnání vlivu druhu kruštiny a lokality původu semen na počet vyklíčených semen.

\*  $p < 10^{-4}$ 

Druh a lokalita původu semen	H(KU)	H(Mi)	H(Le)	Atr	Alb
<i>E. helleborine</i> (KU)		n.s.	*	n.s.	*
<i>E. helleborine</i> (Mi)	n.s.		*	n.s.	*
<i>E. helleborine</i> (Le)	*	*		*	*
<i>E. atrorubens</i>	n.s.	n.s.	*		*
<i>E. albensis</i>	*	*	*	*	
Průměr odmocněných hodnot ve skupině	3.87	4.03	7.62	4.95	0.39

Tab. 5. Mnohonásobná porovnání, Tukey HSD test. Porovnání vlivu jednotlivých lokalit na počet vyklíčených semen.

\*  $p < 10^{-4}$  \*\*  $p < 10^{-3}$  \*\*\*  $p < 0.02$ 

Lokalita výsevu	Hmi	Hle	HKU	Atr	Alb	PMi	PPe
Milovice (HMi)		n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	*
Lednice (Hle)	n.s.		*	***	***	**	*
Kam. Újezd(HKU)	*	*		*	*	*	n.s.
Čepice(Atr)	n.s.	***	*		n.s.	n.s.	***
Libice(Alb)	n.s.	***	*	n.s.		n.s.	**
Milovice(PMi)	n.s.	**	*	n.s.	n.s.		***
Bystrc(PPe)	*	*	n.s.	***	**	***	
Průměr odmocněných hodnot ve skupině	5.677	6.840	1.062	4.552	4.677	4.230	2.158

Tab.6. Celkové klíčení semen na jednotlivých lokalitách výsevu.

Lokalita výsevu	HMi	HLe	HKU	Atr	Alb	PMi	PPe
% rámečků, ve kterých nastalo klíčení	83.3	90.0	46.7	76.7	80.0	76.7	70.0
prům. počet klíčících semen v rámečcích, kde nastalo klíčení	36.2	46.4	7.1	26.3	28.7	28.0	12.0
% "klíčících" rámečků, v kterých byly protokormy (stádium 3)	68.0	14.8	7.1	0.0	37.5	25.0	9.5

Tab. 7. Celkové klíčení semen z různých zdrojových lokalit na všech lokalitách výsevu.

Zdrojová lokalita	<i>E.albensis</i>	<i>E.atrorubens</i>	<i>E.helleborine</i> (KU)	<i>E.helleborine</i> (Le)	<i>E.helleborine</i> (Mi)
% rámečků, kde nastalo klíčení	21.4	81.0	90.5	97.6	83.3
prům. počet klíčících semen v rámečcích, kde nastalo klíčení	3.0	29.9	15.9	51.8	19.3
% "klíčících" rámečků, ve kterých byly protokormy (stádium 3)	0.0	38.2	21.1	29.3	17.1
průměrný počet protokormů (stádium 3)	0.0	2.2	1.8	3.7	1.3

Tab. 8. Kontrastování meziskupinových faktorů. Porovnáno je klíčení semen ze zdrojových lokalit vyšetých na vlastní zdrojové lokalitě oproti semenům z tohoto zdroje vyšetým na ostatní lokalitě.

Zdrojová lokalita	t	p
HKU	-3.29	< 0.05
HMi	1.37	0.17
HLe	1.95	0.05
Atr	0.86	0.39
Alb	-0.11	0.91

Tab. 9. Kontrastování meziskupinových faktorů. Porovnáno je klíčení semen ze zdrojových lokalit vyšetých na vlastní zdrojové lokalitě a na lokalitě s totožným složením dřevin jako zdrojová lokalita oproti semenům z tohoto zdroje vyšetým na ostatních lokalitách.

Zdrojová lokalita	t	p
HKU	0.18	0.86
HMi	-0.78	0.44
HLe	1.42	0.16
Atr	-3.45	< 0.001
Alb	0.85	0.39

Tab. 10. Kontrastování meziskupinových faktorů. Porovnáno je klíčení semen jednotlivých druhů vyšetých na lokalitě/ách vlastního druhu, oproti lokalitám s jiným druhem kruštíku.

Druh	t	p
<i>E.helleborine</i>	2.36	< 0.05
<i>E.atrorubens</i>	0.86	0.39
<i>E.albensis</i>	-0.11	0.91

Tab. 11. Kontrastování meziskupinových faktorů. Porovnání celkové klíčivosti semen mezi jednotlivými druhy kruštíků.

Druhy	t	p
<i>E.atrorubens</i> : <i>E.helleborine</i>	-0.54	0.59
<i>E.atrorubens</i> : <i>E.albensis</i>	8.78	< 10 <sup>-5</sup>
<i>E.albensis</i> : <i>E.helleborine</i>	-11.29	< 10 <sup>-5</sup>

### 3.2.2 Průběh klíčení

V rámečkách byla nalezena semena vždy v různých fázích vývoje zároveň, tj. jak zcela neklíčící semena, zbytnělá, klíčící, tak i parazitovaná a mrtvá. Rozmístění klíčících i parazitovaných semen uvnitř rámečku bylo často shlukovité.

#### Kontrola počátečních stádií klíčení

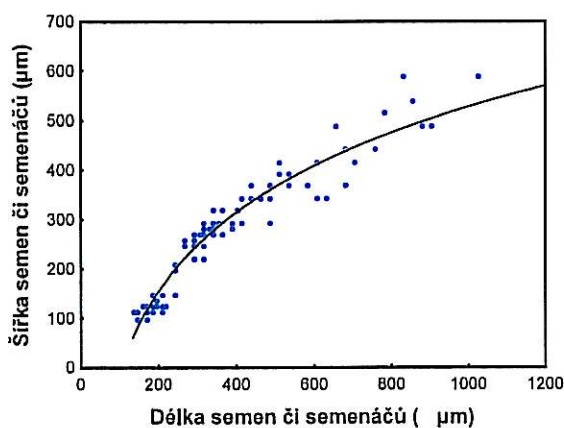
Kontrolní semena vytažená z lokality Kamenný Újezd na začátku května po 6 měsících inkubace v půdě neprojevovala žádné známky pokročilejšího klíčení. V rámečkách byla změřena různá houbových hyf a semena pouze bobtnala (stadium klíčení 1a). Na začátku srpna (9 měsíců v půdě) byly vytaženy kontrolní bloky z lokalit Čepice (Atr) a Kamenný Újezd (HKU). Na těchto lokalitách semena *E. atrorubens* a *E. helleborine* dosahovala fáze 1b a 2 (i když v Kamenném Újezdu podstatně méně než v Čepici). Při posledním kontrolním pozorování provedeném o měsíc později na lokalitě Milovice (HMí) byla pozorována embrya *E. helleborine* již téměř hruškovitého tvaru, avšak nedosahující délky 500 µm.

#### Fáze klíčení

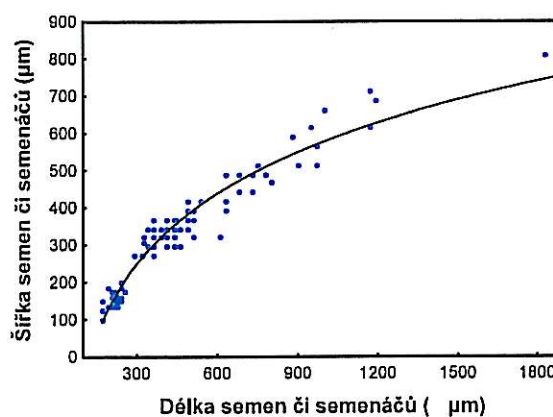
Průběh klíčení u *E. atrorubens* a *E. helleborine* byl velice podobný. Oválná embrya bobtnají (fáze 1a) a pokud je přítomna mykorhizní houba, nabývají na objemu tak, že dochází k prasknutí silně pigmentovaného obalu embrya a stávají se průsvitnými (1b). Embryo dále roste více do šířky a získává kulovitý tvar. Do vnitřního prostoru osetí mezitím proniká velké množství hyf různých hub. V tomto momentě také dochází k proniknutí hyf přes buňky suspenzoru do embrya, což je ve světelném mikroskopu většinou dobře viditelné jako tmavá oblast, někdy s patrnými pelotony hub. Následně dochází k rapidnímu růstu do délky (fáze 2), přičemž apikální konec zůstává bez infekce, pod mikroskopem téměř průhledný (fota?). Později dochází k rozrůstání apikálního konce do šířky, suspenzorový konec je silně infikován a embryo nabývá hruškovitého tvaru (fáze 3). Produkce rhizoidů je zpočátku velmi sporá, byly pozorovány i protokormy bez rhizoidů. Největší protokorm (*E. atrorubens*), který byl pozorován, dosahoval délky téměř 2 mm, šířky necelý 1 mm. Změna proporcí semen v průběhu klíčení (šířka embrya vs. délka embrya) je zachycena na obr. 4 a 5. Fotografie klíčících semen jsou v příloze 2.

#### Korelace objemu největšího embrya a počtu klíčících semen v rámečku

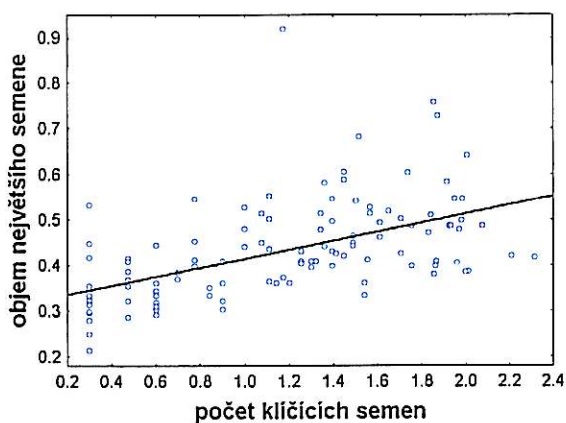
Maximální dosažená velikost klíčícího embrya druhu *E. helleborine* je pozitivně korelována s celkovým počtem klíčících semen v rámečku (obr. 6), pro semena *E. atrorubens* je však korelace neprůkazná (obr. 7).



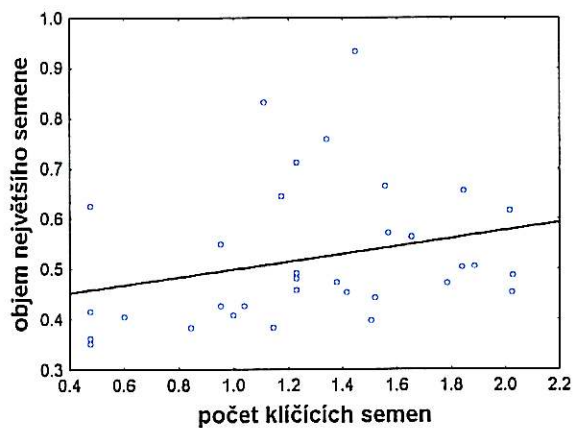
Obr. 4. Vývoj poměru šířky a délky embrya *Epipactis helleborine* (z Lednice) během ontogeneze. Vyneseny jsou rozměry semen ve všech fázích klíčení i neklíčící semena. Data jsou proložena logaritmickou křivkou ( $y = a*x + b*\log(x+c) + d$ ; průkaznost lineárního členu  $p < 2.2*10^{-16}$ , průkaznost logaritmického členu  $p < 9.93*10^{-10}$ ).



Obr. 5. Vývoj poměru šířky a délky embrya *Epipactis atrorubens* během ontogeneze. Vyneseny jsou rozměry semen ve všech fázích klíčení a i neklíčící semena. Data jsou proložena logaritmickou křivkou ( $y = a*x + b*\log(x+c) + d$ ; průkaznost lineárního členu  $p < 2.2*10^{-16}$ , průkaznost logaritmického členu  $p < 7.77*10^{-14}$ ).



Obr. 6. Korelace objemu největšího klíčícího semene a počtu klíčících semen v jednotlivých rámečcích druhu *E. helleborine*. Obě proměnné byly zlogaritmovány. Pearsonův korelační koeficient  $r = 0.51$ ,  $p < 10^{-5}$ .



Obr. 7. Korelace objemu největšího klíčícího semene a počtu všech klíčících semen v rámečcích druhu *E. atrorubens*. Obě proměnné byly zlogaritmovány. Pearsonův korelační koeficient  $r = 0.26$ ,  $p = 0.14$ .

### Houby nalezené v rámečcích

Ve všech rámečcích (kromě několika výjimek) bylo vždy nalezeno velmi široké spektrum různých hyf i kořenů rostlin, dokonce byla pozorována formace ektomykorhiz. Nejčastěji pozorovanou houbou v prostoru rámečků byla hnědá asi 4  $\mu\text{m}$  široká basidiomyceta s přezkami. Tato houba se však vyskytovala i v rámečcích, kde žádné klíčení nenastalo a byla pozorována i u parazitovaných semen. Obdobný charakter výskytu byl pozorován i u šedivých hyf, širokých 2  $\mu\text{m}$  a bez přezek. Vzácněji se vyskytovaly tmavě pigmentované hyfy široké cca 6,5  $\mu\text{m}$ , s přezkami a četnými výrůstky na povrchu. Rozlišit konkrétní hyfy v pelotonech protokormů většinou nebylo možné a jen zřídka bylo patrné, zda externí hyfa do embrya opravdu vstupuje, nebo pouze pasivně přiléhá k povrchu embrya. V několika vzácných případech, kdy se podařilo pozorovat houbu procházející rhizoidem, byla pokaždé nalezena světle hnědá hyfa se zúžením pod růstovým vrcholem, široká cca 4  $\mu\text{m}$ , bez přezek (u *E. helleborine* na lokalitě PPe a *E. atrorubens* na lokalitě HMi). Někdy také zvláštní průhledná hyfa se zelenými kulovitými útvary v buňkách. Hyfy v rhizoidech vyrůstají z vnitřního prostředí protokormu, většinou z pelotonů poblíž rhizoidu. Hyfy rostou buď společně s rhizoidem, nebo prorůstají jeho vrcholem do vnějšího prostoru. Fotografie hyf nalezených v rámečcích jsou v příloze 2 (tabule 1)

### **3.3 Houbová kolonizace kořenů dospělých rostlin**

#### **3.3.1 Přímé pozorování nenabarvených kořenů**

V kořenech byly pozorovány všechny fáze vývoje pelotonů, tj. volně rostoucí hyfy vytvářející v buňkách charakteristická klubíčka, jejich následná komprese a degradace až do úplného rozložení mykobionta a nová rekolonizace buňky. Zaznamenána byla i přítomnost dvou různých mykobiontů v těsné blízkosti (*E. atrorubens*). Často byla pozorována hypertrofní jádra u rostlinných buněk obsahujících pelotony.

Měřitelné charakteristiky kořenových systémů studovaných rostlin jsou uvedeny v tab. 12. Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií míry houbové infekce je na obr. 8. Fotografie kořenového systému, řezů kořenů i mykobiontů jsou v příloze 2 (tabule 2 a 3).

#### *Epipactis albensis*

Mykorhizní houba byla vždy zbarvená světle hnědě, v pelotonech se často větví, čímž vznikají poměrně kompaktní klubíčka. Charakteristické pro tuto houbu je výrazné zúžení hyfy pod jejím růstovým vrcholem. Přezky nebyly pozorovány.

Kořeny *E. albensis* byly velmi křehké. Mladé kořeny byly bez infekce, staré kořeny naopak vždy obsahovaly pelotony. Dvě studované rostliny *E. albensis* měly poměrně krátký kořenový systém.

*Epipactis atrorubens*

Barva mykorhizní houby byla proměnlivá – od bělavé, až po tmavě hnědou ve starých kořenech. Nejčastějším mykobiontem u *E. atrorubens* byla nepřezkatá houba s poměrně širokými hyfami, které se v pelotonech jen velmi málo větvily, klubička byla poměrně řídká. Hyfy nebyly na růstovém vrcholu tak výrazně zúženy jako u *E. albensis*.

Přítomnost houbové infekce byla v některých případech velmi dobře patrná již na první pohled. U starých, velmi tmavě pigmentovaných, kořenů byla primární kůra plná tmavých pelotonů. Naopak mladé bělavé kořeny byly bez infekce. U mnoha kořenů se však množství infekce podle jejich barvy odhadnout nedalo.

*Epipactis helleborine*

U *E. helleborine* byla pozorována různě zbarvená infekce v kořenech rostlin z Kamenného Újezda a z Milovic, naopak v kořenech rostlin z Lednice byly pozorovány výhradně světle hnědé hyfy, které charakterem větvení v pelotonech, zúžením i barvou připomínaly mykobionta *E. albensis*.

Přítomnost infekce v kořenech *E. helleborine* byla na první pohled patrná jen výjimečně. Většinou byly kořeny jednotně světle hnědé a přítomnost infekce se nedala odhadnout. Mladé kořeny byly většinou bez infekce.

*Epipactis purpurata*

Dvě odebírané rostliny *E. purpurata* rostly ve velmi tvrdé půdě a oddenek s kořeny byl umístěn poměrně hluboko pod povrchem půdy. Povedlo se mi proto vykopat pravděpodobně jen menší část kořenového systému. Nicméně houbová infekce byla nalezena v kořenech jen jedné z rostlin, a to ve velmi malém množství. Infekce byla jednotně světle hnědá, všechny pelotony již byly degradovány. Volné hyfy, na kterých by byla patrná nějaká strukturní charakteristika, pozorovány nebyly.

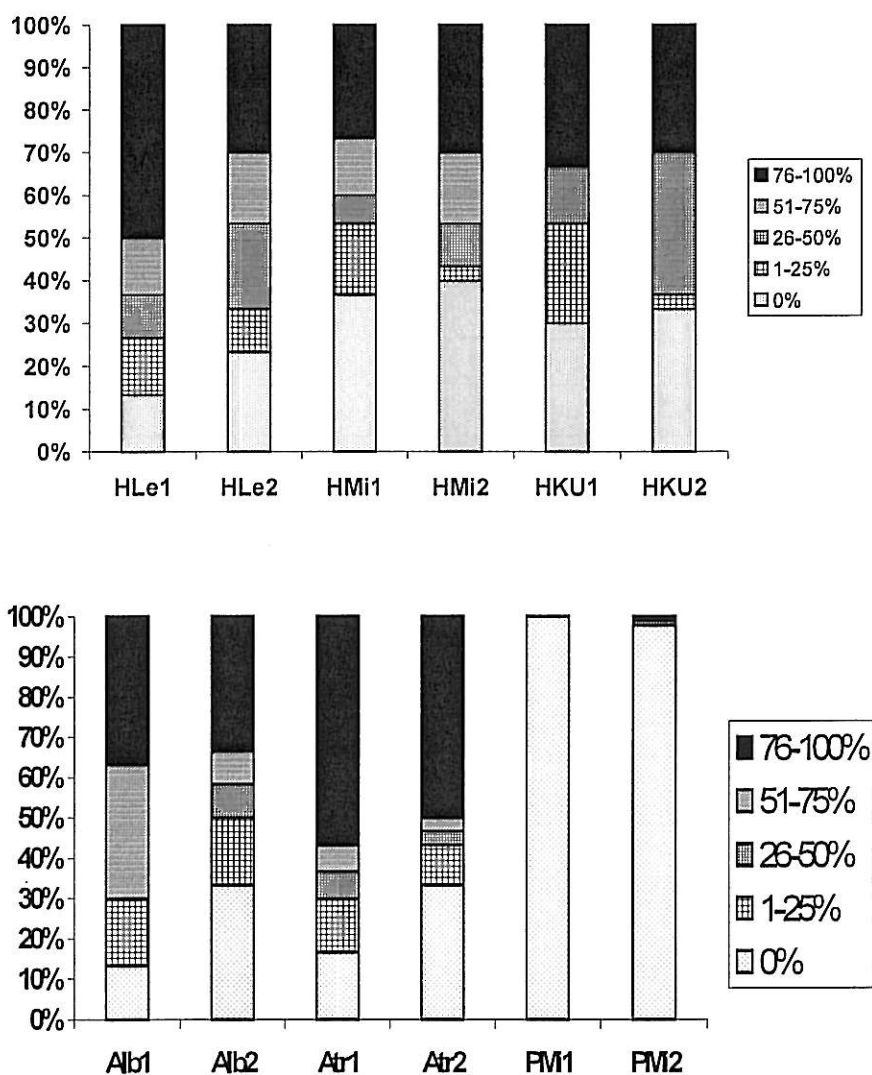
Kromě strávených klubiček byly pozorovány také hvězdičkovité útvary z hyf nejasného původu a funkce.

Kořeny *E. purpurata* byly velmi tuhé a pevné. Infekce byla

**Tab. 12.** Charakteristiky kořenových systémů kruštíků (vždy 2 rostliny jednoho druhu z lokality).

Druh kruštíku	Lokalita původu	Šířka kořene (mm)	Délka kořenového systému (cm)	Kolonizace kořenového systému
<i>E. albensis</i>	Alb	1,5 - 3,2	20,5	66,7%
			73	87%
<i>E. atrorubens</i>	Atr	1,8 - 3,0	575	83,3%
			438	66,7%
<i>E. helleborine</i>	HKU	1,8 - 4,0	393	67,7%
			163,5	70%
			720	86,7%
<i>E. helleborine</i>	HLe	1,8 - 4,0	124	76,7%
			85	63,3%
<i>E. helleborine</i>	HMi	1,8 - 4,0	297	60%
<i>E. purpurata</i>	PMi	2,2 - 5,2	105,5	0%
			380	0,2%

nalezena pouze u jedné ze dvou rostlin a po podrobném prohlédnutí celého kořenového systému byl nalezen jen jeden celkem 7,5 cm dlouhý úsek infikovaného kořene.



**Obr. 8.** Míra houbové kolonizace kořenového systému dospělých rostlin. V grafech jsou vyneseny kořenové systémy vždy dvou dospělých rostlin téhož druhu. HLe = *E. helleborine* z Lednice, HMi = *E. helleborine* z Milovic, HKU = *E. helleborine* z Kamenného Újezda, Alb = *E. albensis*, Atr = *E. atrorubens*, PMi = *E. purpurata* z Milovic.



### 3.3.2 Pozorování nabarvených kořenů

Po nabarvení kořenů nebyly u žádného ze sledovaných druhů odhaleny nějaké další charakteristické struktury orchideoidní mykorhizy neviditelné pod binokulárním mikroskopem přímo.

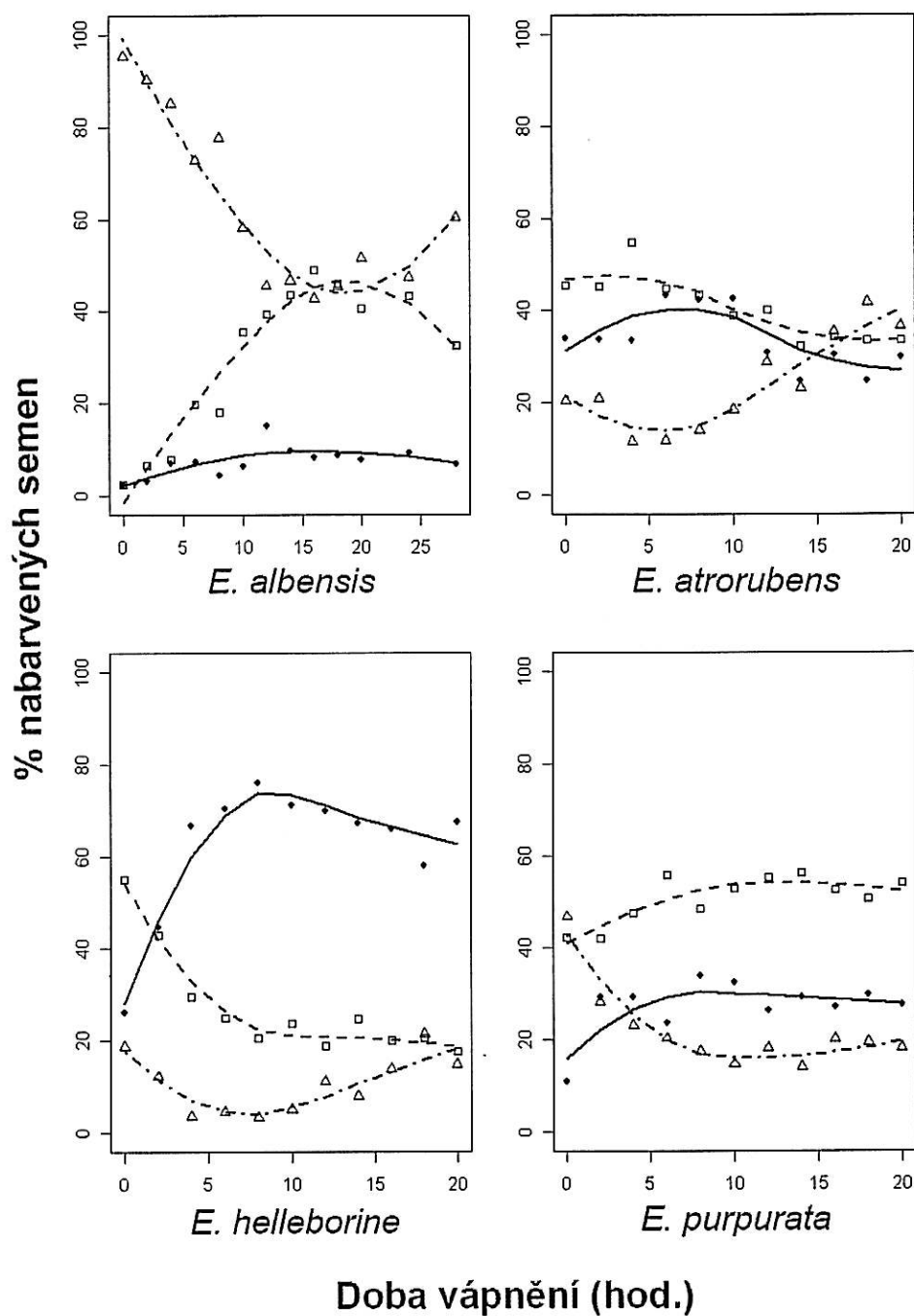
Na druhou stranu, barvení odhalilo velké množství různorodých hub, které jsou obecně považovány za nemykorhizní a někdy označovány jako tmavá sterilní mycelia (*dark septate endophyte*, DSE). Většinou bylo pozorováno velké množství tenkých hyf, někdy také mikrosklerocia, často též průhledná houba s jednotlivými zelenými kulovitými útvary ve svých buňkách. DSE se často vyskytovalo paralelně s orchideoidní mykorhizou, nejčastěji poblíž pokožky kořene.

Množství DSE v kořenech se značně lišilo mezi jednotlivými druhy. *E. albensis* neměl v kořenech téměř žádné, podobně i *E. helleborine* z Milovic, hojněji se potom vyskytovalo v kořenech *E. helleborine* z Lednice, z Kamenného Újezdu a v kořenech *E. atrorubens*, kde byla dokonce pozorována i basidiomyceta s přezkami (tedy nepatřící do skupiny *Rhizoctonia* agg.), ale netvořící pelotony. Nejvíce kolonizovány DSE však byly kořeny obou rostlin *E. purpurata*, kde v každém kousku (pro každou rostlinu 20 kousků dlouhých 1 cm) bylo pozorováno střední až velké množství infekce, včetně tvorby mikrosklerocií.

## 3.4 Vitalita semen

### 3.4.1 Optimalizace doby vápnění pro jednotlivé druhy

Optimální doba vápnění byla určena jako doba s největším procentem semen zbarvených do karmínově ruda. Nejvíce se barvila semena *E. helleborine*, kde po osmihodinovém vápnění bylo červeně zbarveno 76% všech semen (obr. 9). Pro stanovení této doby u *E. atrorubens* byla použita semena již měsíc stará, a výsledek barvení byl tímto zřejmě ovlivněn. Maximum červených semen, tj. 43%, bylo pozorováno po osmi hodinách vápnění (obr.9). U těchto druhů se relativně hodně semen barvilo i bez předchozího ošetření chlorovým vápnem. Množství vitálních semen *E. purpurata* se v podstatě po kterékoliv době vápnění stabilně drželo kolem 30%. Pouze po 8 hodinách vápnění vystoupilo na své maximum, tj. 34% (obr.9). Barvitelnost semen *E. albensis* byla velmi malá, většinou pod 10% červených semen. Maximum bylo 15% po 12 hodinách vápnění (obr. 9).

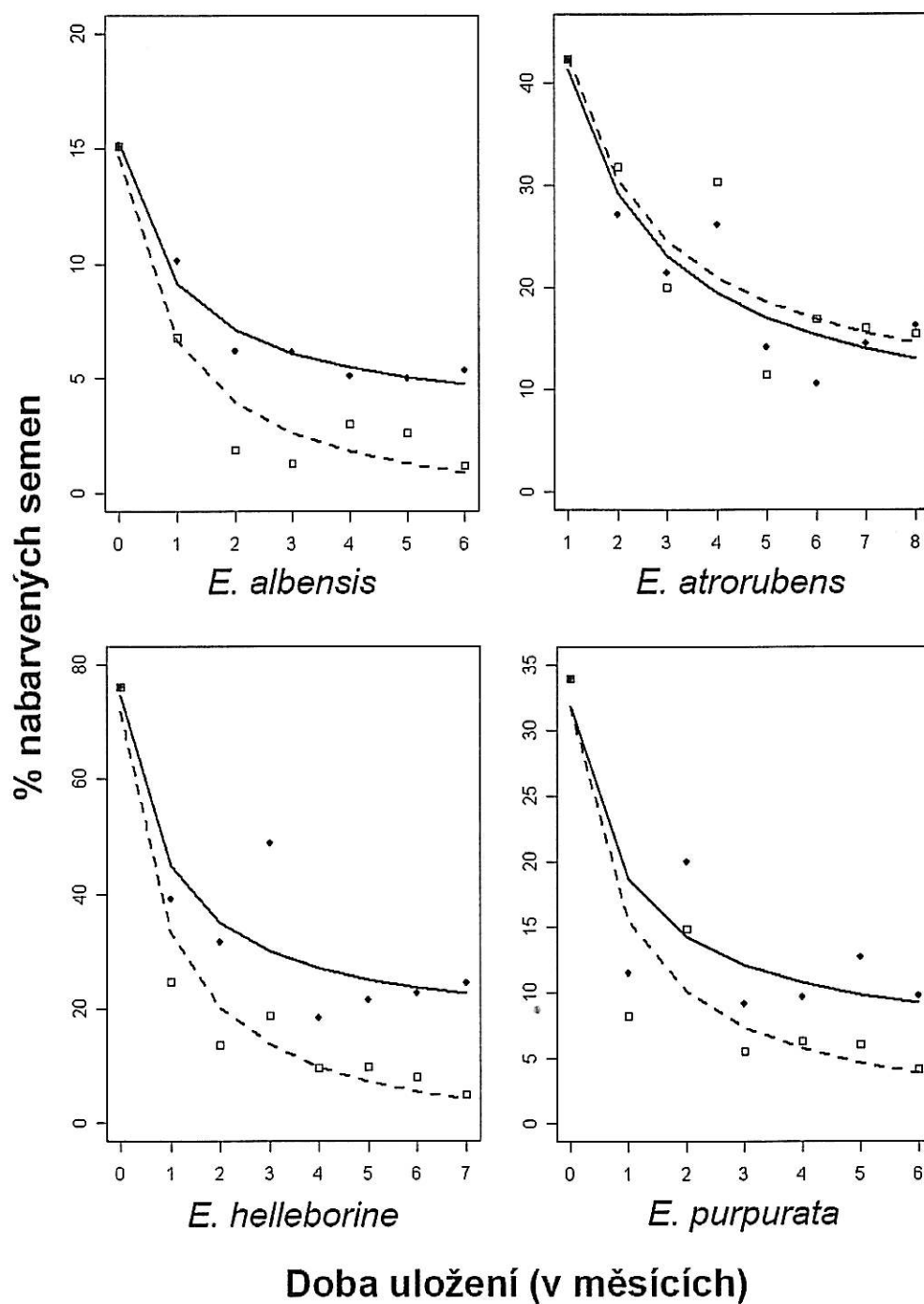


Obr. 9. Závislost procentuálního množství nabarvených semen čtyř druhů kruštíků na době vápnění. Vyneseny jsou kategorie červená (tj. živá semena; kolečka), žlutá (tj. mrtvá semena; trojúhelníčky) a růžová (nejasný status; čtverečky). Celkový trend závislosti byl vizualizován pomocí lokální vážené regrese (*loess*).

### 3.4.2 Změny ve vitalitě semen během roku

U všech semen byl během skladování zaznamenán značný pokles schopnosti obarvit se do červena. Relativně největší pokles nastal často již po jednom měsíci skladování a to u všech zkoumaných druhů. U *E. helleborine* prospívala lépe semena uložená v lednici (obr.10), kdy vitalita semena po prvním měsíci uložení poklesla pouze o  $\frac{1}{2}$  a až do posledního barvení po sedmi měsících neklesla pod 20%. Naopak u semen uložených při pokojové teplotě poklesla vitalita po prvním měsíci o  $\frac{2}{3}$ , při posledním barvení po osmi měsících již množství červených semen nepřesáhlo 5%. Podobně i podíl mrtvých semen je v případě uložení za pokojové teploty mnohem vyšší.

Vitalita semen *E. atrorubens* nebyla bohužel zaznamenána ihned po sběru a měření začalo až měsíc poté. Výsledky mohou být tímto velmi ovlivněny, obzvláště v případě semen, která byla později skladována v lednici. Nebyl zde zaznamenán žádný výrazný rozdíl mezi uložením v lednici a za pokojové teploty, i když semena z lednice prospívají poněkud hůře (obr. 10). Semena *E. purpurata* prospívají hůře při uložení za pokojové teploty a jejich vitálnost se po prvních třech měsících drží kolem 10%, resp. 5% (Obr. 10). Semena *E. albensis* se chovala obdobně, barvitelnost po několika měsících poklesla z 15% na 5%, resp. 1% za pokojové teploty (Obr. 10).



Obr. 10. Závislost podílu červených (tj. živých) semen čtyř druhů krušticů na době skladování a teplotě během skladování. Černá kolečka znázorňují semena uložena v lednici při 4 °C, čtverečky znázorňují semena uložena za pokojové teploty cca 20 °C. Celkový trend závislosti byl vizualizován pomocí lineární funkce lomené ( $y = a/(x+b) + c$ ).

## 4. DISKUSE

### 4.1 Ekologické preference dospělých rostlin jednotlivých druhů kruštíků

Semena orchidejí se snadno šíří anemochorním způsobem i na velké vzdálenosti (Rasmussen 1995). Přítomnost či nepřítomnost daného druhu na určitých lokalitách lze tedy do jisté míry považovat za ekologické preference druhů, protože vliv bariér omezujících šíření diaspor je minimální. Analýza druhového složení dřevin na lokalitách jednotlivých druhů proto hraje důležitou roli v pochopení ekologických potřeb epiparazitických kruštíků.

Výsledky diskriminační analýzy (obr. 2) a frekvenční tabulky (tab. 2) dobře korespondují se současnými představami o stanovištních preferencích studovaných druhů kruštíků (např. Jatiová & Šmiták 1996, Jersáková & Kindlmann 2004). *Epipactis helleborine* má širokou ekologickou amplitudu a nevyžaduje pro svůj růst specifickou skladbu dřevin, často roste ve fytoecologicky nevyhraněných porostech, naopak *E. albensis* je svým výskytem úzce vázán na lužní porosty, často se zastoupením topolů. *E. atrorubens* naopak preferuje zcela odlišný biotop ve většině případů charakterizovaný přítomností *Pinus sylvestris*. Pro lokality *E. purpurata* je typická vegetace se zastoupením dřevin svazů *Carpinion* a *Fagion*. Známé jsou však i jeho výskyty v nížinných biotopech lužního lesa na podobných lokalitách jako *E. albensis* (Rydlo 1994).

Kromě dřevin, na něž, jak se zdá, jsou jednotlivé druhy kruštíků poměrně těsně vázány, lze v tabulce frekvencí vylíčit skupinu druhů stromů, v jejichž doprovodu se vyskytují víceméně všechny zkoumané druhy. Mezi tyto dřeviny patří např. *Tilia cordata*, doprovodný druh nížinných lužních lesů i podhorských habřin, obdobně též *Carpinus betulus* či *Quercus robur*.

Přestože interpretace těchto výsledků je poměrně transparentní, je nezbytné formulovat závěry se značnou mírou opatrnosti. Snímky uložené v databázi většinou nepokrývají rovnoměrně areál jednotlivých druhů, často mají "shlukovitou lokalizaci" podle toho, kde zrovna přispěvatel do databáze snímkoval a co mu přišlo z hlediska botanického zajímavé. Tímto je poněkud narušen základní předpoklad statistické analýzy – nezávislost jednotlivých pozorování a náhodný výběr vzorků, což může vést ke zkreslení výsledků. Vegetační snímky v databázi jsou navíc různě velké (velikosti se pohybují v rozmezí 9 až 500 m<sup>2</sup>) a nemusí tudíž zcela věrně vypovídat o tom, v blízkosti kterých stromů kruštíky opravdu rostou. Situaci lze ilustrovat na příkladu *E. helleborine*, který na jižní Moravě roste velmi často v alejích s *Populus x canadensis* (terénní pozorování autorky), nicméně v databázi se žádný takový snímek nevyskytuje, přestože jinak jsou snímky z jižní Moravy hojně zastoupeny.

Analýzy fytoecologických snímků dobře popisují vazbu kruštíků na určité biotopy (druhy dřevin), avšak samy o sobě neposkytují odpověď na klíčovou otázku, proč se jednotlivé druhy kruštíků vyskytují právě v těchto biotopech.

#### 4.2 Klíčení semen *in situ*

Vysévání "prachových" semen pomocí rámečků na diapozitivy (Rasmussen & Whigham 1993), tedy metoda umožňující pozorovat klíčení za téměř přirozených podmínek, výrazně posunulo hranice našeho poznání v oblasti ekologie klíčení nejen u Orchidaceae (např. McKendrick *et al.* 2002, McCormick, Whigham & O'Neill 2004), ale také u Monotropoideae (Bidartondo & Bruns 2005). Přestože je metoda úspěšně používána již 13 let, stále zůstává v oblasti ekologie klíčení mnoho otázek. Její širší aplikace může přispět jak k ochraně ohrožených druhů rostlin, tak i k pochopení obecných zákonitostí parazitizmu mykotrofních rostlin.

Výsledky vysévacího pokusu ukázaly, že dva druhy ze čtyř studovaných kruštíků, tj. relativně vzácný silně kalcifilní druh *E. atrorubens* a široce rozšířený druh *E. helleborine*, jsou schopné klíčit velmi dobře na (téměř) každé z pokusných lokalit nezávisle na druhovém složení dřevin či druhu dospělého kruštíku přítomného na lokalitě (obr. 2, tab. 8, 9). Semena velmi vzácného autogamického druhu *E. albensis* klíčila velmi špatně, avšak klíční reakce byla zaznamenána téměř na všech lokalitách s různými druhy dospělých kruštíků i rozličným dřevinným složením (obr. 2, tab. 8, 9). Semena vzácného téměř nezeleného druhu *E. purpurata* nevyklíčila vůbec. Výrazně horší klíčení semen ze zdroje HKU a Atr na domovské lokalitě, příp. na lokalitě s podobným druhovým složením dřevin (tab. 8 a 9), je způsobeno spíše celkově nízkou kvalitou lokality HKU (tab. 5), než čímkoliv jiným.

Výsledky pokusu mohou být silně ovlivněny mnoha faktory. Obecné trendy v klíčení jsou sice z výsledků patrné, avšak konečné počty klíčících semen mohla velmi ovlivnit náhoda, protože (i) byla vyhodnocena pouze jedna třetina vysetých semen, čímž na jednu lokalitu připadá pouze 6 opakování semen z jednotlivých zdrojových lokalit. Vzhledem k tomu, že v rámci lokalit výsevu byla pozorována značná heterogenita v rozmištění mykorhizních hub, o čemž svědčí rozdíly mezi klíčením semen v jednotlivých blocích na lokalitě (tab. 3; pozorováno také ve studiích McKendrick *et al.* 2000, 2002), je pravděpodobné, že vliv nerovnoměrného rozmištění hub na výsledné počty bude značný. Způsob kvantifikace klíčících semen (ii) je faktor, který také významně ovlivňuje možnost porovnat výsledné počty. Do sítěk byl před založením pokusu vkládán pouze přibližný počet semen, protože nebylo možné vložit vždy přesně 250 miniaturních semen. Následně však byla absolutně kvantifikována pouze klíčící semena (počítat všechna semena bylo časově nezvládnutelné), výsledné počty proto nejsou plně srovnatelné. Velký vliv má jistě také celková kvalita semen (iii) – z tabulky 4 je patrné, že variabilita v kvalitě semen z různých populací v rámci druhu *E. helleborine* je vysoká, a pro druhy *E. atrorubens* a *E. albensis* byla testována semena pouze z jediné lokality (nezdařilo se nalézt žádné další lokality s vhodnou skladbou dřevin). Pokud tedy byla u *E. albensis* a *E. atrorubens* odebrána semena horší kvality, např. zatížená inbrední depresí, budou výsledky velmi ovlivněny. Je proto nutné brát srovnávání klíčení mezi jednotlivými druhy (tab. 10, 11) s velkou opatrností. Vliv vlastností

půdy (iv) zatím nelze zhodnotit, protože nebyla provedena podrobná analýza půd na jednotlivých lokalitách, která by mohla vést k tak jednoznačným závěrům, že např. *E. atrorubens* je schopen klíčit i na kyselějších půdách, ačkoliv dospělé rostliny rostou pouze na vápencovém podloží. Rozbor půd, kontrola zbylých rámečků a další přídatná pozorování budou provedena v rámci magisterské práce v sezóně 2006/07.

#### 4.3 Růst embryí

Semena krušíků začínají klíčit pravděpodobně na jaře a nikoliv na podzim, jak se někdy uvádí v literatuře (van Waes 1984; usuzuje tak kvůli rychlému poklesu životaschopnosti semen). Jarnímu načasování klíčení nasvědčují přímá pozorování v terénu (van der Kinderen 1995b, Rasmussen 1995), a také předpoklad, že semena terrestrických temperátních orchidejí mají morfologicko-fyziologickou dormanci (Baskin & Baskin 1998). Embryo je nediferencované a potřebuje pro úspěšné prolomení fyziologické a následně i morfologické dormance nějaký impuls prostředí. Tím může být vystavení nízkým teplotám (v případě temperátních orchidejí, *Epipactis palustris*, Rasmussen 1992), dalším impulsem by mohl být také chemický signál mykorhizní houby, tedy nějaká látka produkovaná ještě před (pozorováno u *Neottia nidus-avis*, McKendrick *et al.* 2002), nebo až po vstupu hyf do suspenzorových buněk embrya (pozorováno u *Corallorhiza trifida*, McKendrick *et al.* 2000). Pokud by se teorie o porušení dormance díky signálu mykobionta ukázala jako pravdivá, umožňovala by tato strategie semenům přečkávat dlouhodobě dormantní v půdě až do doby, kdy bude klíčení spuštěno přítomností mykobionta rostoucího v těsné blízkosti (McKendrick *et al.* 2002).

Na prolomení fyziologické dormance studovaných druhů krušíků bude mít, kromě chladové stratifikace, patrně největší vliv chemický signál mykorhizní houby před vstupem hyfy do suspenzorových buněk embrya. Velikostní kategorie 1b je totiž většinou prostá infekce. Embrya mírným zvětšováním ztrácí vnitřní obal embrya a jsou průsvitná, což bývá také vysvětlováno jako mobilizace zásobních látek indukovaná chemickým signálem mykobionta (McKendrick *et al.* 2002). Hlavní růst embryí nastává až po infekci houbou a formaci pelotonů. Tvorba pelotonů vede ke zvýšení obsahu vody v embryu, zvětšování buněk a vakuolizaci, což následně vyústí v rapidní zvětšení objemu protokormu (Yoder, Zettler & Stewart 2000).

Klíčení semen epiparazitických orchidejí, pro jehož iniciaci je nutná mykorhizní houba, se velmi liší od klíčení semen lučních orchidejí pojících se s houbami z komplexu *Rhizoctonia* agg. Semena např. *Dactylorhiza majalis* jsou totiž schopna asymbioticky klíčit až do stádia protokormu s rhizoidy (Rasmussen 1995). Tato odlišnost může odrážet obrannou adaptaci nezelených epiparazitických rostlin, specializovaných na relativně užší spektrum symbiontů, proti zbytečným ztrátám klíčících semen, která nenajdou správného mykobionta. Naopak mykorhizní partneři lučních orchidejí, saprofytické houby, jsou v půdě pravděpodobně všudypřítomní (McKendrick *et al.* 2002).

Klíčící semena druhů *E. helleborine*, *E. atrorubens* i *E. albensis* vypadají velice podobně. U protokormů je dobře patrná oblast na bázi semene infikovaná houbami, naopak dělivé meristémy na apikálním konci zůstávají bez infekce. Hyfy prorůstající rhizoidy vyrůstají z vnitřního prostředí protokormu. Tato pozorování se velmi dobře shodují s literárními údaji (van der Kinderen 1995b, Rasmussen 1995).

Shlukovitou distribuci klíčících i parazitovaných semen v rámečcích je možné interpretovat tak, že jediná houba (shluk hyf jednoho druhu) pravděpodobně ovlivňuje vývoj více blízkých semen najednou. Je možné, že pokud je v jednom rámečku velké množství klíčících semen, mohou si během růstu v těsné blízkosti začít konkurovat o zdroj živin (McKendrick *et al.* 2002). To se však nezdá být pravidlem alespoň v počátečních fázích růstu semen. V prvních dvou letech klíčení semen *Corralorhiza trifida* a *Neottia nidus-avis* byla rychlost klíčení (objem největšího protokormu) silně pozitivně korelována s množstvím klíčících semen v rámečku, jejich mykorhizní houba podporovala jak klíčení, tak i rychlý růst (McKendrick *et al.* 2000, 2002). U mnou studovaných druhů kruštitků je patrná podobná pozitivní závislost (obr. 6 a 7), i když v případě *E. atrorubens* neprůkazná.

#### 4.4 Mykobionti protokormů a dospělých rostlin

Znalost mykorhizních partnerů klíčících semen epiparazitických kruštitků je zatím založena jen na mikroskopických pozorováních. Má vlastní pozorování nepřezkatých světle hnědých hyf (tedy Ascomycota nebo Basidiomycota z okruhu *Rhizoctonia* agg.) v protokormech *E. atrorubens* a *E. helleborine* jsou v rozporu s pozorováním, které provedl van der Kinderen (1995b) u klíčících semen *E. helleborine*. Van der Kinderen za mykorhizní považuje houbu s hnědými, 3  $\mu\text{m}$  širokými hyfami s přezkami, tedy zástupce oddělení Basidiomycota nepatřící do komplexu *Rhizoctonia* agg. Hyfy s podobnými morfologickými charakteristikami jsem pozorovala také, zda tvoří pelotony v protokormech se mi ale potvrdit nepodařilo. Je však možné, že v různém prostředí preferují klíčící semena různé mykobionty (van der Kinderen bohužel neuvádí v jakém biotopu semena inkuboval).

Podrobná morfologická pozorování mykobiontů v kořenech dospělých rostlin *E. helleborine* (Salmia 1988, Voigt 1991) poukazují na pomalu rostoucí mycelium, v dospělosti s hnědými, bradavčitými a relativně tlustostěnnými hyfami s interkalárními monilioidními buňkami. Pozorované houby nebyly určeny, nebyly však přiřazeny do komplexu *Rhizoctonia* agg. U ostatních druhů epiparazitických kruštitků, kterými se v této práci zabývám, doposud nebyl uveřejněn morfologický popis mykobiontů.

Průlomovou metodou, obcházející obtíže s determinací asexuálních stádií hub, je molekulární identifikace mykobiontů. Nicméně její širší aplikace u kruštitků zatím chybí. Dosud jediná, geograficky ani biotopově nepříliš široká studie (Bidartondo *et al.* 2004) odhalující identitu mykobiontů některých dospělých epiparazitických orchidejí mj. i dvou druhů kruštitků, kterými se zabývám v této práci, upozorňuje na symbiózu *E. atrorubens* a *E. helleborine* s obligátně ektomykorhizní vřeckovýtrosou houbou *Tuber* (lanýž), příp. také



*Wilcoxina* (u *E. atrorubens*). Molekulární determinace mykobiontů (nad rámec bakalářské práce) z kořenů jednoho jedince *E. atrorubens* z Čepice a *E. albensis* z Libice ukázala, že první druh tvoří na této lokalitě mykorhizu s houbou rodu *Wilcoxina*, *E. albensis* s rodem *Tuber*.

Díky znalosti morfologie a totožnosti mykobiontů dvou zmíněných druhů lze učinit další závěry. Nápadná podobnost morfologie mykobionta z kořenů *E. helleborine* z Lednice (topolová alej) s mykobiontem *E. albensis* z Libice (topolová alej) může znamenat, že i v Lednici je mykorhizním partnerem krušičků právě *Tuber*. U rostlin *E. helleborine* z ostatních lokalit, ani u *E. purpurata* bohužel nebylo provedeno podrobnější mikroskopické pozorování, nelze tedy odhadnout totožnost mykobionta. Morfologický charakter mykobiontů protokormů *E. atrorubens* a *E. helleborine* (zúžení hyf pod růstovým vrcholem, nepřezkaté hyfy, časté větvení hyf v pelotonech) opět připomíná mykobionta *E. albensis*.

Klíčení semen různých druhů krušičků s houbou rodu *Tuber* a i jeho přítomnost v kořenech více druhů dospělých rostlin orchidejí ze vzdálených lokalit by signalizovalo, že *Tuber* je pravděpodobně poměrně široce rozšířený rod ektomykorhizních hub i v našich zeměpisných šířkách (rozšíření lanýžů v ČR není příliš známé; Kavková, osobní sdělení). Jejich výzkum má své těžiště hlavně v mediteránní oblasti, přičemž ektomykorhizy lanýžů byly nalezeny u mnoha druhů stromů, mj. u *Corylus avellana*, *Quercus robur*, *Fagus sylvatica*, *Populus alba*, *P. nigra*, *Pinus sylvestris*, *Tilia platyphyllos*, *Picea abies*; De Roman, Claveria & De Miguel 2005). Skutečnost, že u všech dosud studovaných lesních epiparazitických krušičků byl rod *Tuber* nalezen (kromě *E. distans*, ale to může být způsobeno malým rozsahem studie Bidartondo *et al.* 2004), by mohla být zajímavá také z evolučního hlediska. Vzhledem k tomu, že u dalších epiparazitických druhů z tribu Neottieae se *Tuber* mykorhizy neúčastní (Bidartondo *et al.* 2004, Julou *et al.* 2005, Girlanda *et al.* 2006), je možná symbióza s rodem *Tuber* v rámci tribu autapomorfním znakem rodu *Epipactis*. Symbióza *E. palustris* s houbami komplexu *Rhizoctonia* agg. (Rasmussen 1992) je nejspíš sekundární a indukována jeho přechodem z lesního do mokřadního prostředí.

Míra kolonizace kořenů dospělých rostlin se liší druh od druhu. Pozorovaná střední míra kolonizace kořenového systému druhů *E. helleborine* a *E. atrorubens* se dobře shoduje s literárními údaji (např. Procházka 1980, Salmia 1989, Rasmussen 1995). Názory na míru kolonizace kořenů *E. purpurata* se však v literatuře velmi rozcházejí, nalézt lze jak informace, že rostlina je silně mykotrofní (např. Procházka 1980), tak i tvrzení, že kořeny jsou zcela bez houbové infekce (např. Rasmussen 1995). Velmi sporá mykorhizní kolonizace kořenů tohoto téměř nezeleného druhu velmi stinných lesů, zaznamenaná i v této práci, je vskutku zarážející. Výsledky je však třeba brát s největší opatrností, neboť se nezdařilo vykopat celý kořenový systém a je možné, že ektomykorhizní partneři rostou až v hlubších vrstvách půdy. Většinou však ektomykorhizní houby rostou ve svrchní části humusového horizontu (0-10 cm hluboko), ovšem i mezi jednotlivými rody hub existuje velká variabilita v preferencích k různým hloubkám půdního horizontu (Erland & Taylor 2002, Neville *et al.* 2002).

Zajímavý je také nález velkého množství tmavých sterilních mycelií (DSE) právě v kořenech *E. purpurata*. DSE jsou běžnými endofyty kořenů mnoha rostlin (včetně orchidejí), kde se můžou vyskytovat často paralelně s mykorhizními houbami (např. Ahlich & Sieber 1996, Jumpponen & Trappe 1998, Vujanovic, St-Arnaud & Barabe 2000). Přestože je však ekologická funkce většiny mykorhizních hub dobře známa, role DSE ve výživě rostlin zatím nebyla zcela objasněna. Zdá se však, že vliv těchto hub na růst rostlin může kolísat od negativního, přes neutrální až k pozitivnímu, v závislosti na podmínkách prostředí, druhu konkrétní houby i rostliny (Jumpponen 2001, Addy, Piercey & Currah 2005, Vohník, Albrechtová & Vosátka 2005).

#### 4.5 Vitalita semen

Modifikovaná metoda testování vitality semen orchidejí barvením tetrazoliovou solí podle van Waes & Debergh (1986a) otevřela možnost zjišťovat vitalitu semen nejen tropických, ale také temperátních orchidejí. Protože semena temperátních orchidejí mají relativně tlustý vnitřní obal embrya (Lucke 1981), je nutné jej pro biochemické barvení zpropustnit uměle vápněním. Jak ukazuje obr. 9 z experimentu, ve kterém se doba vápnění pohybovala od 0 do 20 (28) hodin, větší množství červených embryí bylo získáno většinou mezi 4 až přibližně 16 hodin trvajícím vápněním. Menší množství nabarvených embryí před a po této době znamená, že některá embrya mají méně či více odolný obal embrya, než ostatní. Část těchto embryí se potom v době, která je zvolena jako optimální, neobarví nebo se zbarví do růžova, přestože jsou normálně životaschopná. Výsledky barvení tedy velmi závisí na variabilitě v odolnosti semen proti vápnění a procento nabarvených semen při optimální době vápnění je třeba brát jako minimální množství semen, která jsou skutečně životaschopná (van der Kinderen 1995a).

Optimální doba vápnění semen *E. helleborine* a *E. atrorubens* již byla uveřejněna v literatuře (van Waes & Debergh 1986a). Popsané výsledky ale mohou být velmi ovlivněny vlastnostmi chemikálie použité na vápnění semen (např. množství aktivního chlóru, který zpropustní osemení) a je proto vhodné před barvením semen dobu ověřit vlastním experimentem. Výsledná optimální doba vápnění semen *E. atrorubens* odpovídá době udávané v literatuře (van Waes & Debergh 1986a), semena *E. helleborine* se však jeví lepší vápnit semena pouze 8 h, nikoliv 12 h, jak je uváděno (van Waes & Debergh 1986a). Při této době je nejen procento červených semen největší (obr. 9), ale také množství nenabarvených, příp. již mrtvých semen je nejnižší. Semena *E. purpurata* se již po dvou hodinách vápnění konstantně barvila na hladině 30% červených semen. To může znamenat, buď že semena s tenkým, středně tlustým a tlustým obalem embrya jsou zastoupena relativně stejně početně, nebo že semena *E. purpurata* vydrží i delší doby vápnění nepoškozena. Nízká barvitelnost semen *E. albensis* by mohla být způsobena nízkou kvalitou semen. Semena self-kompatibilních druhů orchidejí mohou být totiž po samoopylení zatížena inbrední depresí, čímž se jejich kvalita výrazně zhorší (Tremblay *et al.* 2005). *E. albensis* je však obligátně autogamický druh a podle Jain (1976) je možné, že semena druhů rozmnožujících se

autogamií pravidelně inbrední depresí zatížena nebudou, protože škodlivé recesivní alely již byly z populace vyselektovány.

Trend poklesu barvitelnosti semen během skladování se také shoduje s literárním údajem (van Waes 1984). van Waes ale udává, že semena *E. helleborine* ztratila schopnost obarvit se již po 4 týdnech skladování za pokojové teploty a po 12 týdnech skladování v lednici. Semena *E. atrorubens* se nenabarvila již po 2 týdnech skladování za pokojové teploty. Navíc se barvitelnost semen *E. helleborine* pohybovala jen kolem 26% červených semen (van Waes & Debergh 1986a). Obě pozorování jsou v rozporu s mými vlastními, kdy se semena *E. helleborine* barvila ze 76% a i po 7 měsících skladování semen v lednici se do červena stále barvilo kolem 20% semen. Podobný rozpor byl pozorován i u semen *E. atrorubens*, která se po 8 měsících skladování stále barvila do červena cca z 15%. Van Waes (1984) a van Waes & Debergh (1986b) dále udávají, že množství klíčících semen v asymbiotických *in vitro* experimentech dobře koresponduje s množstvím nabarvených semen. Ztrátu barvitelnosti vysvětluje jako snížení životaschopnosti semen a domnívá se také, že kvůli rychlé ztrátě vitality, musí semena kruštíků klíčit již na podzim bezprostředně po dozrání. Avšak ve vysévacích pokusech *in situ* van der Kinderen (1995b) pozoroval, že semena klíčí až na jaře a že procento skutečně klíčících semen dalece převyšuje množství semen, které se tetrazoliovou solí obarvilo. Neschopnost nabarvit se tetrazoliovou solí přičítá poklesu schopnosti transformovat tetrazoliovou sůl na červené barvivo, spíše než ztrátě životaschopnosti. Semena se nejspíš stanou krátce po dozrání dormantními, což umožňuje pomalé bobtnání přes zimu (inhibitory růstu neovlivňují bobtnání semen; Black 1983), a zároveň blokuje další vývoj až do momentu kolonizace mykorhizní houbou.

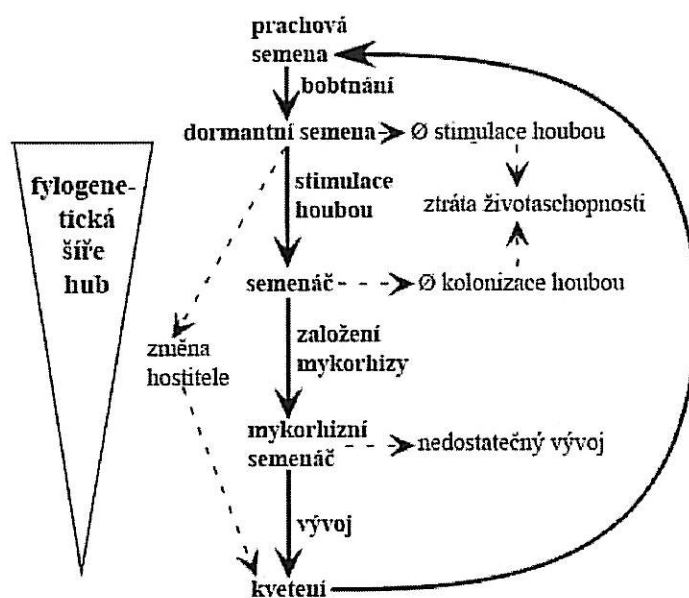
Významnou roli v udržení vitality semen v půdě tak pravděpodobně hraje pomalé bobtnání embryí, které v laboratorních podmínkách není umožněno. Je tedy možné, že počáteční procento nabarvených semen velmi závisí na době sběru semen a tedy na tom, zda semena jsou již dormantní či nikoliv. Ovšem následný pokles barvitelnosti je ovlivněn ztrátou vitality semen skladováním v neadekvátních podmínkách. Myšlenku vlivu fyziologické dormance a nějakého "after-ripening" mechanismu, který ji spouští a uplatňuje se v době dozrání, dokud jsou semena na mateřské rostlině, podporují jak literární, tak vlastní pozorování. Nezralá semena mnoha orchidejí, mj. i *Epipactis gigantea*, klíčí *in vitro* výrazně lépe než plně dozralá semena (Baskin & Baskin 1998). Semena *E. atrorubens* sebraná v terénu přibližně měsíc po dozrání se barvila velice málo, naopak semena sebraná v době zrání, skladovaná měsíc v laboratoři, se barvila výrazně lépe. Podobně i semena *E. albensis* sebraná 14 dní po dozrání, tvarově zcela normálně vyvinutá, vykazovala velmi malou barvitelnost oproti semenům sebraným krátce před puknutím tobolek.

#### 4.6 Závěr

Z výsledků i diskuse je zřejmé, že v ekologii kruštíků stále zůstává mnoho nevyřešených otázek. Mezi klíčové jistě patří otázka, jak vysvětlit schopnost semen některých druhů klíčit

na velmi různorodých lokalitách či naopak neklíčivost semen jiných druhů, v kontrastu se skutečným výskytem dospělých rostlin. O příčinách nelze zatím formulovat přesné hypotézy, neboť bylo vyhodnoceno pouze malé množství vzorků, nejsou známy půdní charakteristiky lokalit a chybí také detailní znalost mykorhizních partnerů zjištěná pomocí molekulárních metod. Přesto snad lze alespoň nastínit, jaké jsou perspektivy dalšího výzkumu a k jakým závěrům by mohl dospět.

**Je rozdíl mezi klíčivostí semen vysetých na vlastní či cizí lokalitě a co hraje klíčovou roli v dalším růstu rostlin?** Pokusy se semeny zelených epiparazitických orchidejí vysetých na různých lokalitách s různými druhy orchidejí zatím chybí, nabízí se ale srovnání s velmi podobnou studií provedenou na několika druzích z podčeledi Monotropoideae (Bidartondo & Bruns 2005). Výsledný obrázek, který studie podává, je takový, že semena na původní lokalitě klíčí jen s houbami své mateřské rostliny či s blízkými příbuznými druhy hub, tyto semena však rostou podstatně hůř. Výjimku tvoří semena vysetá na nepůvodní lokalitě, která jsou schopná tvořit mykorhizu i s "cizím" mykobiontem, a často s ním rostou i výrazně lépe. Je tedy možné, že v symbióze mohou být zahrnuti i "naivní" mykobionti, kteří růst podporují stejně dobře a nebo lépe. Vzhledem k absenci těchto "cizích" mykobiontů v kořenech dospělých rostlin je však pravděpodobné, že během ontogeneze mykotrofa se tato symbióza ukáže jako nevhodná a vyústí buď v odumření rostliny, zhoršený růst nebo ve změnu mykobionta (obr. 11). Podobný vývoj vztahu mykotrof-houba bude pravděpodobně nalezen také u nezelených orchidejí a klíčení semen je tedy relativně méně specifické.



**Obr. 11.** Fáze vývoje mykoheterotrofních rostlin a jejich vztah k hostitelským houbám. Převzato z Bidartondo (2005), upraveno.

U kruštíků je situace komplikovanější tím, že se (přinejmenším některé) druhy pojí se širším spektrem partnerů než nezelené Monotropoideae. *E. atrorubens* se pojí s více rody velmi vzdáleně příbuzných hub (včetně rodu *Tuber*), pro *E. helleborine* je zatím známa symbióza jen s rodem *Tuber*, přičemž zahrnuto bude nejspíš více druhů. *Tuber* se také

zdá být poměrně široce rozšířeným rodem ektomykorhizních hub. Je možné, že chemický signál hub z tohoto rodu indukující klíčení je velmi podobný a semena těchto druhů kruštíků vyklíčí velmi dobře s mnoha druhy lanýžů (nebo i jinými druhy hub) a to i na poněkud pro

dospělé rostliny neobvyklých lokalitách (v případě *E. atrorubens*). Protože se dospělé rostliny poji se širším spektrem mykobiontů a pravděpodobně nevykazují tak silné preference ke konkrétnímu druhu houby, je nasnadě, že selekce na mykobionta v protokormech během vývoje nebude tak tvrdá jako u Monotropoideae a dalších nezelených orchidejí.

Pokud se dále ukáže, že se semena i dospělé rostliny opravdu poji s širokým (překrývajícím se) spektrem hub, tak potom skutečné omezení, které dělá některé druhy zelených epiparazitických orchidejí tak vzácnými, budou patrně půdní faktory, jejichž vliv vstoupí do vývoje rostliny až později. Velký klíčící potenciál druhu *E. atrorubens* a jeho nesoulad s aktuálním rozšířením (např. na jižní Moravě již nejsou žádné recentní lokality a druh je považován za silně ohrožený) však bude potřebovat hlubší prošetření.

**Co je příčinou neklíčivosti semen některých druhů?** Špatná, příp. nulová klíčivost semen druhů *E. albensis* a *E. purpurata* může mít více příčin. Na vině může být (i) malá životaschopnost semen, přestože byla embrya tvarově úplně normální a abortovaná embrya se vyskytovala jen vzácně. Zdrojové populace *E. purpurata*, použité v této studii, čítaly kolem dvaceti jedinců, čímž je pravděpodobnost příbuzenského křížení a následného snížení kvality semen vysoká. *E. albensis* je obligátně autogamický druh a negativní vliv samooplození je proto nejednoznačný (viz bod 4.5). O dalším vysvětlení (ii) lze jen spekulovat, protože není známo s jak širokým spektrem mykobiontů se kruštíky poji. Je možné, že *E. purpurata* a *E. albensis* vyžadují pro vyklíčení i růst v dospělosti velmi specifického mykobionta (či několik málo blízké příbuzných mykobiontů), podobně jako někteří jiní nezelení mykotrofové. Semena jsou schopná ležet delší dobu zbytnělá a dormantní v půdě a vyčkávat na chemický signál vhodného mykobionta, příp. (iii) mohou potřebovat delší klidové období v půdě (např. klíčení u nezeleného druhu *Corallorhiza maculata* bylo pozorováno až po dvouleté inkubaci v půdě, Taylor *et al.* 2002; u jiných nezelených orchidejí však nastalo většinou dřív, McKendrick *et al.* 2000, 2002). K závěru, že tyto dva druhy by mohly svou růstovou strategií (dlouhá dormance, potřeba specifického mykobionta) připomínat nezelené rostliny více než zelené, by mohla vést u *E. purpurata* malá listová plocha, v podstatě modrofialová barva rostlin a růst v nejstinnějším prostředí ze všech studovaných druhů a tedy i zjevná nedostatečnost fotosyntézy. V případě *E. albensis* pak schopnost přečkávat dlouhé roky v půdě. Pro oba druhy je také typická absence nekvetoucích prýtů, což je charakteristické pro nezelené orchideje, které přečkávají většinu života pod zemí a nad zem vyrostou jen za účelem reprodukce (Procházka 1980). Jistě se také nesmí zapomenout na další (iv) možnou příčinu neklíčivosti semen *E. purpurata* – vzhledem k absenci mykobionta v horních částech kořenů dospělých rostlin (viz bod. 4.4), je možné, že se tyto houby vyskytují až v hlubších půdních horizontech a ne v povrchových humusových vrstvách, kde byla semena zasazena.

Pokud tedy přijmeme první nebo druhou hypotézu toho, proč semena neklíčí, lze dále rozvést myšlenku o tom, proč jsou tyto dva konkrétní druhy kruštíků vázané jen na lužní les v případě *E. albensis* nebo na habřiny a bučiny v případě *E. purpurata*. Pokud je tedy příčinou

---

neklíčivosti semen jen nízká vitalita semen, potom faktorem omezujícím rozšíření dospělých rostlin mohou být (podobně jako u *E. atrorubens*) patrně půdní faktory – chemismus půdy či vodní režim. Pokud je však příčinou neklíčivosti nutnost velmi specifického mykobionta, znamená to, že ektomykorhizní houba je striktně vázána jen na konkrétní druh dřeviny, příp. na konkrétní typ půdy? Jestliže přijmeme vázanost mykorhizní houby např. u *E. albensis* jen na topoly a ne např. na lípy, které se hojně vyskytují i v jiných typech lesa, zůstávají zarážející občasné nálezy populací *E. albensis* na lokalitách bez topolů (Rydlo 1989). Tato skutečnost však může mít také více vysvětlení – buď je dotyčná houba schopná růst i na jiných stromech, ale jen vzácně, nebo je *E. albensis* (v menší míře) schopen růstu i s jinými houbami. Vzhledem k naší pramalé znalosti ekologie společenstev i jednotlivých druhů ektomykorhizních hub a jen nedokonalé znalosti mykorhizních partnerů dospělých kruščíků však lze stěží formulovat přesnější hypotézy. Ovšem další příčinou, která může vnášet nesrovnalosti do hypotéz a předpokladů, je obtížná determinovatelnost tohoto druhu, který byl vydělen z velmi variabilního okruhu *E. helleborine* agg., což může vést k omylům v jeho určení.

Alespoň část diskutovaných problémů a otázek by měla zodpovědět navazující magisterská práce. Budou zkontrolovány zbývající rámečky, což ukáže, zda je neklíčivost semen *E. purpurata* způsobena jejich pomalou ontogenezí, dále budou provedeny analýzy půd a molekulární identifikace mykobiontů protokormů a dospělých rostlin. Tato zjištění pak pomohou odpovědět na otázku, zda je rozšíření rostlin určováno specifitou k mykorhizním houbám či půdními faktory. Bylo by vhodné se zaměřit také na to, do jaké míry jsou studované druhy kruščíků závislé na výživě houbami, tj. do jaké míry vystačí s produkty vlastní fotosyntézy, což by opět mohlo poodhalit alespoň část složitých vztahů mezi houbou - rostlinou - prostředím.

## 5. LITERATURA

- Addy HD, Piercey MM, Currah RS. 2005.** Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany* **83** (1): 1-13.
- Ahlich K, Sieber TN. 1996.** The profusion of dark septate endophytic fungi in non-ectomycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. *New Phytologist* **132** (2): 259-270.
- Alexander C, Hadley G. 1985.** Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist* **97**: 391-400.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998.** *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego.
- Bidartondo MI. 2005.** The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist* **167** (2): 335-352.
- Bidartondo MI, Bruns TD. 2001.** Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* **10** (9): 2285-2295.
- Bidartondo MI, Bruns TD. 2002.** Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology* **11** (3): 557-569.
- Bidartondo MI, Bruns TD. 2005.** On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development. *Molecular Ecology* **14** (5): 1549-1560.
- Bidartondo MI, Bruns TD, Weiss M, Sergio C, Read DJ. 2003.** Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. **270** (1517): 835-842.
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read TJ. 2004.** Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society London Series B* **271**: 1799-1806.
- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Dominguez L, Sersic A, Leake JR, Read DJ. 2002.** Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **419** (6905): 389-392.
- Björkman E. 1960.** *Monotropa Hypopitys* L. – an epiparasite on tree roots. *Physiologia Plantarum* **13**: 308-327.
- Black M. 1983.** Abscisic acid in seed germination and dormancy. In: Addicott FT [ed.], *Abscisic Acid*, p. 331-363, Praeger, New York. [non vidi]
- Bruns TD, Bidartondo MI, Taylor DL. 2002.** Host specificity in ectomycorrhizal communities: What do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* **42** (2): 352-359.
- Bruns TD, Read DJ. 2000.** In vitro germination of nonphotosynthetic, myco-heterotrophic plants stimulated by fungi isolated from the adult plants. *New Phytologist*. **148** (2): 335-342.
- Currah RS, Smreciu EA, Hambleton S. 1990.** Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* **68** (6): 1171-1181.
- De Roman M, Claveria V, De Miguel AM. 2005.** A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycological Research* **109** (10): 1063-1104.
- Dominguez LS, Sersic A. 2004.** The southernmost myco-heterotrophic plant, *Arachnitis uniflora*: root morphology and anatomy. *Mycologia* **96** (5): 1143-1151.

- Dressler RL. 1981.** *The Orchids: Natural History and Classification*. Harvard University Press, Massachusetts.
- Erland S, Taylor AFS. 2002.** Diversity of ecto-mycorrhizal fungal communities in relation to the abiotic environment. *In: van der Heijden MGA, Sanders IR [eds.], Mycorrhizal Ecology*, p. 163-200, Springer-Verlag, Berlin.
- Gebauer G, Meyer M. 2003.**  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**: 209-223.
- Girlanda M, Selosse MA, Cafasso D, Brilli F, Delfine S, Fabbian R, Ghignone S, Pinelli P, Sergeto R, Loreto F, Cozzolino S, Perotto S. 2006.** Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* **15** (2): 491-504.
- Gryndler M a kol. 2004.** *Mykorhizní symbióza – O soužití hub s kořeny rostlin*. Academia, Praha.
- Hadley G. 1984.** Uptake of  $^{14}\text{C}$  glucose by asymbiotic and mycorrhizal protocorms. *New Phytologist* **96**: 263-273.
- Hadley G, Williamson B. 1971.** Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* **70** (3): 445-455.
- Holub J, Procházka F. 2000:** Red List of Vascular plants of the Czech Republic. *Preslia* **72**: 187-230.
- Hultén E, Fries M. 1986.** *Atlas of North European vascular plants north of the tropic of cancer*. Königs Stein.
- Chytrý M, Rafajová M. 2003.** Czech National Phytosociological Database: basic statistics of the available vegetation-plot data. *Preslia* **75** (1): 1-15.
- Imhof S. 1997.** Root anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Voyria tenella* Hook (Gentianaceae). *Botanica Acta* **110** (4): 298-305.
- Imhof S. 1999.** Anatomy and mycotrophy of the achlorophyllous *Afrothismia winkleri*. *New Phytologist* **144** (3): 533-540.
- Imhof S. 2003.** A dorsiventral mycorrhizal root in the achlorophyllous *Sciaphila polygyna* (Triuridaceae). *Mycorrhiza* **13** (6): 327-332.
- Jain SK. 1976.** The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **7**, 469-495.
- Jatiová M, Šmiták J. 1996.** *Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a ve Slezsku*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Brno.
- Jersáková J, Kindlmann P. 2004.** *Zásady péče o orchidejová stanoviště*. Kopp, České Budějovice.
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA. 2005.** Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639-653.
- Jumpponen A. 2001.** Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11** (4): 207-211.
- Jumpponen A, Trappe JM. 1998.** Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140** (2): 295-310.
- Kincl M, Faustus Z. 1977.** *Základy fyziologie rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.



- Kottke I, Nebel M. 2005. The evolution of mycorrhiza-like associations in liverworts: an update. *New Phytologist* **167** (2): 330-334.
- Leake JR. 1994. The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytologist* **127** (2): 171-216.
- Leake JR. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **7** (4): 422-428.
- Lepš J, Šmilauer P. 2003. *Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO*. Cambridge university Press.
- Light MHS, MacConaill M. 2006. Appearance and disappearance of a weedy orchid, *Epipactis helleborine*. *Folia Geobotanica* **41** (1): 77-93.
- Lucke E. 1981. Samenstruktur und Samenkeimung europäischer Orchideen nach VEYRET sowie weitere Untersuchungen (Teil 1). *Orhidee (Hamburg)* **32**: 182-188.
- McCormick MK, Whigham DF, O'Neill J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist* **163**: 425-438.
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **145** (3): 523-537.
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytologist* **154** (1): 233-247.
- Meusel H, Jäger E, Rauschert S, Weinert E. 1978. *Vergleichende Chronologie der zentraleuropäischen Flora*. Jena.
- Neville J, Tessier JL, Morrison I, Scarratt J, Canning B, Klinoromos JN. 2002. Soil depth distribution of ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus tremuloides* within a 3-year-old boreal forest clear-cut. *Applied Soil Ecology* **19** (3): 209-216.
- Nováková M, Rydlo J. 1978. *Epipactis albensis* – nový autogamický druh z okruhu *Epipactis helleborine* agg. (Orchidaceae). *Preslia* **50**: 161-171.
- Procházka F. 1980. *Naše orchideje*. Krajské muzeum Pardubice.
- R Core Development Team. 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, <http://www.R-project.org>.
- Rasmussen HN. 1992. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae), requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum* **86** (1): 161-167.
- Rasmussen HN. 1995. *Terrestrial Orchids - From Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press.
- Rasmussen HN. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and soil* **244**: 149-163.
- Rasmussen HN, Whigham DF. 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany*. **80**(12): 1374-1378.
- Read DJ, Duckett JG, Francis R, Ligrone R, Russell A. 2000. Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*. **355** (1398): 815-830.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289** (5486): 1920-1921.

- Reissek S. 1847.** Über Endophyten der Pflanzenzelle, eine gesetzmässige den Samenfadern oder beweglichen Spiralfasern analoge Erscheinung. *Naturwissenschaft Abhandlungen* **1**: 31-46. [non vidi]
- Rydlo J. 1989.** Poznámky k rozšíření a ekologii některých druhů rodu *Epipactis*. *Muzeum a současnost, Roztoky, řada přírodovědná*. **3**: 5-33.
- Rydlo J. 1994.** Fenologická pozorování kruštic *Epipactis purpurata*, *E. albensis* a *E. helleborine* v Libickém luhu. *Muzeum a současnost, Roztoky, řada přírodovědná*. **8**: 47-59.
- Rydlo J. 1995.** Dlouhodobá pozorování populace *Epipactis albensis* na trvalé ploše v Libickém luhu. *Muzeum a současnost, Roztoky, řada přírodovědná*. **9**: 81-95.
- Rydlo J. 1997.** Poznámky k využití výsledků výzkumu ohroženého druhu *Epipactis albensis* k záchraně druhu. In: Kindlmann P, Jersáková J, Balounová Z. [eds]: *Populační dynamika a ekologie terrestrických orchidejí*, p. 17-20, Biologická fakulta Jihočeské university, České Budějovice.
- Salmia A. 1986.** Chlorophyll-free form of *Epipactis helleborine* (Orchideaceae) in SE Finland. *Annales Botanici Fennici* **23**: 49-57.
- Salmia A. 1988.** Endomycorrhizal fungus in chlorophyll-free and green forms of the terrestrial orchid *Epipactis helleborine*. *Karstenia* **28**: 3-18.
- Salmia A. 1989.** Features of endomycorrhizal infection of chlorophyll-free and green forms of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Annales Botanici Fennici* **26**: 15-26.
- Selosse MA, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004.** Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* **47**: 416-426.
- Selosse MA, Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* **13** (1): 15-20.
- Selosse MA, Weiss M, Jany JL, Tillier A. 2002.** Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* **11** (9): 1831-1844.
- Smith SE. 1967.** Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist* **66**: 371-378. [non vidi]
- Smith SE, Read DJ. 1997.** *Mycorrhizal Symbiosis*, 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press, London.
- Smreciu EA, Currah RS. 1989.** Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana* (1): 6-15.
- StatSoft, Inc. 2001.** STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- Taylor DL, Bruns TD. 1997.** Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (9): 4510-4515.
- Taylor DL, Bruns TD. 1999.** Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* **8** (10): 1719-1732.
- Taylor DL, Bruns TD, Hodges SA. 2004.** Evidence for mycorrhizal races in a cheating orchid. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **271** (1534): 35-43.

- Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ. 2002.** Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: van der Heijden MGA, Sanders IR [eds.], *Mycorrhizal Ecology*, p. 375-414, Springer-Verlag, Berlin.
- Taylor DL, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA. 2003.** Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany* **90** (8): 1168-1179.
- ter Braak CJF, Šmilauer P. 2002.** Canoco reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaka.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 2005.** Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* **84** (1): 1-54.
- van der Kinderen G. 1995a.** A method for the study of field germinated seeds of terrestrial orchids. *Lindleyana*. **10**(2): 68-73.
- van der Kinderen G. 1995b.** Observations on *in situ* germination of *Epipactis helleborine* (L.) Crantz. *Lindleyana* **10**(4): 223-231.
- van Waes J. 1984.** *In vitro* studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideën. PhD thesis, Gent and Meise. [non vidi]
- van Waes JM, Debergh PC. 1986a.** 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.
- van Waes JM, Debergh PC. 1986b.** *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* **67**: 253-261.
- Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M. 2005.** An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum* **125**: 393-404.
- Voigt T. 1991.** Untersuchung der Mycorrhiza und Samenkeimung von Orchideen aus der Gattung *Epipactis* Zinn. *Orchidee (Hamburg)* **42**(5): 270-272.
- Vohník M, Albrechtová J, Vosátka M. 2005.** The inoculation with *Oidiodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake, foliar C : N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron* cv. *Azurro*. *Symbiosis* **40** (2): 87-96.
- Vujanovic V, St-Arnaud M, Barabe D. 2000.** *Phialocephala victorinii* sp nov., endophyte of *Cypripedium parviflorum*. *Mycologia* **92** (3): 571-576.
- Wahrlich W. 1886.** Beiträge zur kenntnis der Orchideen Wurzelpilze. *Botanische Zeitung* **44**: 480-488. [non vidi]
- Warcup JH. 1981.** The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New Phytologist* **87**: 371-381.
- Weiss M, Selosse MA, Rexer KH, Urban A, Oberwinkler F. 2004.** Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential *Mycological research* **108**(9): 1003-1010.
- Yamato M. 2001.** Identification of a mycorrhizal fungus in the roots of achlorophyllous *Sciaphila tosaensis* Makino (Triuridaceae) *Mycorrhiza* **11** (2): 83-88.
- Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL. 2000.** Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* **156** (2): 145-150

**Yokoyama J, Fukuda T, Tsukaya H. 2005.** Molecular identification of the mycorrhizal fungi of the epiparasitic plant *Monotropastrum humile* var. *glaberrimum* (Ericaceae). *Journal of Plant Research* **118** (1): 53-56.

**Zelmer CD, Cuthbertson L, Currah RS. 1996.** Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience* **37**: 439-448.

## Příloha 1

### Vegetační snímky lokalit výsevu

**1. lokalita Alb:** otevřená topolová alej v komplexu lužních lesů asi 1,4 km JZ kostela v obci Libice nad Cidlinou (okres Nymburk, Středočeský kraj); 21. 8. 2005; exp. 5° J; 50° 07' 23" s.š., 15° 09' 38" v.d., 5m x 8m, Braun-Blanquetova devítičlenná stupnice.

E<sub>3</sub>: 60%, *Populus x canadensis* 3, *Acer platanoides* 2a, *Acer campestre* r, *Fraxinus excelsior* r  
E<sub>1</sub>: 95%, *Acer platanoides* juv. +, *Fraxinus excelsior* juv. r, *Arrhenatherum elatius* 3, *Cirsium arvense* 2a, *Dactylis glomerata* 2a, *Geranium pratense* 2a, *Anthriscus sylvestris* 1, *Arctium* sp. 1, *Artemisia vulgaris* 1, *Galium album* s. lat. 1, *Geum urbanum* 1, *Pimpinella major* 1, *Plantago major* 1, *Potentilla reptans* 1, *Ranunculus repens* 1, *Sanguisorba officinalis* 1, *Vicia sepium* 1, *Viola riviniana* 1, *Cirsium canum* +, ***Epipactis albensis*** +, *Fallopia convolvulus* +, *Lamium album* +, *Urtica dioica* +, *Tragopogon orientalis* r

**2. lokalita Atr:** opuštěný vápencový lom asi 0,5 km SZ kostela v obci Čepice (okres Klatovy, Plzeňský kraj); 26. 8. 2005; exp. 0°; 49° 16' 09" s.š., 13° 35' 20" v.d., 7m x 7m, Braun-Blanquetova devítičlenná stupnice.

E<sub>2</sub>: 10%, *Pinus sylvestris* 2a, *Populus tremula* +

E<sub>1</sub>: 60%, *Pinus sylvestris* juv. 1, *Populus tremula* juv. 1, *Cornus sanguinea* juv. +, *Quercus robur* juv. +, *Calamagrostis epigejos* 2a, *Coronilla varia* 1, ***Epipactis atrorubens*** 1, *Euphrasia* sp. 1, *Hieracium pilosella* 1, *Lotus corniculatus* 1, *Lychnis viscaria* 1, *Melampyrum pratense* 1, *Melilotus albus* 1, *Ononis repens* 1, *Potentilla heptaphylla* agg. 1, *Achillea* sp. +, *Anthyllis vulneraria* +, *Fragaria vesca* +, *Linum catharticum* +, *Polygala comosa* +, *Rubus* sp. +, *Sanguisorba minor* +, *Scabiosa canescens* +, *Thymus pulegioides* +, *Carex pilulifera* r, *Carlina vulgaris* r, *Galium pumilum* r, *Heracleum sphondylium* r, *Medicago lupulina* r, *Taraxacum* sect. *Ruderalia* r

**3. lokalita HMi:** stinný kulturní les asi 1,6 km JV kostela v obci Milovice (okres Břeclav, Jihomoravský kraj); 21. 8. 2005; exp. 0°; 48° 50' 36" s.š., 16° 42' 52" v.d.; 8m x 8m; Braun-Blanquetova devítičlenná stupnice.

E<sub>3</sub>: 80%, *Tilia cordata* 3

E<sub>2</sub>: 5%, *Tilia cordata* +

E<sub>1</sub>: 30%, *Tilia cordata* juv. 2a, *Acer pseudoplatanus* juv. 1, *Fraxinus excelsior* juv. 1, *Ligustrum vulgare* juv. 1, *Acer campestre* juv. +, *Acer platanoides* juv. +, *Cornus sanguinea* juv. +, *Prunus avium* juv. +, *Carpinus betulus* juv. r, *Quercus robur* juv. r, *Alliaria petiolata* 2a, *Dactylis glomerata* agg. 2a, *Asarum europaeum* 1, *Chaerophyllum temulum* 1, *Clematis vitalba* 1, *Fragaria* sp. 1, *Geum urbanum* 1, *Pulmonaria officinalis* agg. 1, *Bromus* sp. +, ***Epipactis helleborine*** +, *Poa nemoralis* agg. +, *Cephalanthera damasonium* r

**4. lokalita HLe:** otevřená topolová alej v komplexu lužních lesů asi 1,5 km V kostela v obci Lednice (okres Břeclav, Jihomoravský kraj); 24. 4. 2005; exp. 2° JJV; 48° 47' 55" s.š., 16° 49' 08" v.d.; 5m x 8m; Braun-Blanquetova devítičlenná stupnice.

E<sub>3</sub>: 60%, *Populus x canadensis* 3

E<sub>2</sub>: 10%, *Prunus avium* +, *Cornus sanguinea* r

E<sub>1</sub>: 75%, *Acer campestre* juv. +, *Holcus lanatus* 2b, *Carex acutiformis* 2a, *Festuca rubra* 2a, *Galium album* s. lat. 2a, *Poa pratensis* 2a, ***Epipactis helleborine*** 1, *Geranium pratense* 1, *Achillea millefolium* agg. 1, *Ajuga reptans* 1, *Centaurea jacea* 1, *Colchicum autumnale* 1, *Galium boreale* 1, *Glechoma hederacea* 1, *Pastinaca sativa* 1, *Veronica persica* 1,

\**Cephalanthera damasonium* +, *Anthriscus sylvestris* +, *Potentilla reptans* +, *Fragaria viridis* +, *Lathyrus pratensis* +, *Ranunculus acris* +, *Vicia cracca* +

\*na lokalitě se vyskytuje až od června

**5. lokalita HKU:** světlý suchý les na vápenitém podloží asi 3 km VVJ kostela v obci Kamenný Újezd (okres České Budějovice, Jihočeský kraj); 1. 5. 2005; exp. 0°; 48° 53' 41" s.š., 14° 24' 41" v.d.; 8m x 8m; Braun-Blanquetova devítičlenná stupnice.

E<sub>3</sub>: 65%, *Picea abies* 4, *Pinus sylvestris* 1

E<sub>2</sub>: 40%, *Corylus avellana* 3, *Daphne mezereum* 1, *Rubus idaeus* 1

E<sub>1</sub>: 30%, *Picea abies* juv. 1, *Pinus sylvestris* juv. +, *Rosa rugosa* juv. +, *Sorbus aucuparia* juv. +, *Mercurialis perennis* 2b, *Convallaria majalis* 2a, *Hieracium lachenalii* 2a, *Aquilegia vulgaris* 1, *Campanula trachelium* 1, *Cardaminopsis arenosa* 1, *Carex digitata* 1, \****Epipactis helleborine* 1**, *Hedera helix* 1, *Lathyrus vernus* 1, *Rubus idaeus* 1, *Taraxacum* sect. *Ruderalia* 1, *Euphorbia cyparissias* +, *Fragaria* sp. +, *Hepatica nobilis* +, *Trifolium repens* +, *Astragalus glycyphyllos* r

\*na lokalitě se vyskytuje až od června

**6. lokalita PMi:** stinný okraj dubohabřiny asi 2 km JJZ kostela v obci Milovice (okres Břeclav, Jihomoravský kraj); 24. 4. 2005; exp. 3° JV; 48° 50' 12" s.š., 16° 41' 22" v.d.; 10m x 10m; Braun-Blanquetova devítičlenná stupnice.

E<sub>3</sub>: 80%, *Carpinus betulus* 4, *Populus tremula* 2a, *Tilia cordata* 1

E<sub>2</sub>: 15%, *Tilia cordata* 2a, *Corylus avellana* +

E<sub>1</sub>: 25%, *Acer campestre* juv. r, *Anemone ranunculoides* 2a, *Ficaria bulbifera* 2a, *Galium odoratum* 2a, *Alliaria petiolata* 1, *Asarum europaeum* 1, *Campanula* sp. 1, *Convallaria majalis* 1, *Dactylis polygama* 1, \****Epipactis purpurata* 1**, *Heracleum sphondylium* 1, *Galium schultesii* 1, *Polygonatum multiflorum* 1, *Carex pilosa* +, *Isopyrum thalictroides* +, *Lathyrus vernus* +, *Lilium martagon* +, *Pulmonaria officinalis* agg. +, *Viola reichenbachiana* +, *Cardamine flexuosa* r, *Moehringia trinervia* r

\*na lokalitě se vyskytuje až od června

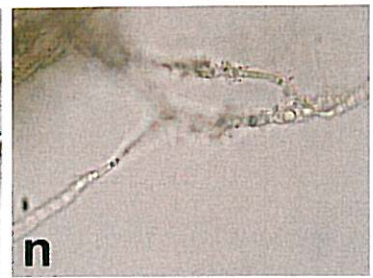
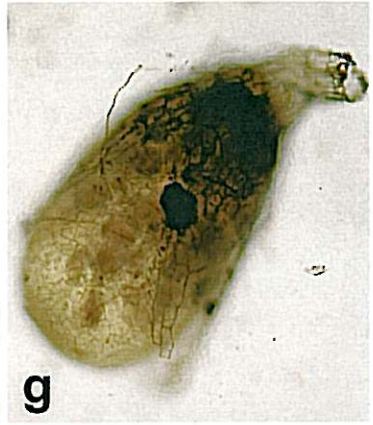
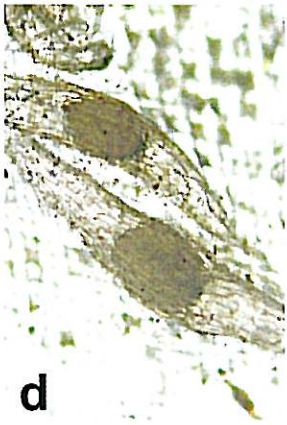
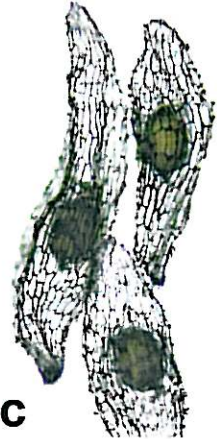
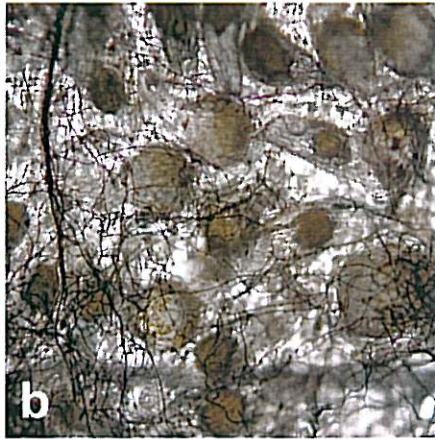
**7. lokalita PPe:** stinná dubohabřina karpatského typu asi 2,5 km JJZ kostela v obci Brno-Bystrc (okres Brno-venkov, Jihomoravský kraj); 16. 9. 2005; exp. 6° JV; 49° 12' 46" s.š., 16° 31' 09" v.d.; 10m x 10m; Braun-Blanquetova devítičlenná stupnice.

E<sub>3</sub>: 97%, *Tilia cordata* 3, *Carpinus betulus* 2b, *Populus tremula* 2b

E<sub>1</sub>: 80%, *Tilia cordata* juv. 1, *Acer pseudoplatanus* juv. +, *Populus tremula* juv. +, *Quercus robur* juv. r, *Carex pilosa* 4, *Asarum europaeum* 2a, *Galium sylvaticum* 2a, *Hepatica nobilis* 1, *Lathyrus vernus* 1, *Pulmonaria obscura* 1, *Viola reichenbachiana* 1, *Campanula trachelium* +, ***Epipactis purpurata* +**, *Galeobdolon* sp. +, *Maianthemum bifolium* +, *Polygonatum multiflorum* +, *Stellaria holostea* +, *Dactylis polygama* r, *Euphorbia amygdaloides* r, *Neottia nidus-avis* r

**Příloha 2**

Fotodokumentace





## Tabule 2

- a) Kořenový systém dospělých rostlin kruštíků – vlevo *E. atrorubens* (z Čepice), vpravo *E. helleborine* (z Kamenného Újezda); na kořenovém systému *E. atrorubens* jsou dobře patrné tmavé houbou silně kolonizované kořeny a světlé kořeny bez houbové kolonizace.
- b) Podélný řez kořenem *E. atrorubens*; v kořeni jsou vidět charakteristická klubička tvořená houbou rodu *Wilcoxina*.
- c) Příčný řez kořenem *E. atrorubens*.
- d) Příčný řez kořenem *E. albensis*.
- e) Příčný řez kořenem *E. helleborine* (z Kamenného Újezda).
- f) Detail pelotonů v kořeni *E. helleborine* (z Lednice).
- g) Strávené pelotony v kořeni *E. purpurata*; v buňkách jsou patrná hypertrofní jádra rostlinných buněk.
- h) Mykobiont v kořeni *E. purpurata*.
- i) Tmavá sterilní mycelia (DSE) v nabarveném kořenu *E. purpurata*.
- j) Tmavá sterilní mycelia (DSE) v nabarveném kořenu *E. purpurata*; detail mikrosklerocií.
- k) Tmavá sterilní mycelia (DSE) v nabarveném kořenu *E. purpurata*; hyfy s kulovitými zelenými útvary v jednotlivých buňkách.

