

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní obor: 4106T026 / Biologie a ochrana zájmových
organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Liší se klíčivost vybraných druhů vstavačovitých rostlin
na přirozených a obnovených loukách?

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jana Jersáková, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce: RNDr. Tamara Těšitelová, Ph.D.

Ing. Zuzana Balounová, Ph.D.

Autor: Bc. Pavel Sucháček

České Budějovice, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to- v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 30. listopadu 2015

.....
Pavel Sucháček

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce Janě Jersákové a konzultantce Tamaře Těšitelové za výraznou pomoc při sestavování textu, statistických ale také molekulárních analýzách. Svými velmi cennými radami a nezměrnou trpělivostí pak významnou měrou přispěly k úrovni celé práce. Děkuji také Tereze Holicové za pomoc při terénních pracích a následném vyhodnocování v laboratorním prostředí. Poděkování směřuji také Alence Bartoňové, která mi byla po celou dobu psaní významnou oporou, svými ověřenými postupy mě také přiměla práci dokončit, vydržela poslouchat mé stížnosti a v neposlední řadě se také zasadila na čtivosti mých textů. Své drahé sestře Tereze děkuji za konečnou gramatickou korekci. V neposlední řadě patří zvláštní poděkování také Správě chráněné krajinné oblasti Bílé Karpaty a především Ivaně Jongepierové a Karlu Fajmonovi, bez kterých by projekt nevznikl.

Abstrakt

Práce se zabývá klíčivostí 6 druhů orchidejí na území chráněné krajinné oblasti Bílé Karpaty, konkrétně druhů *Platanthera bifolia*, *Neottia ovata*, *Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea subsp. conopsea*, *Traunsteinera globosa* a *Orchis militaris*, a to na různě starých obnovených loukách. Jako kontrola sloužily NPR Zahrady pod Hájem a Čertoryje. U všech druhů bylo zjištěno počáteční stádium klíčení (nabobtnalé embryo s rhizoidy), a to na obnovených plochách i kontrolních plochách. Pokročilé stádium klíčení (mykorhizní stav semene - protokorm) bylo na obnovených loukách zaznamenáno u tří druhů (GC, NO, PB), na kontrolních plochách byly protokormy zaznamenány u všech druhů. Dalším cílem bylo pomocí molekulárních metod identifikovat, s jakými mykorhizními houbami se tyto modelové druhy pojí.

Klíčová slova: klíčivost orchidejí, Orchidaceae, Bílé Karpaty, obnovené louky, terestrické orchideje

Abstract

The survey presented in this thesis focused on germination of six orchid species in the Protected landscape area White Carpathians; specifically *Platanthera bifolia*, *Neottia ovata*, *Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea subsp. conopsea*, *Traunsteinera globosa*, *Orchis militaris* on restored meadows of various age. As the control, two National Protected Areas (Zahrady pod Hájem and Čertoryje) were used. The initial stage of germination was detected on both restored and control meadows. The advanced stage of germination (protocorm) was recorded in three species (GC, NO, PB) on restored meadows, and in all species on kontrol meadows. The other aim of the thesis was to determine via molecular methods, which species of mycorrhizal fungi are associated with the model orchid species.

Key words: seeds germination, Orchidaceae, White Carpathians, restored meadows, mycorrhiza, terrestrial orchid

Seznam zkratk

AP	<i>Anacamptis pyramidalis</i>
GC	<i>Gymnadenia conopsea</i> subsp. <i>conopsea</i>
PB	<i>Platanthera bifolia</i>
TG	<i>Traunsteinera globosa</i>
OMi	<i>Orchis militaris</i>
NO	<i>Neottia ovata</i>
SCHKO BK	Správa chráněné krajinné oblasti Bílé Karpaty
NPR	Národní přírodní rezervace
MH	mykoheterotrofie
MX	mixotrofie
ECM	ektomykorhiza

Obsah

1. LITERÁRNÍ ÚVOD	9
1.1 Úvod	9
1.2 Orchideoidní mykorhizní symbióza	9
1.3 Spektrum houbových symbiontů u vstavačovitých rostlin.....	11
1.4 Další aspekty ovlivňující klíčení orchidejových semen	12
1.4.1 Abiotické faktory	12
1.4.2 Biotické faktory.....	13
1.5 Biotopy vstavačovitých rostlin	13
1.6 Biotop bělokarpatských luk.....	14
1.7 Obnova druhově bohatých luk v Bílých Karpatech.	15
1.8 Cíl práce	16
2. METODIKA	16
2.1 Charakteristika zájmové skupiny	16
2.1.1 <i>Anacamptis pyramidalis</i> (L.) L. C. M. RICH. – rudohlávek jehlancovitý	16
2.1.2 <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) r. BR. – pětiprstka žežulník	17
2.1.3 <i>Orchis militaris</i> (L.) – vstavač vojenský.....	18
2.1.4 <i>Traunsteinera globosa</i> (L.) Reichenb. – hlavinka horská.....	19
2.1.5 <i>Neottia ovata</i> (L.) R. BR. – bradáček vejčitý.....	19
2.1.6 <i>Platanthera bifolia</i> (L.) L. C. M. RICH. – vemeník dvoulistý	20
2.2 Pokusné plochy.....	20
2.2.1 Obnovené louky	21
2.2.2 Kontrolní louky	22
2.3 Sběr semen	23
2.4 Výsev semen.....	24
2.5 Uspořádání pokusu	25
2.5.1 Sazení na obnovených loukách	25
2.5.2 Sazení na kontrolních loukách	26
2.6 Hodnocení klíčivosti semen	27
2.7 Molekulární analýza mykorhizních hub v protokormech	28
2.8 Molekulární analýza mykorhizních hub v kořenech rostlin	28
2.9 Molekulární identifikace hub	28
2.10 Statistické zpracování dat.....	30

3.	VÝSLEDKY	31
3.1	Průběh klíčení a analýza houbových symbiontů u jednotlivých druhů.	31
3.1.1	<i>Anacamptis pyramidalis</i>	31
3.1.2	<i>Gymnadenia conopsea</i> subsp. <i>conopsea</i>	34
3.1.3	<i>Orchis militaris</i>	37
3.1.4	<i>Traunsteinera globosa</i>	41
3.1.5	<i>Neottia ovata</i>	44
3.1.6	<i>Platanthera bifolia</i>	46
4.	DISKUZE.....	49
4.1	Průběh klíčení na obnovených a kontrolních loukách.....	49
4.2	Průběh klíčení na obnovených loukách různého stáří	52
4.3	Mykorhizní asociace studovaných druhů	52
5.	ZÁVĚR	53
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
7.	PŘÍLOHY	64

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1 Úvod

Klíčení semen je jedna z nejkritičtějších fází v životě vstavačovitých rostlin. Na přežití semen a schopnosti vyklíčit má vliv mnoho biotických a abiotických faktorů (Rasmussen *et al.*, 2015). V případě orchidejí se za nejdůležitější faktor klíčení semen v přírodních podmínkách považuje spojení s houbou, tzv. mykorhizní symbióza.

Mykorhizní symbióza čili soužití houby s kořeny vyšších rostlin je v přírodě velmi rozšířený fenomén (Cribb *et al.*, 2003). Uvádí se, že téměř 90 % všech vyšších rostlin vytvářejí mykorhizní symbiózu (Selosse & Le Tacon, 1998, Wang & Qiu, 2006). U vyšších rostlin rozeznáváme několik typů mykorhiz podle způsobu pronikání houby do kořene rostliny. Jde o ektomykorhizu (ECM), kdy jsou houbové hyfy omezeny pouze na prostory intercelulární (mezibuněčné), a endomykorhizu, kdy houbové hyfy pronikají do vnitřního prostoru buněk hostitelova kořene. V rámci endomykorhiz dále rozeznáváme arbuskulární mykorhizní symbiózu, erikoidní mykorhizní symbiózu a orchideoidní mykorhizní symbiózu. Pro úplnost je dobré zmínit i přechod mezi dvěma výše zmíněnými, a to ektendomykorhizu (houbové hyfy penetrují pouze do kořenové pokožky nebo kůry), která se dále dělí na arbutoidní mykorhizní symbiózu a monotropoidní mykorhizní symbiózu (Gryndler *et al.*, 2004). Pro účely této práce se budu dále zabývat pouze orchideoidní mykorhizou (viz kapitola níže).

Obecně lze říci, že mykorhizní symbiózu můžeme popsat jako mutualistický vztah přinášející prospěch oběma organismům (Bidartondo, 2005). Houba poskytuje rostlině vodu a minerální látky a rostlina na oplátku poskytuje asimiláty (Smith & Read, 2008). Tento model platí však velmi obecně. Metaanalýza Mercxe & Freudensteina (2010) uvádí 450 druhů rostlin náležících do různých čeledí, které od houby získávají také uhlík a tím se stávají parazity. Leake (1994) popsal tento způsob obživy jako mykoheterotrofii.

1.2 Orchideoidní mykorhizní symbióza

Čeď vstavačovitých je jednou z největších čeledí v říši rostlin (Cribb *et al.*, 2003). Joppa *et al.* (2011) uvádí, že doposud bylo popsáno více než 26 tisíc druhů této čeledi. Je to také ekonomicky významná a zároveň velmi ohrožená skupina rostlin.

Není tedy divu, že tyto okolnosti vedly nejen ke komerčním a ochranářským snahám o pěstování vstavačovitých rostlin, ale i k širokému zájmu vědeckých pracovišť objasňujících otázky spojené s mykorhizou.

Typickou vlastností pro čeled' vstavačovitých jsou jejich velmi drobná semena, která neobsahují téměř žádné zásobní látky (Hashimoto *et al.*, 2012). Pro vyklíčení jsou tedy závislé na „externím“ zdroji energie, a to na mykorhizní houbě, která jim poskytuje vodu, živiny a uhlíkaté látky (Rasmussen, 1995; Pridgeon *et al.*, 1999). Pro jedince této čeledi je soužití s mykorhizními houbami důležitým faktorem, bez kterého nemůžou v přírodních podmínkách přežít (Gryndler, 2004). Orchideje vytváří vlastní typ endomykorhizy, který se nazývá orchideoidní mykorhiza (OM) (Rasmussen, 2009).

Charakteristickým útvarem OM jsou pelotony, neboli houbové smotky, které se nacházejí ve všech ontogenetických stádiích rostliny. Vyskytují se jak u klíčících rostlin, tak u dospělých jedinců. Pelotony zastávají funkci přenosu živin mezi houbou a rostlinou (Gryndler, 2004).

Pro orchideje je typický útvar zvaný protokorm, který obsahuje houbové hyfy. Protokorm vzniká z klíčícího embrya, v první fázi embrya nabobtná a tvoří se rhizoidy (kořenové vlásky). Po infekci houbou se kulovitý tvar mění na hruškovitý, dochází k polarizaci a rozvoji meristémů pro kořen a prýt. U hlíznatých druhů se nejprve tvoří stolon s první hlízou (Eriksson & Kainulainen, 2011).

Podle způsobu prorůstání hyf a umístění pelotonů byly popsány dva základní morfotypy orchideoidní mykorhizy, tolypofágní a ptyofágní. Prvním typem je tolypofágní forma, která je nejrozšířenější a nacházíme ji jak u protokormů, tak u dospělých rostlin. Druhý typ je tzv. ptyofágní forma, která je mnohem méně rozšířená a je známá pouze u několika nezelených druhů tropických orchidejí. Tolypofágní forma je charakteristická vytvářením pelotonů houbových hyf uvnitř buněk rostliny. Ptyofágní forma také tvoří pelotony, ale oproti tolypofágní formě v mnohem menším množství, a navíc se nacházejí jen v nejsvrchnějších buňkách primární kůry. V hlubších vrstvách primární kůry se již pelotony nevyskytují, jsou zde jen tzv. vchlípené hyfy (Gryndler, 2004).

V určité fázi života spustí rostlina lýzu pelotonů, což je některými autory považováno za mechanismus bránící houbě inhibovat rostlinu (Smith & Read, 2008). Tento mechanismus je nejspíše také důležitým prvkem ve výživě rostliny, kdy z degradovaných pelotonů získává rostlina živiny (Rasmussen & Whigham, 2002).

Další možností může být oboustranný přenos látek přes membránu živých pelotonů, tedy mutualistické soužití (Cameron *et al.*, 2006), a je možné, že celkové zhroucení pelotonů nemusí být způsobeno rostlinnými buňkami, ale naopak se jedná o autolýzu hub samotných, tedy o obnovu přenosových struktur (Gryndler, 2004). Byla také izolována řada fungicidních látek, jako jsou například hircinol a orchinol u rodů *Orchis* a *Himantoglossum* (Gäumann *et al.*, 1960; Fish *et al.*, 1973), které kontrolují rozsah houbové kolonizace (Hu & Huang, 1994).

Dospělé orchideje mohou získávat uhlík třemi způsoby, a to buď (1) autotrofií, kdy je rostlina schopna získávat veškeré uhlíkaté látky fotosyntetickou asimilací přímo ze vzduchu; (2) mixotrofií (MX, částečná mykoheterotrofie), kombinací výživy, kdy rostlina získává část uhlíku z fotosyntézy a část z mykorhizních hub (Selosse & Roy 2009), nebo (3) mykoheterotrofií (MH), kdy je nezelená rostlina zcela závislá na houbové výživě (Leake, 1994). Mixotrofní a mykoheterotrofní druhy rostou často na stanovištích s nižším osvětlením, a skrze mykorhizní houbu tedy kompenzují nedostatek fotosynteticky získaných uhlíkatých látek (Gebauer & Meyer, 2003).

1.3 Spektrum houbových symbiontů u vstavačovitých rostlin

Jeden z prvních autorů, který popsal strukturu pelotonů u OM symbiózy, byl Noel Bernard (1909). Zformoval také první klasifikaci vyizolovaných hub. Zjistil, že většina hub vyizolovaná z pelotonů náleží do skupiny Basidiomycota konkrétně do anamorfního rodu rhizoctonia (*Rhizoctonia mucoroides* a *Rhizoctonia repens* (Bernard 1909). Později byly také vyizolovány další druhy rhizoctonií *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia goodyerae-repentis* (Downie, 1957).

V současné době je zřejmé, že rhizoctonia je polyfyletická skupina. Řadí se do ní tři taxonomicky odlišné skupiny: **Sebacinales**, **Ceratobasidiaceae** a **Tulasnellaceae**. Ekologicky to je velmi různorodá skupina. Některé druhy jsou parazitické (např. Ceratobasidiaceae) a *in vitro* kultury ukazují, že jsou ve skupině zastoupeny i saprotrofické druhy. Ceratobasidiaceae a Tulasnellaceae jsou skupiny hub s nejbohatším zastoupením OM hub (Otero *et al.*, 2007). Většina zástupců z těchto čeledí jsou druhy, které tvoří mykorhizní symbiózu jak s epifyty tropických oblastí, tak s terestrickými orchidejemi lučních biotopů.

Další skupinu tvoří řád Sebacinales, který zahrnuje 2 hlavní skupiny (A a B) lišící se svou ekologií (Weiss *et al.*, 2011). Obě tyto skupiny vytváří mykorhizu

s různými rostlinami a zároveň se nacházejí jako endofyti v kořenech velkého množství rostlinných druhů (Selosse *et al.*, 2009). Skupina B typicky vytváří mykorrhizní symbiózu se zelenými druhy orchidejí a čeledí Ericaceae. Symbionti ze skupiny A jsou ve většině případů ECM houby tvořící symbiózu se stromy, ale můžeme je nalézt také u některých MH orchidejí.

Díky novodobým převážně molekulárním identifikacím houbových symbiontů je současný celkový pohled (Motomura *et al.*, 2010) takový, že převážná většina autotrofních orchidejí se po celém světě pojí se skupinou „rhizoctonia“, ale v tropických oblastech to mohou být i rzi ze skupiny Atractiellomycetes (Kottke *et al.*, 2010, Martos *et al.*, 2012).

Mykoheterotrofní druhy orchidejí tvoří OM převážně s ECM houbami. Velké množství prací naznačuje, že spousta MH druhů orchidejí přijímá uhlík z ECM spojení s autotrofními dřevinami, a to jak v temperátních oblastech (Selosse *et al.*, 2002, Taylor *et al.*, 2004), tak v tropech (Selosse *et al.*, 2009). Mezi ECM houby tvořící symbiózu s orchidejemi patří především zástupci stopkovýtrusných hub (Basidiomycota) - *Lactarius* (Okayama *et al.*, 2012), *Russula* (Girlanda *et al.*, 2011, Těšitelová *et al.*, 2012), *Cortinarius* (Selosse *et al.*, 2004, Julou *et al.*, 2005), *Inocybe* (Těšitelová *et al.*, 2012, Liebel & Gebauer, 2010), *Hymenogaster* (Těšitelová *et al.*, 2012), *Hebeloma* (Liebel & Gebauer, 2010); a vřeckovýtrusných hub (Ascomycota) - *Peziza* (Dearnaley *et al.*, 2012), *Tuber* (Těšitelová *et al.*, 2012; Selosse *et al.*, 2004), *Wilcoxina* (Těšitelová *et al.*, 2012; Ogura-Tsujita & Yukawa, 2008).

Mezičlánkem mezi autotrofií a heterotrofií jsou mixotrofní orchideje, které jsou považovány za evoluční mezistupeň k plné mykoheterotrofií. Tyto orchideje jsou velmi zřídka specifické, vytvářejí symbiózu s podobnými druhy ECM hub jako MH orchideje (Okayama *et al.*, 2012).

1.4 Další aspekty ovlivňující klíčení orchidejových semen

1.4.1 Abiotické faktory

Klíčivost orchidejí není proces striktně závislý na mykorrhize, roli zde hrají i další faktory prostředí. Teplota a vlhkost se mohou měnit během sezóny a u některých druhů tak otevírat pouze krátký časový úsek mezi zráním semen a ztrátou životaschopnosti, kdy mohou rostliny vyklíčit (Batty *et al.*, 2001). Klíčivost semen tak musí být během roku synchronizována. Pokud jsou semena dlouhověká, k synchronizaci klíčivosti nedochází. Nároky na teplotní a vlhkostní podmínky budou

pravděpodobně stejné u stejných životních forem a na stejných biotopech (Rasmussen *et al.*, 2015). Vlhkost substrátu může mít pozitivní vliv na klíčivost, ale není známo, zda přímo na semena či nepřímo na houbového symbionta (Scott & Carey, 2002; Diez, 2007).

Světlo může působit jako inhibující faktor (Dutra *et al.*, 2009; Vasudevan & Van Staden, 2010). Před klíčením je důležité, aby semeno mělo dostatečný čas na zatáhnutí do substrátu a uniklo tak vyschnutí a získalo optimální teplotní podmínky. *In vitro* studie ukazují, že fotosynteticky aktivní záření napomáhá vývoji fotosyntetizujících struktur, ale naopak potlačuje vývoj mykotrofních tkání (Zettler *et al.*, 2007).

Důležitá může být i struktura půdy, která ovlivňuje schopnost semen se dostat do požadované hloubky (Wright *et al.*, 2007) či schopnost šíření houbových mycélií (Otten *et al.*, 2001). Při pokusech byla zjištěna různá míra klíčivosti různě hluboko pod povrchem, optimální se jevílo 10 cm pod povrchem (Van der Kinderen, 1995), což je celkem běžná hloubka, ve které orchideje v přírodě klíčí (Rasmussen, 2011).

1.4.2 Biotické faktory

Semena orchidejí se samozřejmě nenacházejí v přírodě samotné, je zde plno dalších interagujících organismů, které se mohou podílet na klíčivosti, pozitivně i negativně. Negativní vliv mohou mít například predátoři či parazité semen (McCormick *et al.*, 2013) nebo hub, dále kompetitoři o stejný zdroj uhlíku. Nesymbiotické mikroorganismy mohou pomáhat rozložit nepropustné osemení (Barsberg *et al.*, 2013), ale mohou také vyčerpat zdroje semen před vznikem mykorhizy (Zi *et al.*, 2014). Mikroorganismy mohou také ovlivňovat prostředí, jako například dostupnost vody a živin. Roli bude hrát i okolní vegetace, především ve světelné exponovanosti semen a semenáčků, a také bude konkurovat semenu o vodu a živiny (Rasmussen *et al.*, 2015).

1.5 Biotopy vstavačovitých rostlin

Rostliny z čeledi vstavačovitých tvoří nedílnou součást květeny České republiky. Evropskou krajinu tvořila původně dynamicky se měnící mozaika lesů a otevřených stanovišť, která byla udržovaná stády velkých býložravců (Vera, 2000) a požáry či lavinami (Jongepierová *et al.*, 2012). S příchodem člověka byly tyto vlivy nahrazeny lidskou činností, která byla původně extenzivního charakteru a zvyšovala

rozmanitost krajiny (Konvička *et al.*, 2006) a novými biotopy orchidejí se staly louky a pastviny dobytka. Orchideje se tak považují za významné indikátory nepřerušeno tradičního hospodaření (Jersáková & Kindlmann, 2004).

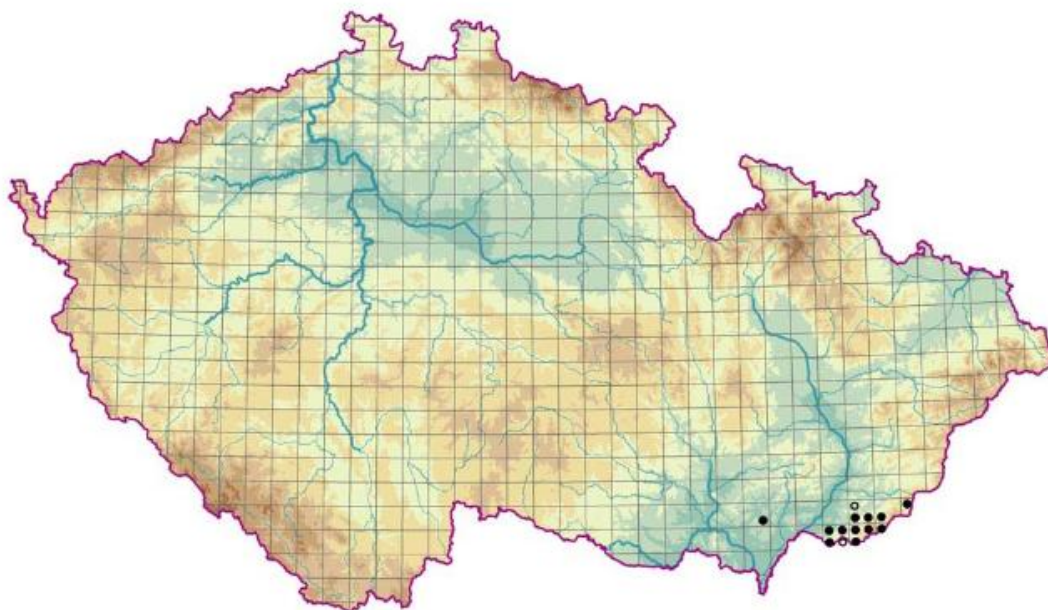
1.6 Biotop bělokarpatských luk

Bělokarpatské louky neboli asociace širokolistých suchých trávníků *Brachypodio pinnati-Molinietum arundinaceae*, jsou zapojená, druhově velmi bohatá luční společenstva (Chytrý *et al.* 2007). Tato společenstva se vyskytují především na moravské straně Bílých Karpat (obr. 1) a to v jihozápadní části pohoří v širším okolí obce Velké nad Veličkou, s přibližnou hranicí obcí Blatnička, Horní Němčí, Radějov a státní hranicí (Tlusták, 1975).

Hlavní složku biomasy zde tvoří směs různých druhů trav, a to nejčastěji porosty válečky prapořité (*Brachypodium pinnatum*), ostřice horské (*Carex montana*), sveřepu vzpřímeného (*Bromus erectus*), kostřavy žlábkaté (*Festuca rupicola*) a bezkolence rákosovitého (*Molinia arundinacea*). Na místech, kde není po delší dobu prováděn management, přistupuje také kakost krvavý (*Geranium sanguineum*) (Chytrý *et al.* 2007). V porostu se vykytují druhy střídavě vlhkých půd (např. *Potentilla alba*, *Betonica officinalis*, *Inula salicina* a *Serratula tinctoria*), druhy typické pro teplomilné doubravy (např. *Primula veris*, *Pyrethrum corymbosum*, *Peucedanum cervaria*), druhy mezofilních luk (např. *Briza media*, *Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata* či *Leucanthemum vulgare* agg.), ale také druhy typické pro suché trávníky (např. *Prunella grandiflora* a *Dianthus carthusianorum*). Mechové patro má malé pokryvnosti s převahou pleurokarpních mechů (Chytrý *et al.* 2007). Na ploše 16–25 m² bělokarpatských luk můžeme pozorovat 60–80 druhů cévnatých rostlin, což je řadí k druhově nejbohatším biotopům Evropy (Klimeš, 1997).

Půdy jsou zpravidla hluboké, vyvinuté na vápnitěm flyši, případně na jílovcích a křídových slínovcích. Díky střídání vrstev propustného pískovce společně s nepropustným jílovcem vzniká lokální zamokřování půdy, které má pouze přechodný sezónní charakter, po němž dochází k opětovnému vysychání. Většinou se zde nachází půdy hlinité nebo jílovité ve spodních vrstvách půdního profilu slehlé. Svrchní horizont půdy je velmi často slabě odvápněný s pH 6,3 – 7,1, kdežto směrem do hloubky půdního profilu roste koncentrace uhličitanu vápenitého a pH (Tlusták, 1972). Ze všech společenstev z třídy *Festuco-Brometea* se *Brachypodio-Molinietum*

vyskytuje v oblastech s největšími srážkami, které mohou dosahovat v ročním úhrnu 650–850 mm (Chytrý *et al.*, 2007).



Obr. 1 Rozšíření asociace *Brachypodium pinnati-Molinietum arundinaceae*. Převzato: Chytrý *et al.* (2007)

1.7 Obnova druhově bohatých luk v Bílých Karpatech.

V minulých padesáti letech byla velká část karpatských luk rozorána. Od devadesátých let 20. století s velkým útlumem intenzivního zemědělství a přechodem mnohých zemědělských subjektů k ekologickému zemědělství postupně dochází k rekultivaci a zatravnování mnohých polností. Rekultivace probíhá buď samovolnou sukcesí, či s využitím jetelotravní směsi, a od roku 1998 také semennými směsmi regionálními (Jongepierová *et al.*, 2008).

Obnova druhově bohatých společenstev je dlouhodobý proces. Mezi důležité faktory pro vývin společenstva patří dostatek diaspor cílových lučních druhů. Klíčové je také množství živin v půdě, které je často tak velké, že jsou žádoucí druhy rostlin vytlačeny konkurenčně schopnějšími plevely (Muller *et al.*, 1998) nebo rychleji rostoucími travinami (Marrs, 1993). Dalším problémem v obnově luk je semenná banka opuštěných polí, ve které převládají semena plevelných druhů, kdežto luční druhy jsou zastoupeny velmi málo, a to jak množstvím semen, tak počtem druhů. Bez zásahu člověka je obnova bělokarpatkých luk velmi pomalá nebo dokonce po určitou dobu zablokovaná, lze ji však výrazně zvýšit výsevem

travinobylinné směsi, získané z lokálních společenstev, které odpovídají daným ekologickým podmínkám (Jongepierová *et al.*, 2012).

Klíčivosti vstavačovitých rostlin na těchto loukách se doposud nikdo nevěnoval, a její znalost by měla dopomoci k doplnění vědomostí o problematice květnatých luk, jak uvádím v kapitolách níže.

1.8 Cíl práce

Tato práce se zabývá klíčovostí šesti druhů orchidejí na území CHKO Bílé Karpaty, konkrétně druhů *Platanthera bifolia*, *Neottia ovata*, *Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea subsp. conopsea*, *Traunsteinera globosa*, *Orchis militaris*. Vzhledem k tomu, že orchideje se na obnovené louky vracejí jen velmi vzácně a mnohé druhy vůbec, bylo mým cílem zjistit, zda jsou vybrané druhy schopné na několika různě dávno obnovených plochách vůbec vyklíčit a je-li tedy splněna podmínka přítomnosti OM hub a vhodných abiotických podmínek i v takto narušených podmínkách. Mezi zkoumané druhy byly vybrány druhy s různou mírou vzácnosti a vázanosti na konkrétní biotopy, a lze tedy očekávat jejich různou klíčovost na narušených stanovištích.

Konkrétní cíle:

- Prozkoumat schopnost klíčení semen na různých obnovených a kontrolních loukách.
- Ověřit klíčovost semen na různě starých obnovených loukách.
- Zjistit, se kterými houbami se druhy pojí na původních a obnovených lokalitách, a zda se liší se spektrum houbových symbiontů u dospělců a protokormů.

2. METODIKA

2.1 Charakteristika zájmové skupiny

2.1.1 *Anacamptis pyramidalis* (L.) L. C. M. RICH. – rudohlávek jehlancovitý
Anacamptis pyramidalis je vytrvalá, 30–50(-60) cm vysoká zelená rostlina se dvěma protáhlými vejcovitými hlízkami s velmi řídkými tenkými kořeny. Lodyha je přímá, v horní části rýhovaná, lysá. Listy jsou vzpřímené čárkovitě kopinaté, světle zelené (Procházka, 1980). Růst nadzemních orgánů začíná v lednu, k tvorbě květů dochází

začátkem června až do konce července, produkce semen začíná v červnu. Opylovači rudohlávkou jsou denní motýli (Jersáková & Kindlmann, 2004).

Studie mykorhizních asociací u druhu *A. pyramidalis* nejsou k dispozici, ale vzhledem k tomu, že se jedná o druh vázaný na luční biotopy, předpokládá se, že se budou pojít s houbami z polyfyletické skupiny rhizoctonia.

Jedná se o druh výslunných a lesostepních, někdy částečně křovinatých strání, luk. Roste na půdách výhřevných, vysýchavých až střídavě vlhkých, vápnitých, humózních, ale i hlinitých (Procházka, 2010).

A. pyramidalis se vyskytuje v Čechách pouze na území Českého krasu. Na Moravě je jeho výskyt doložen pouze v Bílých Karpatech a Vsetínské kotlině. Vyskytuje se zejména v kolinním a suprakolinním stupni, vzácně také vstupuje do montánního stupně (Procházka, 2010). V Bílých Karpatech se druh vyskytuje v jihozápadní části území s nejbohatším výskytem v NPR Čertoryje u Kněždubu (Jongepier & Jongepierová, 2006). V Červeném seznamu patří rudohlávek jehlancovitý ke kriticky ohroženým druhům naší květeny (C1b) (Grulich, 2012).

2.1.2 *Gymnadenia conopsea* (L.) r. BR. – pětiprstka žežulník

V České republice se rozlišují dva základní cytotypy z okruhu *Gymnadenia conopsea* s.l., a to *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea* – pětiprstka žežulník pravá a *Gymnadenia conopsea* subsp. *montana* - pětiprstka žežulník horská (Marhold *et al.*, 2005). V mé práci zmíním pouze *G. conopsea* subsp. *conopsea*, kterou jsem se zabýval.

Gymnadenia conopsea je vytrvalá, (25–)33–62(-80) cm vysoká bylina, s jednou hluboce dvoudílnou hlízou s nečetnými, tenkými kořeny. Lodyha je přímá na bázi se 1-2 zakrnělými šupinovitými pochvatými listy. Listy jsou dvouřadě uspořádané zelené až tmavě zelené (Procházka, 1980). Růst nadzemních orgánů začíná v dubnu, k tvorbě květů dochází začátkem června až do konce července. Produkce semen začíná v červnu. Opylovači pětiprstky žežulníku jsou motýli (můry a lišaji (Jersáková & Kindlmann, 2004).

Gymnadenia conopsea se pojí s mykorhizními houbami z čeledi Tulasnellaceae a Ceratobasidiaceae, dále s houbami z řádu Pezizales (*Peziza*, *Terfezia*, *Morchella*, *Geopyxis*, *Wilcoxina*), Lyophyllaceae, Serpulaceae a Hymenochaetaceae (Těšitelová *et al.*, 2013). Byli nalezeni i endofyti z oddělení

Ascomycota, např. rody *Exophiala*, *Fusarium*, *Leptodontium* a *Tetracladium* (Stark *et al.*, 2009).

Druh roste na suchých i vlhčích loukách, pastvinách, výslunných travnatých a křovinatých stráních, mírně zasahuje i do lesních lemů. Nachází se na půdách kyselých až zásaditých, hlinitých až mírně skeletovitých (Procházka, 2010).

V minulosti se druh *G. conopsea* vyskytoval roztroušeně v termofytiku s hojným výskytem především v podhorských a horských oblastech (Bílé Karpaty, Jeseníky, Beskydy, Krkonoše, Orlické hory, Šumava, Krušné hory, Žďárské vrchy). Od poloviny 20. stol. byl zaznamenán značný úbytek (Procházka, 2010). V Bílých Karpatech je *G. conopsea* velmi častá na květnatých loukách po celé CHKO (Jongepier & Jongepierová, 2006). V Červeném seznamu patří *G. conopsea* k silně ohroženým druhům naší květeny C2t (Grulich, 2012).

2.1.3 *Orchis militaris* (L.) – vstavač vojenský

Orchis militaris je vytrvalá, 20–45 cm vysoká bylina. Hlízy jsou vejcovité až elipsoidní, kořeny krátké a tenké. Lodyha je jemně rýhovaná, světle zelená, listy podlouhlé kopinaté, špičaté, sivozelené (Procházka, 1980). Růst nadzemních orgánů začíná v březnu, k tvorbě květů dochází od května až do půlky července, produkce semen začíná v květnu (tvorba semeníků). Opylovači *O. militaris* jsou blanokřídlý hmyz (včely, čmeláci) (Jersáková & Kindlmann, 2004).

Orchis militaris se pojí s širokým spektrem hub z čeledi Tulasnellaceae a Ceratobasidiaceae (Jacquemyn *et al.*, 2010).

Jedná se o druh travnatých a křovinatých suchých strání, okrajů vinic, světlých lesů, mezofilních luk, slatin. Roste na místech převážně výslunných nebo i mírně zastíněných, ale i antropicky narušených. Vyskytuje se na půdách vlhkých až vysychavých, sprašových i jílovitých, vápnitých, humózních hlubších půdách (Procházka, 2010).

Těžiště výskytu *O. militaris* je na jihovýchodní Moravě, především v Bílých Karpatech a v jihomoravských pahorkatinách. Vzácně se vyskytuje také na střední Moravě v širším okolí Brna a v Českomoravském meziohří, v Čechách mnohem vzácněji. V Bílých Karpatech se *O. militaris* vyskytuje na loukách a pastvinách, roztroušeně po celém území CHKO (Jongepier & Jongepierová, 2006). V Červeném seznamu patří *O. militaris* k silně ohroženým druhům naší květeny C2b (Grulich, 2012).

2.1.4 *Traunsteinera globosa* (L.) Reichenb. – hlavinka horská

Traunsteinera globosa je vytrvalá, 35–70 cm vysoká, sivozelená bylina. Hlízy jsou vejcovité, nečleněné nebo jen mělce rozeklané, kořeny krátké. Lodyha je přímá, rýhovaná, lysá; listy lupenité, střídavé, podlouhlé až podlouhle obkopynaté, na bázi objímavé. Růst nadzemních orgánů začíná v dubnu, k tvorbě květů dochází od května až do července, produkce semen začíná v červnu. Opylovači *T. globosa* jsou dvoukřídlý hmyz a motýli (Jersáková & Kindlmann, 2004).

Studie mykorhizních asociací u druhu *Traunsteinera globosa* nejsou k dispozici, ale vzhledem k tomu, že se jedná o druh vázaný na luční biotopy, předpokládá se, že se bude pojít s houbami z polyfyletické skupiny rhizoctonia.

Traunsteinera globosa se vyskytuje na loukách, lučních prameništích a nivách; na vlhčích, vápenných až slabě kyselých, spíše humózních, kamenitohlinitých půdách (Procházka, 2010).

Druh se vyskytuje roztroušeně až vzácně v karpatské oblasti Moravy, odkud dále proniká do východních, ojediněle až do severozápadních Čech. V Bílých Karpatech se *T. globosa* vyskytuje roztroušeně po celém území CHKO (Jongepier & Jongepierová, 2006). V Červeném seznamu patří *T. globosa* k silně ohroženým druhům naší květeny C2b (Grulich, 2012).

2.1.5 *Neottia ovata* (L.) R. BR. – bradáček vejčitý

Neottia ovata je vytrvalá, (20–)25–60 cm vysoká, světle zelená rostlina s krátkým válcovitým oddenkem s tlustými svazčitými kořeny. Lodyha je přímá, pod listy čtyřhranná. Listy jsou lysé, při bázi šupinovité, v dolní třetině lodyhy se nacházejí obvykle jen dva plně vyvinuté vejčité listy (Procházka, 1980). Růst nadzemních orgánů probíhá od půlky dubna až do půlky května, k tvorbě květů dochází od půlky května až do půlky července, rostlina produkuje semena od začátku června až do půlky srpna. Opylovači bradáčku jsou blanokřídlý hmyz (lumci) a brouci (Jersáková & Kindlmann, 2004). S *N. ovata* se pojí široké spektrum hub ze skupiny rhizoctonia, především Sebacinales, ale i Tulasnellaceae a Ceratobasidiaceae; Těšitelová *et al.*, 2015, Kotlínek *et al.*, 2015), dále Russulaceae, Thelephoraceae, Atheliaceae (Těšitelová *et al.*, 2015).

Jedná se o druh s širokou ekologickou amplitudou. Roste od nížin až do subalpínského stupně; v lučních i lesních ekosystémech, nejčastěji na loukách, lesních lemech, v křovinách, světlých dubohabřinách, na pastvinách a v neposlední řadě také v příkopech cest. Žije na výslunných i stinných stanovištích. Půdy preferuje

čerstvé až vlhké, humózní, živinami bohaté, slabě kyselé až silně zásadité, lehké i těžší (Procházka, 2010).

Neottia ovata je jeden z nejhojnějších druhů vstavačovitých rostlin u nás. Častý je především v severních a severovýchodních Čechách, na Moravě pak především na východě, v jiných oblastech jen roztroušeně až vzácně (Procházka, 2010). V Bílých Karpatech to je velmi častý druh, který se vyskytuje roztroušeně po celém území (Jongepier & Jongepierová, 2006). V Červeném seznamu je bradáček vejčitý označen jako vzácnější druh, který vyžaduje další pozornost (C4a) (Grulich, 2012).

2.1.6 *Platanthera bifolia* (L.) L. C. M. RICH. – vemeník dvoulistý

Platanthera bifolia je vytrvalá, 25–55(–80) cm vysoká, světle zelená bylina. Hlízy jsou vejcovité až řepovitě prodloužené, na konci zúžené v kořenovitý výběžek. Lodyha je přímá, dutá, lysá, rýhovaná. Listy jsou lupenité, vstřícné úzce či široce eliptické až obvejčité. Růst nadzemních orgánů začíná v dubnu, k tvorbě květů dochází od května až do července, produkce semen začíná v červenci. Opylovači *P. bifolia* jsou dvoukřídlý hmyz a motýli (Jersáková & Kindlmann, 2004).

Platanthera bifolia se pojí s houbami rodu *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* a *Sebacina* (Fillepello, et al., 1985) dále s houbami z řádu Cantharellales (*Sistotrema*) a druhem *Leptodontidium orchidicola* z oddělení Ascomycota (Rasmussen, 1995).

Jedná se o druh křovinatých strání, luk, světlých listnatých lesů i lesostepních borů, lesních lemů, vřesovišť a pastvin. Roste na půdách vlhkých, bázemi bohatých kyselých až zásaditých půdách.

Druh se u nás vyskytuje roztroušeně až vzácně, na téměř celém území s absencí ve vyšších polohách (Krušné hory, Krkonoše, Šumava). V Bílých Karpatech se *P. bifolia* vyskytuje roztroušeně po celém území. (Jongepier & Jongepierová, 2006). V Červeném seznamu patří k ohroženým druhům naší květeny C3 (Grulich, 2012).

2.2 Pokusné plochy

Abych zjistil, zda vybrané druhy orchidejí mohou klíčit i na loukách obnovených (zatravněných regionální směsí), byly pro pokus vybrány louky na území obcí Malá Vrbka (pět obnovených luk) a Hrubá Vrbka (pět obnovených luk). Jako kontrolní

louky s výskytem všech cílových druhů orchidejí jsem zvolil dvě národní přírodní rezervace, a to NPR Čertoryje a NPR Zahrady pod Hájem.

2.2.1 Obnovené louky

Pro zjištění klíčivosti šesti druhů z čeledi vstavačovitých (Orchidaceae) bylo vybráno 10 obnovených luk. Komplexy obnovených luk sestávají z uměle zatravněných ploch různého stáří, složení vegetace a půdních vlastností. Dříve byly tyto louky zemědělsky využívány (pěstování kulturních rostlin). Po roce 2000 byly uměle zatravněny regionálními směsmi travin a bylin. Louky jsou jednou za rok sečeny, vždy koncem června.

2.2.1.1 Malá Vrbka - Vojšické louky

Na katastru obce Malá Vrbka (Vojšické louky) bylo vybráno 5 obnovených ploch různého stáří (Tab. I).

Tab. I. Plochy na obnovených loukách u Malé Vrbky.

Plocha č.	Stáří plochy	GPS souřadnice
1.	13	N48 51.915 E17 26.338
2.	11	N48 51.852 E17 26.398
3.	6	N48 51.527 E17 26.623
4.	6	N48 51.568 E17 26.753
5.	14	N48 51.419 E17 26.327

2.2.1.2 Obnovené louky u Hrubé Vrbky

Další obnovené louky se nacházejí u obce Hrubá Vrbka. Zde bylo vybráno 5 výzkumných ploch. Jednotlivé plochy se stářím a zaměřením pomocí GPS souřadnic uvádím v Tab. II.

Tab. II. Plochy na obnovených loukách u Hrubé Vrbky

Plocha č.	Stáří plochy	GPS souřadnice
6.	10	N48 51.053 E17 28.415
7.	8	N48 51.075 E17 28.415
8.	6	N48 51.098 E17 28.368
9.	8	N48 51.383 E17 28.522
10.	6	N48 51.432 E17 28.424

2.2.2 Kontrolní louky

Jako kontrolní louky byly vybrány dvě pro čeled' vstavačovitých velmi bohaté lokality, a to NPR Zahrady pod Hájem a NPR Čertoryje. Na obou kontrolních loukách bylo vybráno po 15 rostlinách od každého zájmového druhu, kde se sázely rámečky se semeny (specifikace viz níže) do těsné blízkosti mateřské rostliny.

2.2.2.1 NPR Zahrady pod Hájem

Národní přírodní rezervace Zahrady pod Hájem představuje pestrou mozaiku bělokarpatských květnatých luk, rozptýlené zeleně, extenzivně obhospodařovaných ovocných sadů, ale také menších polí. Rezervace se nachází na katastrálním území obce Velká nad Veličkou. Rozmezí nadmořských výšek se pohybuje mezi 310–490 m.

Na slínovitých půdách je významná neuzavřená teplomilná vegetace s omanem mečolistým (*Inula ensifolia*), košťavou žlábkatou (*Festuca rupicola*) a ostřicí chabou (*Carex flacca*), vlhčí místa s vyvinutými půdami charakterizují porosty svazu *Cirsio-Brachypodium pinnati* s válečkou prapořitou (*Brachypodium pinnatum*). Místy zde nalezneme i vlhčí svahové bezkolencové louky svazu *Molinion* (Mackovčín *et al.* 2002).

Roste zde řada chráněných a ohrožených druhů, ze zájmové skupiny vstavačovitých (Orchidaceae) to jsou pětiprstka žežulník pravá (*Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea*), vstavač vojenský (*Orchis militaris*), hlavinka horská (*Traunsteinera globosa*), vemeník dvoulistý (*Platanthera bifolia*), rudohlávek jehlancovitý (*Anacamptis pyramidalis*), bradáček vejčitý (*Neottia ovata*), pětiprstka žežulník hustokvětá (*Gymnadenia conopsea* subsp. *densiflora*), vstavač osmahlý (*Neotinea ustulata*), vstavač mužský (*Orchis mascula*), vstavač bledý (*Orchis pallens*), vstavač nachový (*Orchis purpurea*), tořič čmelákovitý (*Ophrys holosericea*), vemeníček zelený (*Dactylorhiza viride*), prstnatec pleťový (*Dactylorhiza incarnata*), okrotice dlouholistá (*Cephalanthera longifolia*), vemeník zelenavý (*Platanthera chlorantha*) (Mackovčín *et al.* 2002).

2.2.2.2 NPR Čertoryje

Národní přírodní rezervace Čertoryje představuje rozsáhlý komplex druhově bohatých bělokarpatských květnatých luk v mozaice s rozptýlenou zelení se

solitárními duby, mokřady, svahovými prameništi a lemovými společenstvy kolem potoků v jihozápadní části CHKO Bílé Karpaty. Rezervace se nachází na katastrálním území obcí Hrubá Vrbka, Kněždub a Tvarožná Lhota.

Převažujícím typem vegetace jsou teplomilné, druhově velmi bohaté louky svazu *Cirsio-Brachypodium pinnati*, v nichž dominuje sveřep vzpřímený (*Bromus erectus*) a válečka prapořitá (*Brachypodium pinnatum*), na vlhčích místech přecházejí ve vegetaci svazu *Molinion* s dominantním bezkolencem rákosovitým (*Molinia arundinacea*).

Na loukách se vyskytuje velké množství vzácných a chráněných druhů, ze zájmové skupiny vstavačovitých (Orchidaceae) to jsou pětiprstka žežulník pravá (*Gymnadenia conopsea subsp. conopsea*), rudohlávek jehlancovitý (*Anacamptis pyramidalis*), vstavač vojenský (*Orchis militaris*), hlavinka horská (*Traunsteinera globosa*), vemeník dvoulistý (*Platanthera bifolia*), tořič čmelákovitý, (*Ophrys holosericea*), tořič včelovitý (*Ophrys apifera*), vemeníček zelený (*Dactylorhiza viride*), pětiprstka žežulník hustokvětá (*Gymnadenia conopsea subsp. densiflora*), střevíčník pantoflíček (*Cypripedium calceolus*), kruštík bahenní (*Epipactis palustris*) vstavač mužský (*Orchis mascula*), prstnatec pleťový (*Dactylorhiza incarnata*), prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*), kruštík modrofialový (*Epipactis purpurata*), vstavač nachový (*Orchis purpurea*), vstavač kukačka (*Anacamptis morio*), vemeník zelenavý (*Platanthera chlorantha*), vstavač bledý (*Orchis pallens*), vstavač osmahlý (*Neotinea ustulata*), okrotice bílá (*Cephalanthera damasonium*) a okrotice dlouholistá (*Cephalanthera longifolia*) (Mackovčín *et al.*, 2002).

2.3 Sběr semen

Pro vysévací pokus byla použita semena z lokálních populací, která byla sesbírána na konci léta roku 2013 (Tab. III). Vždy bylo vybráno 20 rostlin. Po sběru se zralé květenství jednotlivých druhů rozdělilo na 3 části: horní část tobolek, střední část tobolek a spodní část tobolek. Jednotlivé tobolky se semeny byly poté zabaleny do malých sáčků z filtračního papíru a nechány volně sušit při pokojové teplotě asi 3 dny. Po dosušení a následného vysypání semen ze všech částí suchých tobolek jsem semena prohlédl pod binolupou a určil kvalitu semen (u každého druhu se určila kvalita u dvou vzorků, podíl semen s embryi se pak zprůměroval). Ze semen jsem poté udělal směsný vzorek z dobrých částí květenství jednoho druhu. Semena byla poté vysazena pomocí rámečků na diapositivu (viz níže).

Kvalitu semen jsem rozdělil do 2 kategorií:

I. kategorie – semena s plně vyvinutým embryem

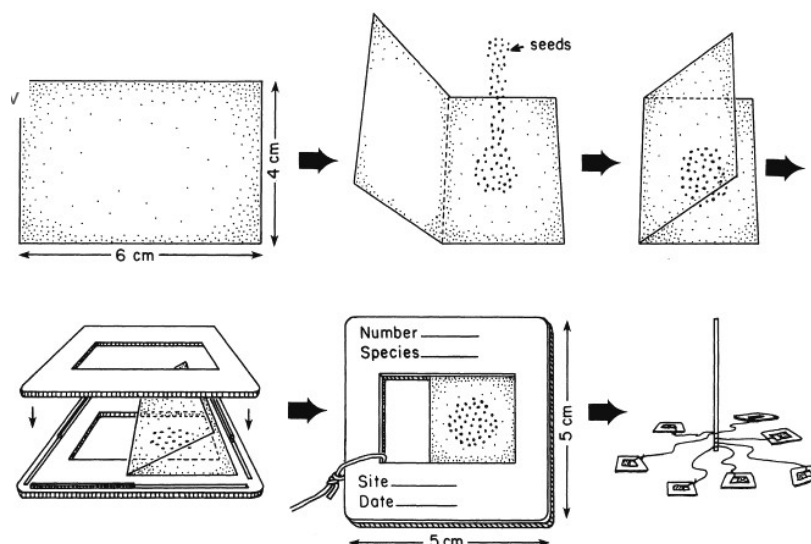
II. kategorie – abortovaná semena (se špatně vyvinutým embryem, semena bez přítomnosti embrya)

Tab. III. Podíl semen s embryem u šesti druhů orchidejí (Bílé Karpaty), které byly následně použity na vysévací pokusy.

Druh	Datum sběru	Podíl semen s embryem
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	6.8 2013	75,5 %
<i>Gymnadenia conopsea</i>	13.7 2013	83,4 %
<i>Neottia ovata</i>	22.6 2013	91,7 %
<i>Orchis militaris</i>	29.6 2013	62,4 %
<i>Platanthera bifolia</i>	13.7 2013	72,6 %
<i>Traunsteinera globosa</i>	29.6 2013	72,4 %

2.4 Výsev semen

Pro vysévací pokus byla použita rámečková metoda podle Rasmussen a Whigham (1993) (Obr. 2), která umožňuje kontrolu semen, které jsou pěstovány v takřka přirozených podmínkách. Přibližně 300 semen jednoho druhu bylo uzavřeno do jemné síťoviny typu Uhelon (Silk & Progress Ltd, Brněnec) o rozměrech 4 x 6 cm a velikostí oka 42 µm. Tento rozestup umožňuje vniknutí houbových hyf i různým půdním mikroorganismům k semenu, aniž by semeno ze síťoviny vypadlo. Přehnutá síťka se semeny byla poté vložena do rámečku, označena specifickým kódem druhu a barevným vlascem. Vlasec také sloužil k přivázání ke kovové závlačce, která se poté vyhledávala detektorem kovů. Rámečky byly poté sázeny pod úhlem 45° a hloubky cca 5 cm do půdy.



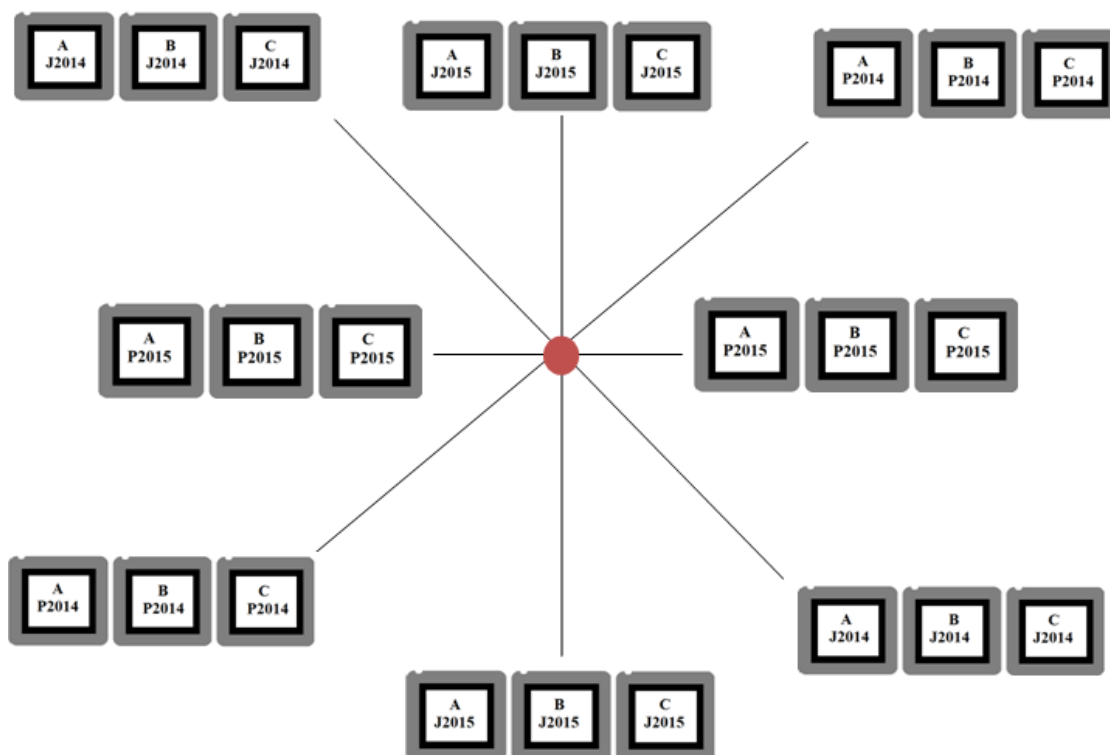
Obr. 2. Diarámečková metoda využívaná pro kontrolu klíčivosti semen.
Převzato z Rasmussen & Whigham, 1993.

2.5 Uspořádání pokusu

2.5.1 Sazení na obnovených loukách

Na obnovené louky byly vysazeny v druhé půlce října 2013 rámečky se semeny jednotlivých druhů. Na každé ploše byl vytyčen transekt, který obsahoval 3 mikrostanoviště se zasazenými rámečky (grafické zobrazení jednoho mikrostanoviště viz obr. 3). Mikrostanoviště byly mezi sebou vzdáleny tři metry. Celkem bylo na obnovené louky vysazeno 720 sítěk se semeny, vloženými do 360 rámečků třech variant (24 rámečků na mikrostanoviště). Každý rámeček obsahoval semena dvou druhů orchidejí v samostatných sítkách. Varianta A s druhy *Gymnadenia conopsea* a *Anacamptis pyramidalis*; varianta B s druhy *Traunsteinera globosa* a *Orchis militaris*; a varianta C s druhy *Platanthera bifolia* a *Neottia ovata*.

Rámečky se semeny byly vytaženy v roce 2014 v jarním období (v půlce dubna – 360 sítěk se semeny) a na podzim (na konci října – začátkem listopadu – 360 sítěk se semeny). U každého druhu bylo takto vytaženo 120 sítěk se semeny. Další rámečky, které už tato práce nezahrnuje, byly vytaženy také v roce 2015.



Obr. 3. Grafické zobrazení mikrostanoviště na obnovených loukách. Varianta A s druhy *Gymnadenia conopsea* a *Anacamptis pyramidalis*; varianta B s druhy *Traunsteinera globosa* a *Orchis militaris*; a varianta C s druhy *Platanthera bifolia* a *Neottia ovata*. Kódy vytažení_ J2014 – 2015 (Jaro 2014 - 2015) P2014 - 2015 (Podzim 2014-2015).

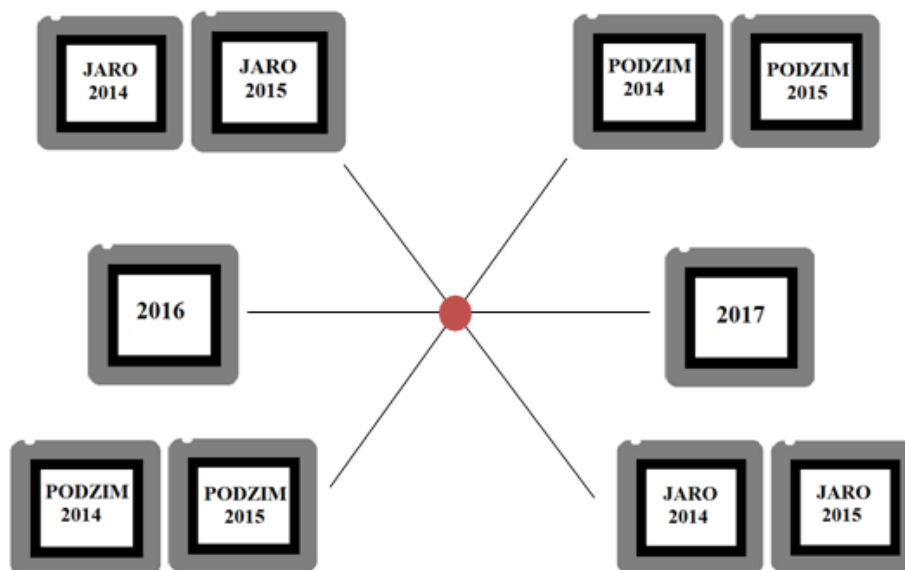
2.5.2 Sázání na kontrolních loukách

Na kontrolních loukách bylo v průběhu vegetační sezony (červen – srpen 2013) zaznačeno 30 rostlin od každého ze šesti druhů (15 jedinců Čertoryje a 15 jedinců Zahrady pod Hájem). Celkem bylo takto zaznačeno 180 mateřských rostlin. Na kontrolní louky bylo vysazeno celkem 1800 sítěk se semeny (větší počet oproti obnoveným loukám – pouze jeden druh v rámečku). Oproti obnoveným loukám se na kontrolních loukách nesázely rámečky v podobě transektů, nýbrž přímo k mateřským rostlinám, aby byla zajištěna přítomnost mykorhizních hub a vhodných půdních podmínek. Rámečky byly vzdáleny od mateřské rostliny v rozmezí od deseti do dvaceti centimetrů.

Rámečky se semeny byly vytaženy v roce 2014 v jarním období (v půlce dubna – celkem bylo vytaženo 360 sítěk) a na podzim (na konci října – začátkem listopadu – celkem bylo vytaženo 360 sítěk). Pro každý druh bylo takto vytaženo

120 sítěk po 7 a 12 měsících v půdě. Analogicky byly vytaženy také rámečky z roku 2015, které ale nebyly analyzovány v této práci.

Pro kontrolu případného dalšího klíčení bylo vytahování 360 zbylých sítěk naplánováno na rok 2016 a 2017 (podrobné schéma uvádím na obr. 4).



Obr. 4. Grafické zobrazení sázení na kontrolních loukách.

2.6 Hodnocení klíčivosti semen

Celkem 1440 sítěk se semeny, které byly vytaženy po 7 a 12 měsících v půdě, byly skladovány max. pět týdnů ve vlhku a chladu v lednici. Semena ze všech rámečků byla poté zařazena do příslušných kategorií podle tvaru embrya a morfologických změn na osemení. Z každé dvojice rámečků z jednoho mikrostanoviště byl vybrán jeden rámeček, ve kterém byly spočítány všechny kategorie klíčení (viz níže). U druhého rámečku z dvojice byly spočítány neklíčící/klíčící semena a protokormy.

Hodnotily se 4 kategorie:

1. Neklíčící semeno – semeno bez objemových změn, bez náznaku nabobtnání, či protržení osemení.
2. Klíčící semeno – semeno kulovitého až oválného tvaru, u většiny případů s protrženým osemením, avšak nemykorhizní.

3. Protokorm – mykorhizní stav semene, typický hruškovitý tvar embrya, tvorba rhizoidů.
4. Mrtvé semeno – semena deformovaná, shnilá, jevící známky požeru či semena bez embrya (s prázdným osemením).

2.7 Molekulární analýza mykorhizních hub v protokormech

Pro identifikaci mykorhizních hub během fáze klíčení byly použity semena ve fázi protokormu, které byly získány z rámečků vyjmutých z půdy. Analyzovány byly protokormy z podzimního vytažení z roku 2014. Celkem bylo takto získáno 829 protokormů. Protokormy pocházely především z kontrolních luk, avšak byly objeveny i na obnovených loukách. Protokormy byly po vyjmutí z rámečku pečlivě očištěny a zamrazeny pro molekulární analýzy. Celkem bylo analyzováno 30 protokormů (Vždy byly vybrány největší protokormy z rámečku, pokud byly u některých druhů k dispozici pouze střední nebo malé protokormy, byly vybrány tyto. Zároveň se bral ohled na zahrnutí co největšího počtu luk).

2.8 Molekulární analýza mykorhizních hub v kořenech rostlin

Z kontrolních luk byly během sezony 2014 odebrány kořeny ze 3 jedinců každého z pěti druhů (AP, GC, PB, TG, OMi) za účelem molekulární studie houbových struktur dospělých jedinců. *N. ovata* sbírána nebyla. Kořeny byly po odběru opláchnuty vodou. Povrch kořene byl očištěn jemným kartáčkem. Poté byly uloženy do zkumavek s 60% etanolem a převezeny do laboratoře k dalšímu zpracování. Před nařezáním byly kořeny sterilizovány ve 100% SAVU (4,5 % chlornan) po dobu 30 sekund, poté byly máchány 15 s v 70% etanolu a nakonec byly 3× promyty 15 s v destilované vodě.

Po sterilizaci byly kořeny nařezány po 5 mm řezech, byla zjišťována přítomnost mykorhizní kolonizace a její kvalita (míra kolonizace kořene). Mykorhizní části byly poté nařezány na 2 mm řezy, které byly následně zamrazeny při -20 °C. Pro další analýzy byly využity vždy 3 řezy z každé rostliny.

2.9 Molekulární identifikace hub

Pro izolaci DNA z dospělých jedinců rostlin a protokormů byla použita metoda CTAB (Porebski *et al.*, 1997). Následná amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) probíhala na části úseku 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 a na části úseku 28S

rDNA. Pro přípravu PCR směsi byl použit Plain PP Master Mix (Topbio) se složením reakce: 5 µl 2xPP Master Mixu, 0,6 µl 5' primeru (5 pmol), 0,6 µl 3' primeru (5pmol), 1 µl DNA a 2,8 µl ddH₂O.

Byly použity primery: ITS1OF a ITS4OF (univerzální primer pro mykorhizní houby orchidejí; Taylor & McCormick, 2008), ITS4Tul (pouze pro rod *Tulasnella*; Taylor & McCormick, 2008), ITS3Seb (pouze pro houby čeledi Sebacinaceae; Selosse *et al.*, 2007) a TW13 (univerzální pro všechny Eukaryota; O'Donnell, 1993).

Pro kombinace primerů ITS1OF+ITS4OF a ITS1OF+ITS4Tul byl použit při PCR reakci následující cyklus:

95 °C 5 min (počáteční denaturace)

35× cyklus:

95 °C 1 min (cyklová denaturace)

55 °C 1 min (nasedání primeru)

72 °C 1 min 30 s (cyklová elongace)

následováno

72 °C 10 min (finální elongace)

15 °C hold (chlazení směsi po proběhnuté PCR)

Pro kombinaci ITS3Seb+TW13 byl použit následující cyklus:

94 °C 4 min (počáteční denaturace)

35× cyklus

94 °C 30 s (cyklová denaturace)

53 °C 30 s (nasedání primeru)

72 °C 30 s (cyklová elongace)

následováno

72 °C 10 min (finální elongace)

15 °C hold (chlazení směsi po proběhnuté PCR)

Kvalita výsledného produktu byla ověřena pomocí elektroforézy, kdy byl PCR produkt smíchán s barvivem GelRed (Biotium) a nanesen na 1,5% agarózový gel v TBE pufru. Standardně byl použit 100 bp DNA ladder (NEB).

Produkty PCR s primerovými kombinacemi ITS1OF+ITS4-Tul a ITS3-Seb+TW13 byly purifikovány pomocí ExoSAP-IT (USB Corporation) a následně použity pro sekvenační směs. Vybrané PCR produkty (produkty s více bandy)

získané pomocí kombinace primerů ITS 1 OF a ITS 4 OF byly použity pro klonování. Pro klonování byl použit vektor PGEM-T Vector System I od společnosti Promega (obsahuje plazmid pGEM-T). Celkem bylo z každého vzorku odebráno 8 kolonií obsahujících vektor a byla provedena PCR reakce pomocí primerů SP6 a T7.

Pro sekvenování byly použity primery SP-6 pro vzorky po klonování, ITS1 OF pro kombinaci primerů ITS1OF+ITS4OF, ITS3SEB pro kombinaci primerů ITS3SEB-TW13. Sekvence byly editovány v programu Geneious v8.0.5 (Drummond *et al.*, 2012) a nakonec byla porovnána identita sekvencí s databází GenBank metodou BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Ze získaných sekvencí byly vytvořeny operační taxonomické jednotky (OTU) na základě 97% podobnosti v ITS úseku. OTU jsou používány v environmentálních studiích jako náhražka taxonomických druhů, protože většině hub získaných z orchidejí pomocí sekvenování nejsme schopni přiřadit taxonomické jméno. 97% podobnost je v ekologii hub používána nejčastěji (Hughes *et al.*, 2009). Upravené sekvence byly zalignmentovány v programu MAFFT v. 7.012 (Katoh, 2010) a OTU byly vytvořeny v programu Topali (Milne *et al.*, 2008).

2.10 Statistické zpracování dat

Pro porovnání délky inkubace byla ukázána procenta klíčících (klíčící semena + protokormy), procenta neklíčících (neklíčící semena) a procentuální mortalita (mrtvá semena), a to po 7 a 12 měsících v půdě. Z hodnocení byly vynechány hodnoty, u kterých se nepočítala mortalita (vždy druhý rámeček ze sestavy).

Pro účely statistického zpracování byly použity výsledky klíčení z rámečků sbíraných po dvanácti měsících v půdě. Data byla vyhodnocována pomocí programu R3.1 (R Core Team 2015). Pro porovnání klíčivosti u každého ze šesti druhů orchidejí na různých lokalitách a lokalitách různého stáří, byly provedeny dvě série testů.

Nejprve byl testován vliv faktoriální vysvětlující proměnné *komplex* (Vojšice, Hrubá Vrbka, Čertoryje, Zahrady pod Hájem) pomocí analýzy variance, poté vliv spojitě proměnné *stáří* pouze na obnovených loukách pomocí lineárního modelu. Vysvětlovány byly (1) *klicici* – podíly klíčících semen a protokormů z celkového množství semen (počítáno pouze z rámečků se všemi kvantifikovanými kategoriemi); (2) *proto/celkem* – počty rámečků s protokormy vztažené na celkový počet rámečků z mikrostanoviště; (3) *proto_mean* – průměrné počty protokormů na plochu

(průměry byly spočítány pouze z rámečků s protokormy); (4) *size_max* – velikosti největšího protokormu získaného z plochy. Proměnné (3) a (4) byly logaritmovány. Testy (*Proto_mean* a *Size_max*) byly provedeny pouze u druhů, které vytvořily protokormy na více lokalitách, tj. *G. conopsea* subsp. *conopsea*, *Orchis militaris* a *Neottia ovata*. Pokud byl u analýzy variance zaznamenán signifikantní rozdíl, byl následně proveden Tukey HSD test pro porovnání komplexů.

3. VÝSLEDKY

3.1 Průběh klíčení a analýza houbových symbiontů u jednotlivých druhů.

3.1.1 *Anacamptis pyramidalis*

Průběh klíčení

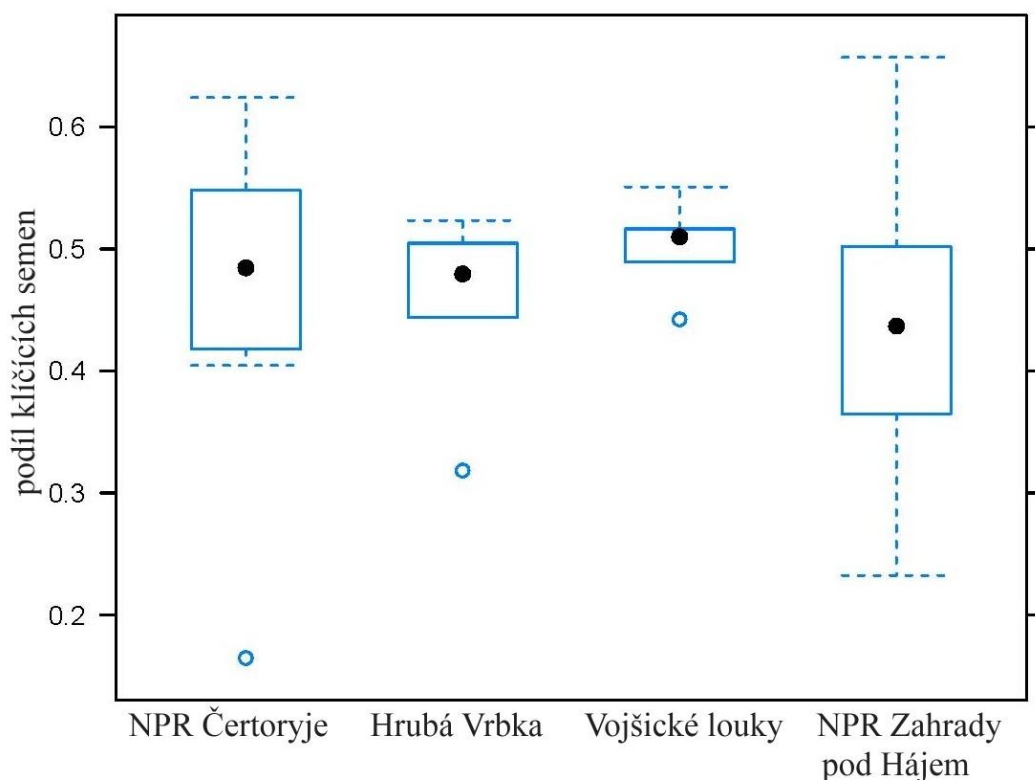
Klíčící semena *A. pyramidalis* byla v sítkách nalezena již po 7 měsících v půdě, při druhém odběru však klíčivost velmi výrazně vzrostla (Tab. IV). Klíčící semena byla nalezena ve všech komplexech i plochách, protokormy však byly nalezeny jen na kontrolních loukách. Fotografie vybraných protokormů nalezených na zkoumaných loukách uvádí příloha č. 1. Nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v celkové klíčivosti semen mezi komplexy (Tab. V, obr. 5). Průkazný rozdíl byl nalezen mezi testovanými komplexy v podílu rámečků s protokormy (*proto/celkem*), což je způsobeno výskytem většího počtu protokormů pouze v NPR Zahrady pod Hájem (po 12 měsících) (Tab. V). Nebyla nalezena lineární závislost v podílu klíčících semen na stáří ploch na obnovených loukách (obr. 6, Tab. V).

Tab. IV Klíčení semen u druhu *Anacamptis pyramidalis*. Tabulka zahrnuje výsledky po 7 a 12 měsících inkubace semen v půdě. **Vysvětlivky:** **Klíčící [%]** – procentuální zastoupení klíčících semen; **Neklíčící [%]** – procentuální zastoupení neklíčících semen; **Mortalita [%]** – procentuální zastoupení mrtvých semen.

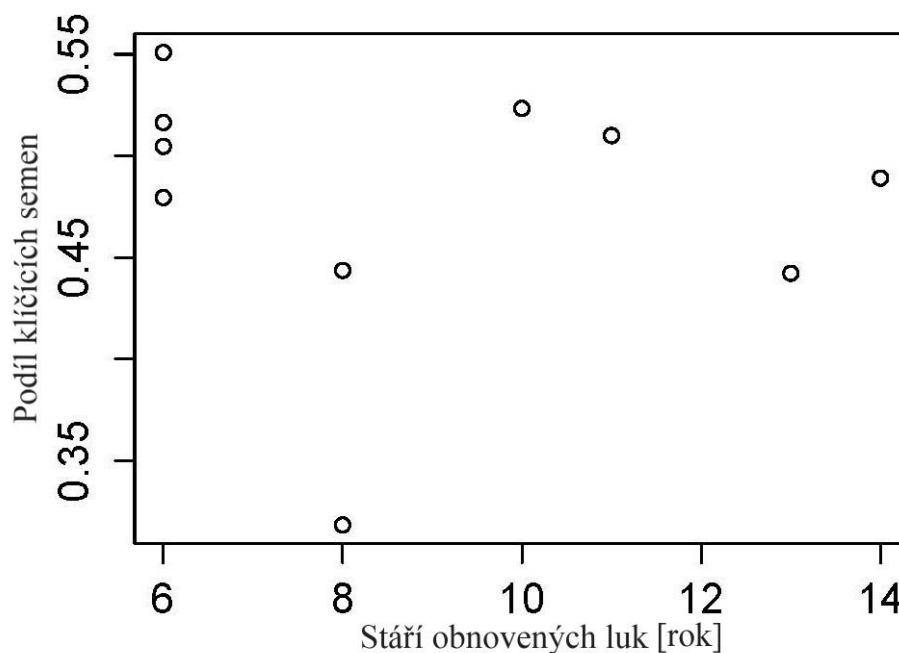
Komplex	klíčící [%]		neklíčící [%]		mortalita [%]		počet protokormů	
	7	12	7	12	7	12	7	12
Délka inkubace v půdě [měsíce]								
Vojšické louky	9,7	50,2	51,9	20,3	38,4	29,5	0	0
Hrubá Vrbka	8,1	45,4	52,3	20,6	39,6	34,0	0	0
NPR Čertoryje	31,4	44,7	36,0	16,6	32,7	38,6	14	0
NPR Zahr. p. Hájem	24,9	44,0	36,2	19,2	38,9	36,8	65	56

Tab. V Výsledky testů vlivu *komplexu* a *stáří* lokality na množství klíčících semen (*klicici*) a celkový podíl rámečků s protokormy (*proto/celkem*) po 12 měsících v půdě u druhu *Anacamptis pyramidalis*.

Vysvětlující			Výsledky testů					reziduály		
			DF	Sum sq.	Mean sq.	F	p	DF	Sum sq.	Mean sq.
<i>komplex</i>	1	<i>klicici</i>	3	0,01	0,01	0,46	0,71	35	0,36	0,01
	2	<i>proto/celkem</i>	3	0,51	0,17	4,27	0,01	36	1,43	0,03
			Výsledky testů							
<i>stáří</i>			Mult. R-sq		Adj. R-sq		F	DF	p	
	1	<i>klicici</i>	0,01		-0,11		0,05	1, 8	0,82	
Komplex (Tukey HSD test)			<i>proto_celkem</i>							
			diff				p			
Hrubá Vrbka vs. NPR Čertoryje			-5,55				1,00			
Vojšické louky vs. NPR Čertoryje			-2,77				1,00			
NPR Zahrady pod Hájem vs. NPR Čertoryje			2,33				0,01			
Vojšické louky vs. Hrubá Vrbka			-2,22				1,00			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Hrubá Vrbka			2,33				0,12			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Vojšické louky			2,33				0,12			



Obr. 5 Box and whisker diagram znázorňující podíl klíčících semen druhu *Anacamptis pyramidalis* na studovaných lokalitách. Černá tečka: medián, box plot: 3. a 1. kvartil, whiskers: maximální a minimální hodnoty bez outlierů, prázdné modré tečky: outliers. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 6 Diagram znázorňující podíl klíčících semen *Anacamptis pyramidalis* na různě starých obnovených loukách. Data po 12 měsících v půdě.

Analýza houbových symbiontů

Mykorhizní struktury v kořenech jsem nenalezl u tří dospělých rostlin. Mykorhizní houby se podařilo detekovat u jednoho ze čtyř protokormů a v kořenech dvou dospělců ze tří, přičemž byly nalezeny především houby z čeledi Tulasnellaceae (Tab. VI). U třetího dospělého jsem našel pouze parazitickou houbu z rodu *Malassezia* (Tab. VI).

Tab. VI Druhy hub zjištěné v protokormech a kořenech tří dospělých jedinců druhu *Anacamptis pyramidalis*. Tučně jsou označeny mykorhizní houby, kurzívou jsou pravděpodobní houboví endofyti. **Vysvětlivky:** NPR ZpH - Národní přírodní rezervace Zahrady pod Hájem, NPR C - Národní přírodní rezervace Čertoryje, OTU - operační taxonomické jednotky. U protokormů je uváděn počet rámečků, ze kterých protokormy pocházely.

Stádium	Komplex	Čeleď	OTU	Počet jedinců/ počet rámečků
Protokormy	NPR ZpH	Tulasnellaceae	15	1/1
Dospělci	NPR ZpH	Tulasnellaceae	2	1
	NPR ZpH	Tulasnellaceae	3	1
	NPR ZpH	Tulasnellaceae	8	1
	NPR ZpH	Tulasnellaceae	14	1
	NPR C	<i>Malassezia sp.</i>	/	1

	NPR ZpH	<i>Malassezia sp.</i>	/	1
--	---------	-----------------------	---	---

3.1.2 *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea*

Průběh klíčení

Klíčící semena *G. conopsea* subsp. *conopsea* byla v sítkách nalezena již po 7 měsících v půdě, při druhém odběru klíčivost mírně vzrostla, byl ale zaznamenán větší počet nalezených protokormů (Tab. VII). Klíčící semena a protokormy byly nalezeny ve všech komplexech (Tab. VII). Fotografie vybraných protokormů nalezených na zkoumaných loukách uvádí příloha č. 2. Byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v celkové klíčivosti mezi komplexy, Tukey HSD test, $p < 0,05$ (Tab. VIII., obr. 7), ale také průkazný rozdíl mezi testovanými komplexy v průměrném počtu protokormů na plochu (*proto_mean*) (Tab. VIII, obr. 8). Různě staré obnovené louky se v podílu klíčících semen nelišily (Tab. VIII obr. 9). Test velikosti největšího protokormu získaného z plochy (*size_max*) vyšel neprůkazně (Tukey HSD test, $p < 0,05$; Tab. VIII).

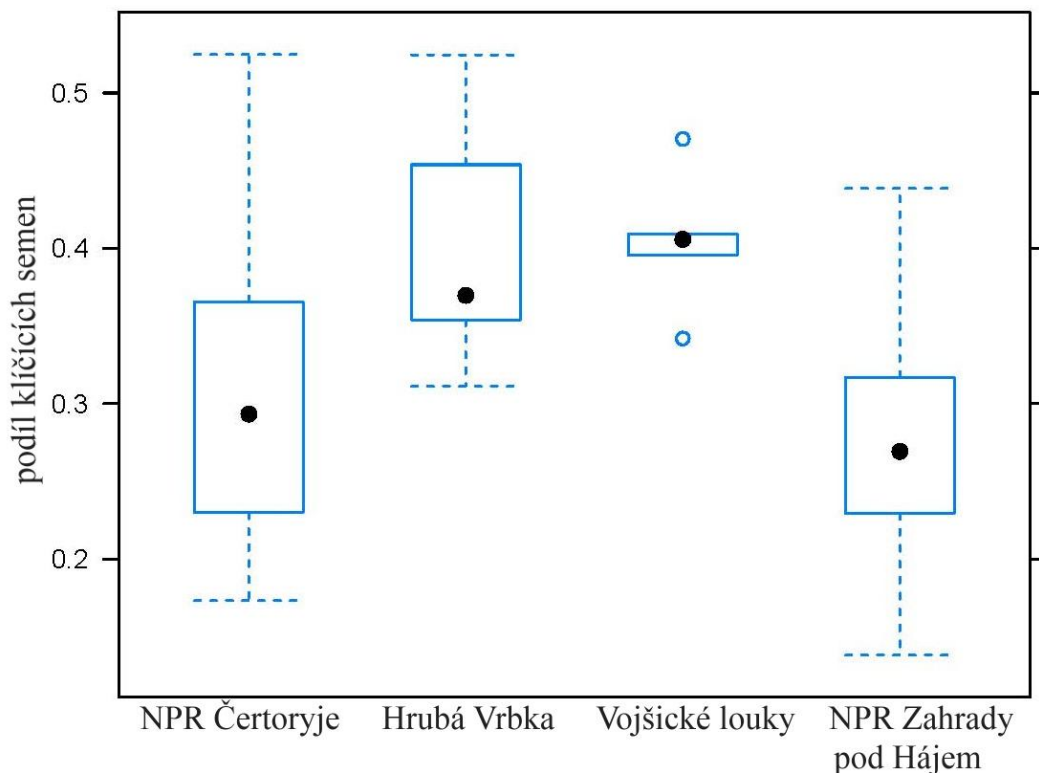
Tab. VII Klíčení semen u druhu *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea*. Tabulka zahrnuje sběr po 7 a 12 měsících v půdě. Vysvětlivky: **klíčící [%]** – procentuální zastoupení klíčících semen; **neklíčící [%]** - procentuální zastoupení neklíčících semen; **mortalita [%]** – procentuální zastoupení mrtvých semen.

Komplex	klíčící [%]		neklíčící [%]		mortalita [%]		počet protokormů	
	7	12	7	12	7	12	7	12
Inkubace v půdě [měsíc]								
Vojšické louky	35,8	40,2	28,7	24,0	35,4	34,9	18	91
Hrubá Vrbka	34,6	39,4	32,6	26,2	33,2	33,1	50	126
NPR Čertoryje	27,3	31,4	27,6	27,1	45,0	41,4	38	18
NPR Zahr. p. Hájem	36,2	42,3	22,3	33,2	36,9	40,0	37	39

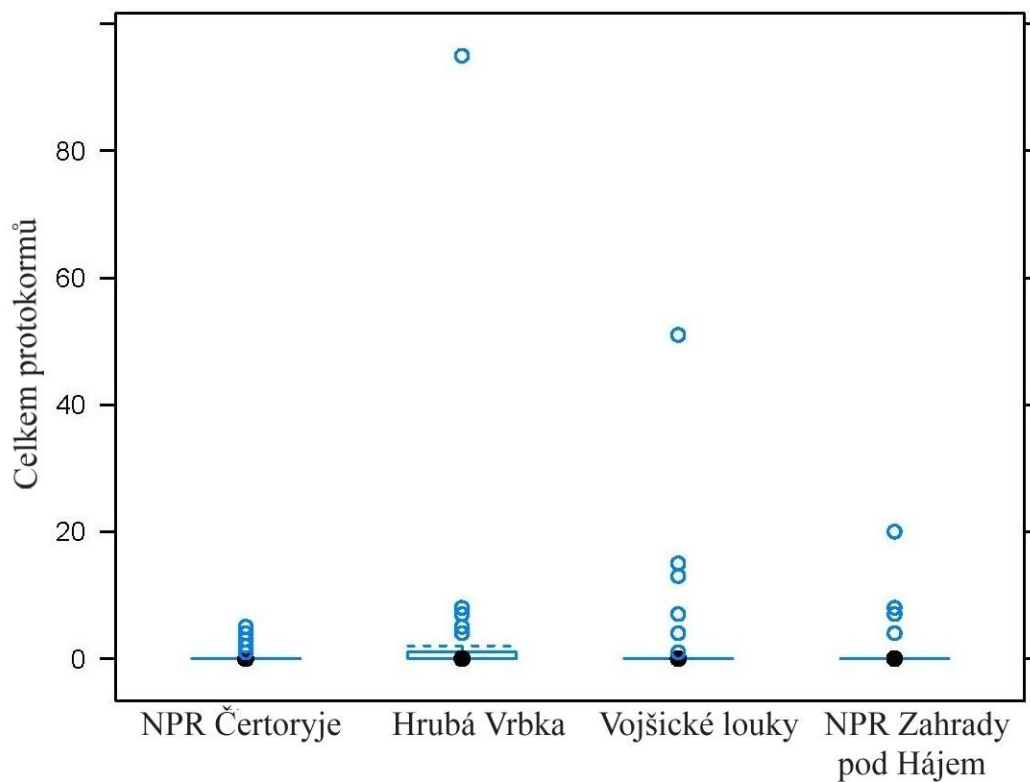
Tab. VIII Výsledky testů vlivu komplexu a stáří lokality na množství klíčících semen (*klicici*), celkový podíl rámečků s protokormy (*proto/celkem*), průměrné počty protokormů na plochu (*proto_mean*) a velikosti největšího protokormu získaného z plochy (*size_max*) po 12 měsících v půdě u druhu *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea*.

Vysvětlující			Výsledky testů					reziduály		
			DF	Sum sq.	Mean sq.	F	p	DF	Sum sq.	Mean sq.
<i>Komplex</i>	1	<i>klicici</i>	3	0.09	0.03	4.9	0.01	34	0.22	0.01
	2	<i>proto/celkem</i>	3	0.10	0.03	0.51	0.67	36	2.44	0.06

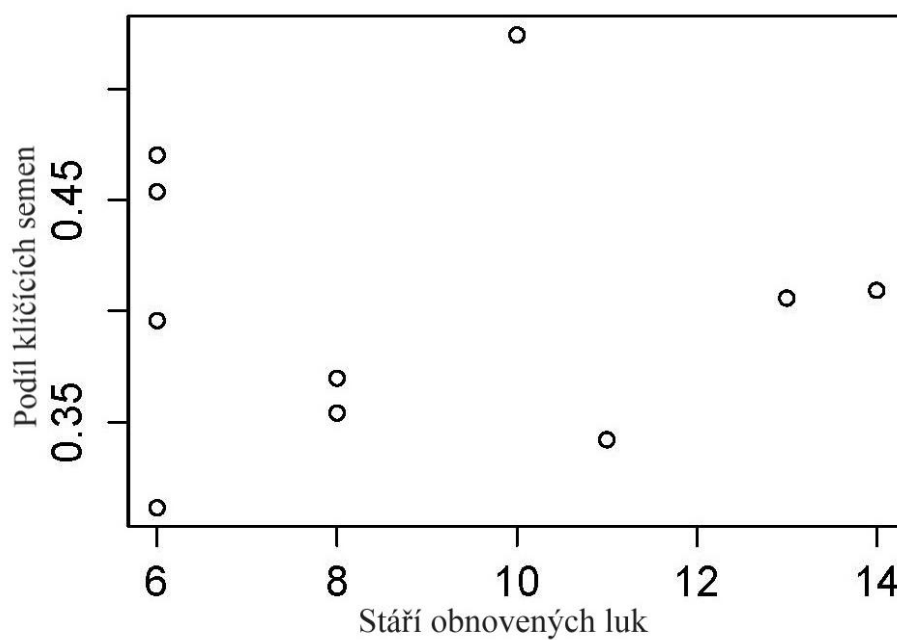
	3	<i>proto_mean</i>	3	8.58	2.86	3.58	0.04	14	11.1	0.79
	4	<i>size_max</i>	3	0.16	0.05	0.11	0.95	13	6.28	0.48
	Výsledky testů									
<i>Stáří</i>				Mult. R-sq		Adj. R-sq		F	DF	p
	1	<i>klicici</i>	0.01		-0.12		0.03	1, 8	0.87	
	2	<i>proto/celkem</i>	0.09		-0.01		0.86	1, 8	0.38	
	3	<i>proto_mean</i>	0.06		-0.09		0.38	1, 6	0.55	
	4	<i>size_max</i>	0.16		0.01		1.02	1, 5	0.35	
Komplex (Tukey HSD test)				<i>klicici</i>		<i>proto_mean</i>				
				diff	p	diff	p			
Hrubá Vrbka vs. NPR Čertoryje				0,09	0,17	1,30	0,21			
Vojšické louky vs. NPR Čertoryje				0,09	0,16	1,61	0,04			
NPR Zahrady pod Hájem vs. NPR Čertoryje				- 0,04	0,6	1,33	0,14			
Vojšické louky vs. Hrubá Vrbka				0,01	1,0	0,31	0,96			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Hrubá Vrbka				-0,12	0,03	0,03	0,99			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Vojšické louky				-0,12	0,02	-0,28	0,96			



Obr. 7 Box and whisker diagram znázorňující podíl klíčících semen druhu *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea* na studovaných lokalitách. **Vysvětlivky:** Černá tečka: medián, box plot: 3. a 1. kvartil, whiskers: maximální a minimální hodnoty bez outlierů, prázdné modré tečky: outliers. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 8 Box and whisker diagram znázorňující počty nalezených protokormů *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea* na obnovených loukách a kontrolních loukách. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 9 Diagram znázorňující podíl klíčících semen *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea* na různě starých obnovených loukách. Data po 12 měsících v půdě.

Analýza houbových symbiontů

U druhu *G. conopsea* subsp. *conopsea* bylo celkem analyzováno šest protokormů a kořeny ze tří dospělých jedinců. Mykorhizní houby byly detekovány u dvou protokormů a dvou dospělců, přičemž byly nalezeny 3 různé Tulasnellaceae OTU ve dvou analyzovaných protokormech a dvou dospělcích (Tab. IX). U třetího jedince jsem našel pouze parazitické houby z rodu *Malassezia* a *Pleosporales*.

Tab. IX Druhy hub zjištěné v protokormech a kořenech tří dospělých jedinců u druhu *Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea*. Tučně jsou označeny mykorhizní houby, kurzívou jsou pravděpodobní houboví endofyti. Vysvětlivky: NPR ZpH – Národní přírodní rezervace Zahrady pod Hájem, NPR C – Národní přírodní rezervace Čertoryje, VL – Vojšické louky, HV - Hrubá Vrbka, OTU – operační taxonomické jednotky. U protokormů je uváděn počet rámečků, ze kterých protokormy pochází.

Stádium	Komplex	Plocha	Čeleď	OTU	Počet jedinců/ počet rámečků
Protokormy	VL	1	Tulasnellaceae	2	1/1
	HV	8	Tulasnellaceae	2	1/1
Dospělci	NPR C	/	Tulasnellaceae	4	1
	NPR ZpH	/	Tulasnellaceae	10	1
	NPR ZpH	/	<i>Pleosporales</i> sp.	/	1
	NPR ZpH	/	<i>Malassezia</i> sp.	/	1

3.1.3 *Orchis militaris*

Průběh klíčení

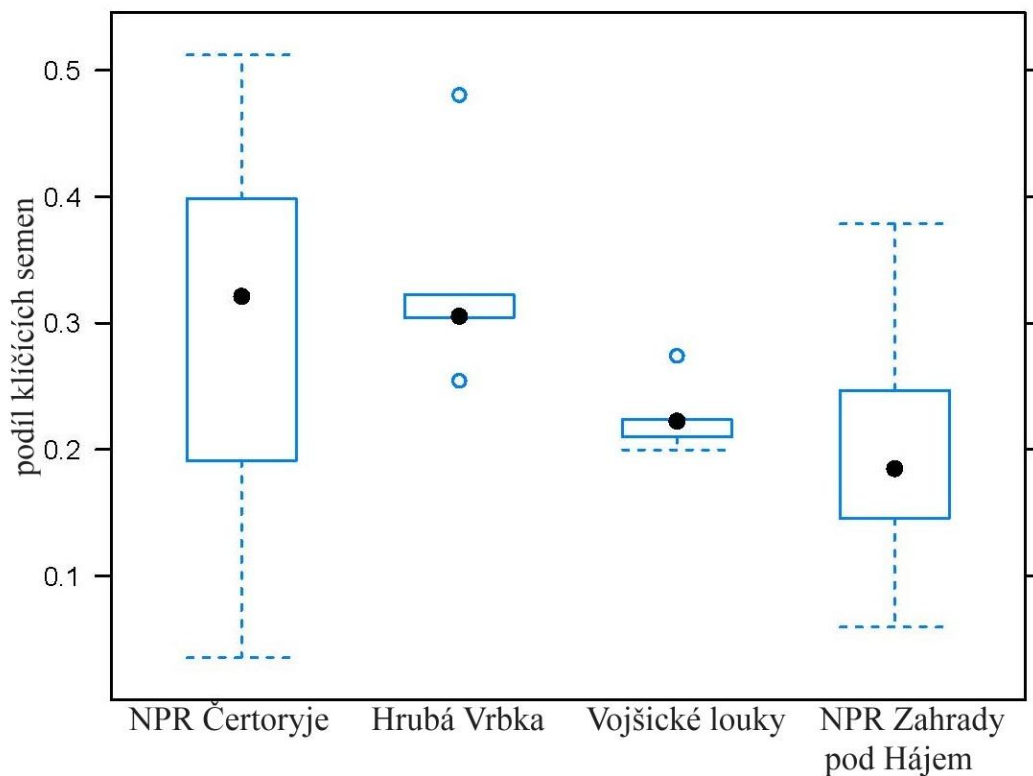
Klíčící semena *O. militaris* byla v sítkách nalezena již po 7 měsících v půdě, při druhém odběru se klíčivost mírně zvýšila, byl také zaznamenán výrazně větší počet nalezených protokormů po dvanácti měsících v půdě (Tab. X). Klíčící semena byla nalezena ve všech komplexech i plochách, protokormy byly nalezeny jen na kontrolních loukách (Tab. X). Fotografie vybraných protokormů nalezených na zkoumaných loukách uvádí příloha č. 3. Byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v celkové klíčivosti mezi komplexy (Tab. XI., obr. 10), ale také průkazný rozdíl mezi testovanými komplexy v podílu rámečků s protokormy (*proto/celkem*) (Tab. XI, obr. 11). Test velikosti největšího protokormu získaného z plochy (*size_max*) vyšel neprůkazně (Tab. XI). Různě staré obnovené louky se v podílu klíčících semen nelišily (obr. 12).

Tab. X: Klíčení semen u druhu *Orchis militaris*. Tabulka zahrnuje sběr po 7 a 12 měsících v půdě. Vysvětlivky: **klíčící [%]** – procentuální zastoupení klíčících semen; **neklíčící [%]** – procentuální zastoupení neklíčících semen; **mortalita [%]** – procentuální zastoupení mrtvých semen.

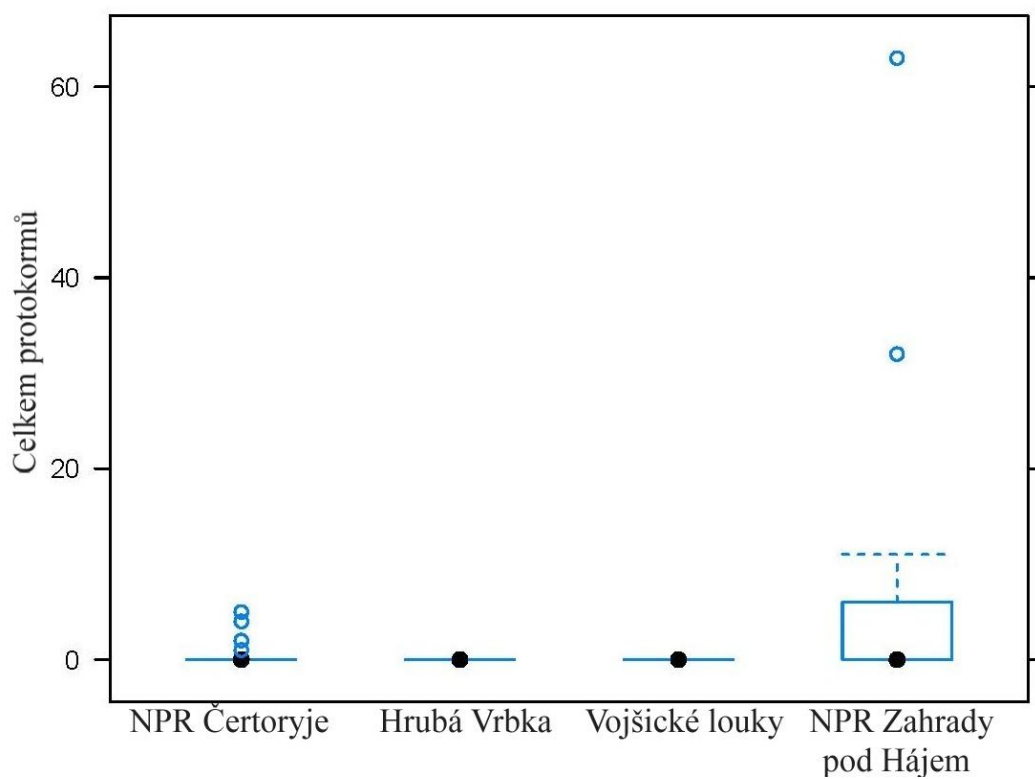
Komplex	klíčící [%]		neklíčící [%]		mortalita [%]		počet protokormů	
	7	12	7	12	7	12	7	12
Inkubace v půdě [měsíc]								
Vojšické louky	13,6	22,6	45,1	38,0	41,3	39,4	0	0
Hrubá Vrbka	20,3	33,3	43,5	30,4	36,2	36,3	0	0
NPR Čertoryje	20,1	30,0	41,4	26,7	38,5	43,3	3	18
NPR Zahr. p. Hájem	20,5	21,2	37,3	29,2	42,1	49,6	12	169

Tab. XI: Výsledky testů vlivu *komplexu* a *stáří* lokality na množství klíčících semen (*klicici*), celkový podíl rámečků s protokormy (*proto/celkem*), průměrné počty protokormů na plochu (*proto_mean*) a velikosti největšího protokormu získaného z plochy (*size_max*) u druhu *Orchis militaris*.

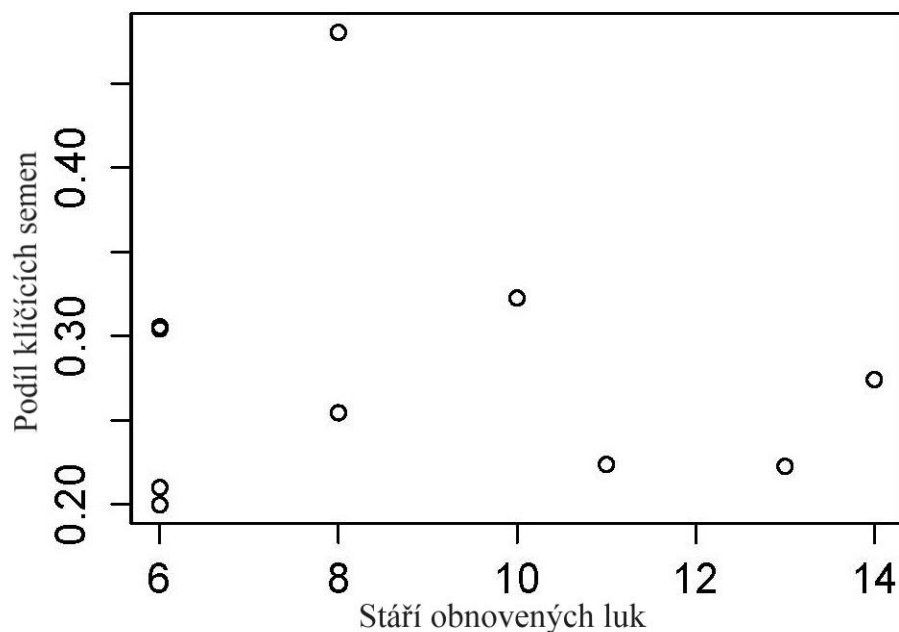
Vysvětlující			Výsledky testů					reziduály		
			DF	Sum sq.	Mean sq.	F	p	DF	Sum sq.	Mean sq.
<i>Komplex</i>	1	<i>klicici</i>	3	0.10	0.03	2.88	0.04	35	0.42	0.01
	2	<i>proto/celkem</i>	3	1.32	0.44	3.41	0.02	36	4.66	0.12
	3	<i>proto_mean</i>	1	3.64	3.66	4.52	0.05	12	9.67	0.80
	4	<i>size_max</i>	1	0.01	0.01	0.01	0.93	9	1.90	0.21
			Výsledky testů							
<i>Stáří</i>			Mult. R-sq			Adj. R-sq		F	DF	p
	1	<i>klicici</i>	0.01			0.12		0.03	1, 8	0.85
Komplex (Tukey HSD test)			<i>klicici</i>			<i>proto_celkem</i>				
			diff	p		diff	p			
Hrubá Vrbka vs. NPR Čertoryje			0,04	0,92		-2,33	0,60			
Vojšické louky vs. NPR Čertoryje			-0,07	0,58		-2,33	0,60			
NPR Zahrady pod Hájem vs. NPR Čertoryje			-0,09	0,09		2,33	0,30			
Vojšické louky vs. Hrubá Vrbka			-0,10	0,42		-6,66	1,00			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Hrubá Vrbka			-0,13	0,11		4,66	0,07			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Vojšické louky			-0,02	0,96		4,66	0,07			



Obr. 10 Box and whisker diagram znázorňující podíl klíčících semen druhu *Orchis militaris* na studovaných lokalitách. **Vysvětlivky:** Černá tečka: medián, box plot: 3. a 1. kvartil, whiskers: maximální a minimální hodnoty bez outlierů, prázdné modré tečky: outliers. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 11 Box and whisker diagram znázorňují počty nalezených protokormů *Orchis militaris* na obnovených a kontrolních loukách. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 12 Diagram znázorňuje podíl klíčících semen *Orchis militaris* na různě starých obnovených loukách. Data po 12 měsících v půdě.

Analýza houbových symbiontů

Mykorhizní houby byly detekovány u tří protokormů a u jednoho dospělého, přičemž v protokormech byly nalezeny pouze Sebacinaceae OTU. Naopak v jednom dospělci jsem našel dvě Tulasnellaceae OTU zároveň (Tab. XII).

Tab. XII Druhy hub zjištěné v protokormech a kořenech tří dospělých jedinců u druhu *Orchis militaris*. Tučně jsou označeny mykorhizní houby, kurzívou jsou pravděpodobní houboví endofyty. Vysvětlivky: NPR ZpH – Národní přírodní rezervace Zahrady pod Hájem, NPR C – Národní přírodní rezervace Čertoryje, OTU – operační taxonomické jednotky. U protokormů je uváděn počet rámečků, ze kterých protokormy pocházejí.

Stádium	Komplex	Čeleď	OTU	Počet jedinců/ počet rámečků
Protokormy	NPR C	Sebacinaceae	16	1/1
	NPR C	Sebacinaceae	17	2/1
Dospělci	NPR ZpH	Tulasnellaceae	11	1
	NPR ZpH	Tulasnellaceae	12	1

3.1.4 *Traunsteinera globosa*

Průběh klíčení

Klíčící semena *T. globosa* byla v sítkách nalezena již po 7 měsících v půdě, při druhém odběru se klíčivost mírně zvýšila (Tab. XIII). Klíčící semena byla nalezena ve všech komplexech i plochách. Protokormy byly nalezeny pouze na kontrolních loukách (Tab. XIII). Fotografie vybraných protokormů nalezených na zkoumaných loukách uvádí příloha č. 4. Byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v celkové klíčivosti mezi komplexy (Tab. XIV, obr. 13), rozdíl mezi testovanými komplexy v podílu rámečků s protokormy (*proto/celkem*) však zjištěn nebyl (Tab. XIV). Různě staré obnovené louky se v podílu klíčících semen nelišily (obr. 14, Tab XIV).

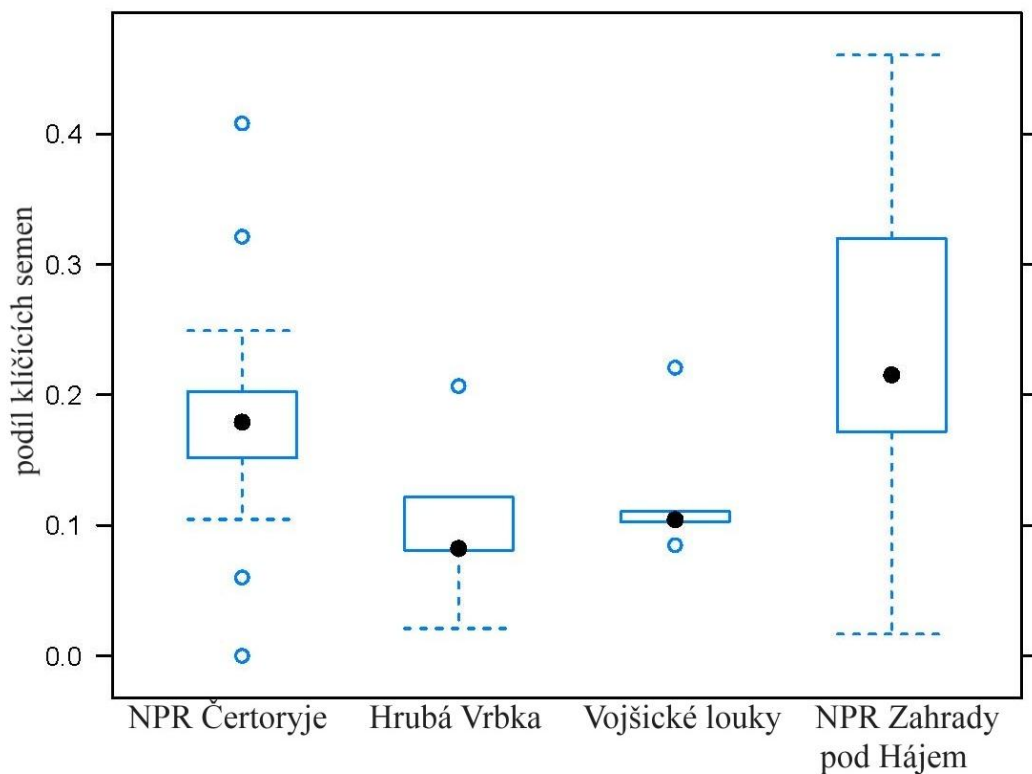
Tab. XIII.: Klíčení semen u druhu *Traunsteinera globosa*. Tabulka zahrnuje sběr po 7 a 12 měsících v půdě. Vysvětlivky: klíčící [%] – procentuální zastoupení klíčících semen; neklíčící [%] – procentuální zastoupení neklíčících semen; mortalita [%] – procentuální zastoupení mrtvých semen.

Komplex	klíčící [%]		neklíčící [%]		mortalita [%]		počet protokormů	
	7	12	7	12	7	12	7	12
Inkubace v půdě [měsíc]								
Vojšické louky	6,9	12,5	51,6	49,5	41,5	38,1	0	0
Hrubá Vrbka	1,6	10,3	60,0	52,2	38,5	37,5	0	0
NPR Čertoryje	15,4	18,0	46,2	31,0	38,4	51,0	8	7
NPR Zahr. p. Hájem	15,3	24,4	41,6	37,0	43,1	38,6	0	13

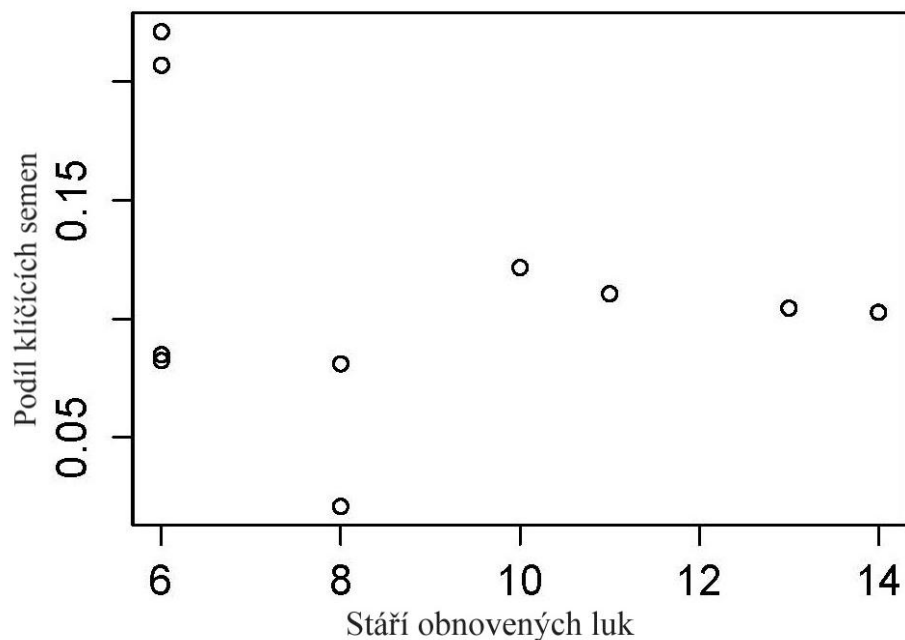
Tab. XIV.: Výsledky testů vlivu *komplexu* a *stáří* lokality na množství klíčících semen (*klicici*) (+ Tukey HSD test) a celkový podíl rámečků s protokormy (*proto/celkem*), po 12 měsících v půdě u druhu *Traunsteinera globosa*.

Vysvětlující			Výsledky testů					reziduály		
			DF	Sum sq.	Mean sq.	F	p	DF	Sum sq.	Mean sq.
<i>Komplex</i>	1	<i>klicici</i>	3	0.11	0.03	3.39	0.02	34	0.36	0.01
	2	<i>proto/celkem</i>	3	0.06	0.02	0.6	0.61	36	1.33	0.03
			Výsledky testů							
<i>Stáří</i>			Mult. R-sq		Adj. R-sq		F	DF	p	
	1	<i>klicici</i>	0.01		-0.121		0.02	1, 8	0.87	
Komplex (Tukey HSD test)							<i>klicici</i>			
							diff		p	
Hrubá Vrbka vs. NPR Čertoryje							-0,07		0,45	
Vojšické louky vs. NPR Čertoryje							-0,05		0,70	

NPR Zahrady pod Hájem vs. NPR Čertoryje	0,07	0,30
Vojšické louky vs. Hrubá Vrbka	0,02	0,98
NPR Zahrady pod Hájem vs. Hrubá Vrbka	0,14	0,04
NPR Zahrady pod Hájem vs. Vojšické louky	0,12	0,11



Obr. 13 Box and whisker diagram znázorňující podíl klíčících semen druhu *Traunsteinera globosa* na studovaných lokalitách. **Vysvětlivky:** Černá tečka: medián, box plot: 3. a 1. kvartil, whiskers: maximální a minimální hodnoty bez outlierů, prázdné modré tečky: outliers. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 14 Diagram znázorňuje podíl klíčících semen *Traunsteinera globosa* na různě starých obnovených loukách. Data po 12 měsících v půdě.

Analýza houbových symbiontů

U druhu *T. globosa* byly celkem analyzovány tři protokormy a kořeny z pěti dospělých jedinců. Mykorhizní houby byly detekovány u všech tří protokormů (Tab. XV). U pěti dospělých jedinců jsem zjistil pouze houbové endofyty a pravděpodobné rostlinné patogeny, mykorhizní houby se detekovat nepodařilo (Tab. XV).

Tab. XV Druhy hub zjištěné v protokormech a kořenech tří dospělých jedinců u druhu *Traunsteinera globosa*. Tučně jsou označeny mykorhizní houby, kurzívou jsou pravděpodobní houboví endofyty. Vysvětlivky: NPR ZpH – Národní přírodní rezervace Zahrady pod Hájem, NPR C – Národní přírodní rezervace Čertoryje, OTU – operační taxonomické jednotky. U protokormů je uveden počet rámečků, ze kterých protokormy pochází.

Stádium	Komplex	Čeleď	OTU	Počet jedinců/ počet rámečků
Protokormy	NPR ZpH	Tulasnellaceae	5	3/1
	NPR ZpH	Sebacinaceae	5	1/1
	NPR ZpH	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	/	2/1
	NPR ZpH	<i>Alternaria</i> sp.	/	1/1
Dospělci	NPR C	<i>Mortierella</i> sp.	/	1
	NPR ZpH	<i>Malassezia</i> sp.	/	2
	NPR ZpH	<i>Ilyonectria</i> sp.	/	1
	NPR C	<i>Ascochyta</i> sp.	/	1

3.1.5 *Neottia ovata*

Průběh klíčení

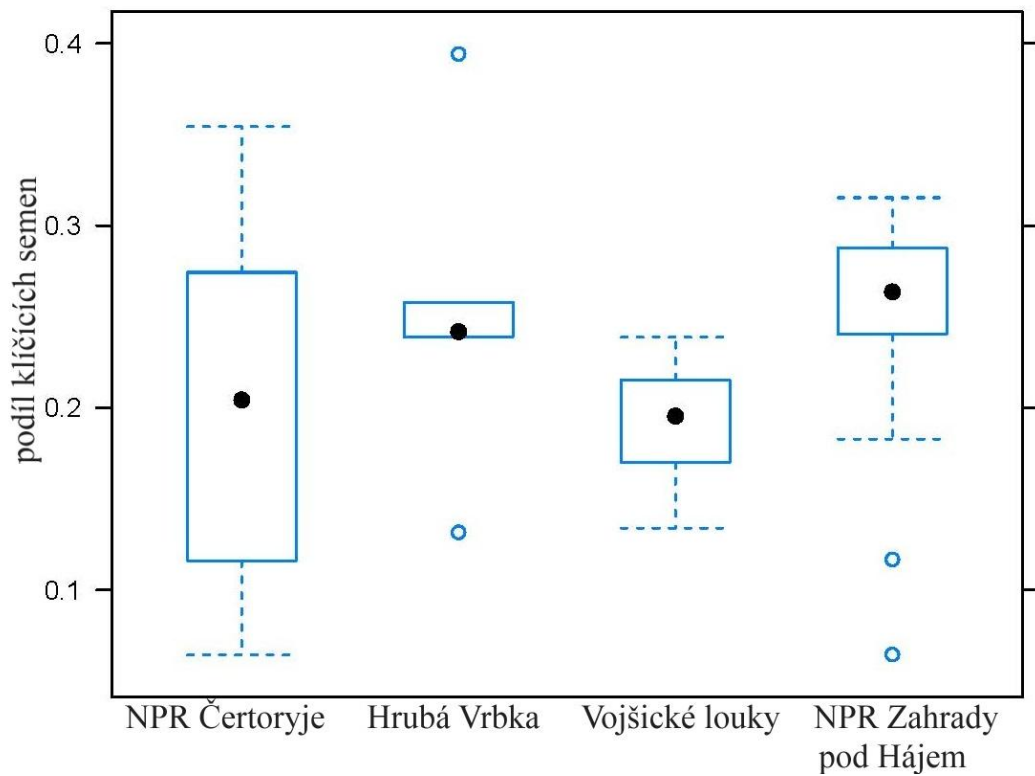
Klíčící semena *N. ovata* byla v sítkách nalezena již po 7 měsících v půdě, při druhém odběru se klíčivost mírně zvýšila, byl také zaznamenán větší počet nalezených protokormů (Tab. XVI). Klíčící semena a protokormy byly nalezeny ve všech komplexech i plochách (Tab. XVI). Fotografie vybraných protokormů nalezených na zkoumaných loukách uvádí příloha č. 5. Komplexy se nelišily v žádném z testovaných parametrů (Tab. XVII., obr. 15). Podobně, různě staré obnovené louky se v podílu klíčících semen rovněž nelišily (obr. 16).

Tab. XVI: Klíčení semen u druhu *Neottia ovata*. Tabulka zahrnuje sběr po 7 a 12 měsících v půdě. Vysvětlivky: **klíčící [%]** – procentuální zastoupení klíčících semen; **neklíčící [%]** – procentuální zastoupení neklíčících semen; **mortalita [%]** – procentuální zastoupení mrtvých semen

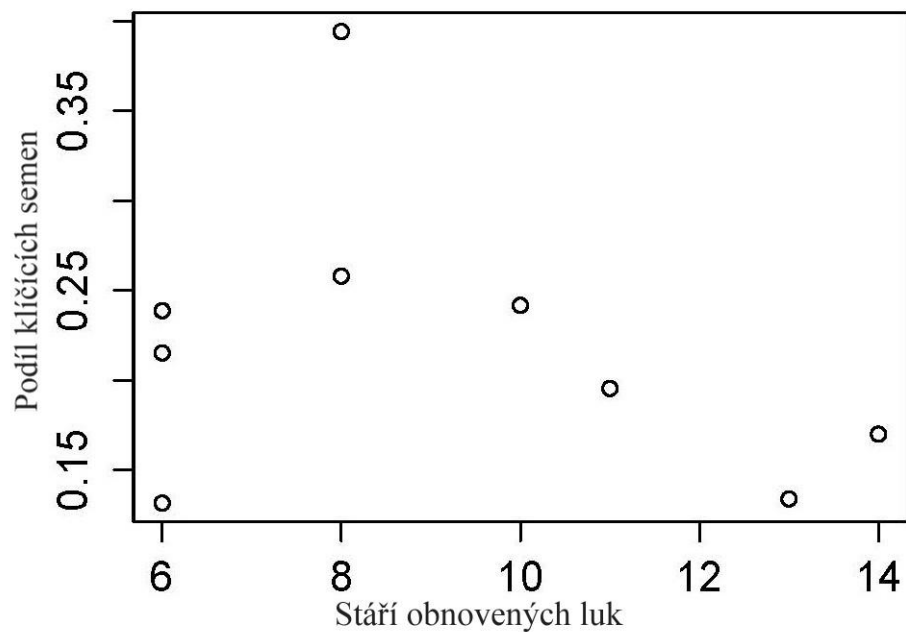
Komplex	klíčící [%]		neklíčící [%]		mortalita [%]		počet protokormů	
	7	12	7	12	7	12	7	12
Inkubace v půdě [měsíc]	7	12	7	12	7	12	7	12
Vojšické louky	6,3	18,5	52,0	43,9	41,6	36,6	13	81
Hrubá Vrba	8,7	24,7	53,7	36,0	37,6	37,8	12	127
NPR Čertoryje	17,6	19,7	46,7	26,2	35,7	54,1	0	1
NPR Zahr. p. Hájem	10,9	24,7	49,7	23,0	39,3	52,4	9	35

Tab. XVII Výsledky testů vlivu komplexu a stáří lokality na množství klíčících semen (*klicici*), celkový podíl rámečků s protokormy (*proto/celkem*), průměrné počty protokormů na plochu (*proto_mean*) a velikosti největšího protokormu získaného z plochy (*size_max*) po 12 měsících v půdě u druhu *Neottia ovata*.

Vysvětlující			Výsledky testů					reziduály		
			DF	Sum sq.	Mean sq.	F	p	DF	Sum sq.	Mean sq.
<i>Komplex</i>	1	<i>klicici</i>	3	0.02	0.01	1.45	0.24	35	0.21	0.01
	2	<i>proto/celkem</i>	3	0.38	0.12	2.22	0.10	36	2.05	0.05
	3	<i>proto_mean</i>	3	5.89	1.96	2.78	0.09	10	7.04	0.70
	4	<i>size_max</i>	2	0.17	0.08	0.39	0.69	6	1.32	0.22
			Výsledky testů							
<i>Stáří</i>			Mult. R-sq			Adj. R-sq		F	DF	p
	1	<i>klicici</i>	0.12			0.01		1.10	1, 8	0.32
	2	<i>proto/celkem</i>	0.1631			0.0		1.55	1, 8	0.24
	3	<i>proto_mean</i>	0.10			-0.06		0.61	1, 5	0.46
4	<i>size_max</i>	0.53			0.38		3.46	1, 3	0.15	



Obr. 15 Box and whisker diagram znázorňující podíl klíčících semen druhu *Neottia ovata* na studovaných lokalitách. Vysvětlivky: Černá tečka: medián, box plot: 3. a 1. kvartil, whiskers: maximální a minimální hodnoty bez outlierů, prázdné modré tečky: outliers. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 16 Diagram znázorňující podíl klíčících semen *Neottia ovata* na různě starých obnovených loukách. Data po 12 měsících v půdě

Analýza houbových symbiontů

Mykorhizní houby byly detekovány u šesti protokormů z osmi, přičemž byly nalezeny tři Tulasnellaceae OTU a jediné Sebacinaceae OTU. Tyto protokormy pocházely z obou komplexů obnovených luk (Tab. XVIII). U zbylých dvou protokormů z komplexu přirozených luk byly zjištěny houbové endofyti *Piloderma* a Corticiaceae sp.

Tab. XVIII. Druhy hub zjištěné v protokormech a kořenech tří dospělých jedinců u druhu *Neottia ovata*. Tučně jsou označeny mykorhizní houby, kurzívou jsou pravděpodobní houbové endofyti. Vysvětlivky: NPR ZpH - Národní přírodní rezervace Zahrady pod Hájem, NPR C – Národní přírodní rezervace Čertoryje, VL – Vojšické louky, HV – Hrubá Vrbka, OTU – operační taxonomické jednotky. U protokormů je uváděn počet rámečků, ze kterých protokormy pochází.

Stádium	Komplex	Plocha	Čeleď	OTU	Počet jedinců/ počet rámečků
Protokormy	HV	7	Tulasnellaceae	1	1/1
	VL	1	Tulasnellaceae	2	1/1
	HV	7	Tulasnellaceae	13	1/1
	HV	7	Sebacinaceae	19	3/1
	VL	1	Sebacinaceae	19	2/1
	NPR ZpH	/	<i>Piloderma</i> sp.	/	1/1
	NPR ZpH	/	<i>Corticiaceae</i> sp.	/	1/1

3.1.6 *Platanthera bifolia*

Klíčící semena *P. bifolia* byla v sítkách nalezena již po 7 měsících v půdě, při druhém odběru se klíčivost mírně zvýšila (Tab. XIX). Klíčící semena byla nalezena ve všech komplexech i plochách, protokormy pouze na obnovených loukách a v NPR Zahrady pod Hájem. Fotografie vybraných protokormů nalezených na zkoumaných loukách uvádí příloha č. 6. Byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v celkové klíčivosti mezi komplexy (Tab. XX, obr. 17). Nebyl zjištěn průkazný rozdíl mezi testovanými komplexy v podílu rámečků s protokormy (*proto/celkem*)(Tab. XX). Různě staré obnovené louky se v podílu klíčících semen nelišily (obr. 18).

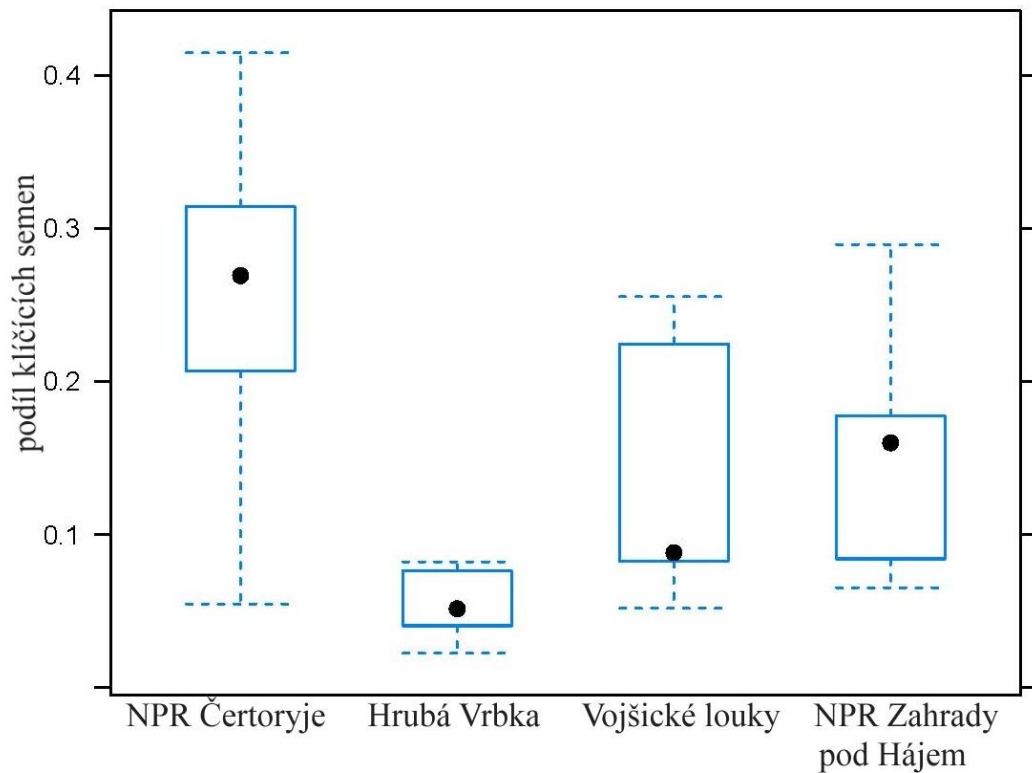
Tab. XIX Klíčení semen u druhu *Platanthera bifolia*. Tabulka zahrnuje sběr po 7 a 12 měsících v půdě. Vysvětlivky: **klíčící [%]** – procentuální zastoupení klíčících semen; **neklíčící [%]** –

procentuální zastoupení neklíčících semen; **Mortalita [%]** – procentuální zastoupení mrtvých semen.

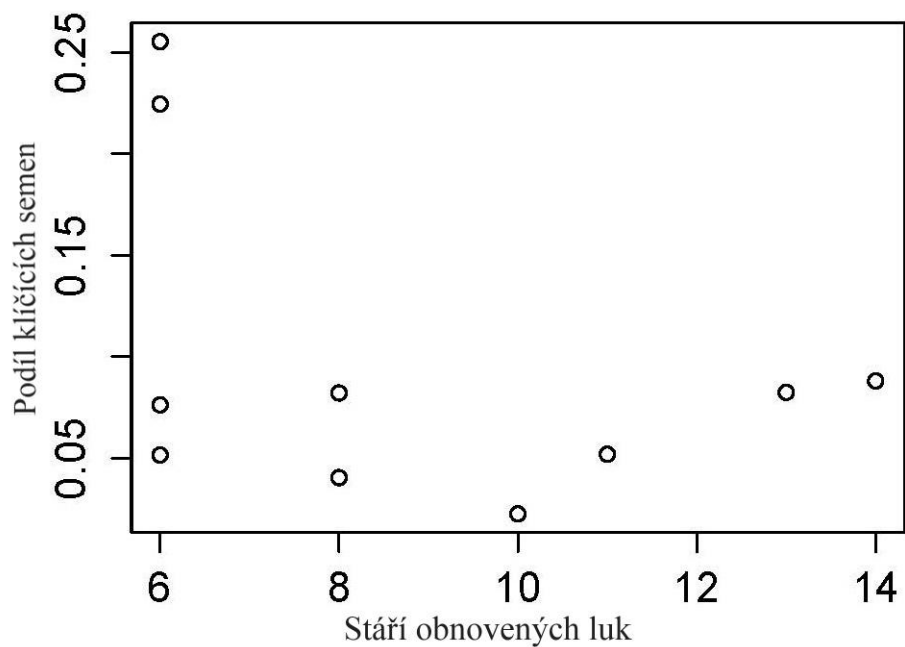
Komplex	klíčící [%]		neklíčící [%]		mortalita [%]		počet protokormů	
	7	12	7	12	7	12	7	12
Inkubace v půdě [měsíc]	7	12	7	12	7	12	7	12
Vojšické louky	9,7	14,0	45,5	45,2	44,9	40,7	1	0
Hrubá Vrbka	4,0	5,4	55,7	58,4	40,3	36,1	0	5
NPR Čertoryje	16,2	25,4	42,0	35,0	41,9	39,6	0	0
NPR Zahr. p. Hájem	11,7	14,6	47,0	35,9	42,3	49,5	1	43

Tab. XX. Výsledky testů vlivu *komplexu* a *stáří* lokality na množství klíčících semen (*klicici*) a celkový podíl rámečků s protokormy (*proto/celkem*) po 12 měsících v půdě u druhu *Platanthera bifolia*.

Vysvětlující			Výsledky testů					reziduály		
			DF	Sum sq.	Mean sq.	F	p	DF	Sum sq.	Mean sq.
<i>Komplex</i>	1	<i>klicici</i>	3	0.18	0.06	8.95	0.01	35	0.24	0.01
	2	<i>proto/celkem</i>	3	1.00	0.33	5.40	0.01	36	2.23	0.06
			Výsledky testů							
<i>Stáří</i>			Mult. R-sq			Adj. R-sq		F	DF	p
	1	<i>klicici</i>	0.09			-0.02		0.80	1, 8	0.39
Komplex (Tukey HSD test)			<i>klicici</i>		<i>proto_celkem</i>					
			diff	p	diff		p			
Hrubá Vrbka vs. NPR Čertoryje			-0,19	0,01	0,03		0,99			
Vojšické louky vs. NPR Čertoryje			-0,11	0,06	0,00		1,00			
NPR Zahrady pod Hájem vs. NPR Čertoryje			-0,11	0,01	0,33		0,01			
Vojšické louky vs. Hrubá Vrbka			0,08	0,37	-0,33		0,99			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Hrubá Vrbka			0,08	0,21	0,30		0,11			
NPR Zahrady pod Hájem vs. Vojšické louky			0,08	1,00	0,33		0,06			



Obr. 17 Box and whisker diagram znázorňující podíl klíčících semen druhu *Platanthera bifolia* na studovaných lokalitách. **Vysvětlivky:** Černá tečka: medián, box plot: 3. a 1. kvartil, whiskers: maximální a minimální hodnoty bez outlierů, prázdné modré tečky: outliers. Data po 12 měsících v půdě.



Obr. 18 Diagram znázorňující podíl klíčících semen *Platanthera bifolia* na různě starých obnovených loukách. Data po 12 měsících v půdě.

Analýza houbových symbiontů

U druhu *P. bifolia* bylo celkem analyzováno šest protokormů a kořeny z pěti dospělých jedinců z komplexů přirozených luk. Stejně mykorhizní houby byly detekovány jak u čtyř protokormů, tak u jednoho dospělého jedince (Tulasnellaceae OTU2; Tab. XXI). U zbylých čtyř dospělých jedinců byli zjištěni houboví endofyti (Tab. XXI).

Tab. XXI. Druhy hub zjištěné v protokormech a kořenech tří dospělých jedinců u druhu *Platanthera bifolia*. Tučně jsou označeny mykorhizní houby, kurzívou jsou pravděpodobní houboví endofyti. Vysvětlivky: NPR ZpH – Národní přírodní rezervace Zahrady pod Hájem, NPR C – Národní přírodní rezervace Čertoryje, OTU – operační taxonomické jednotky. U protokormů je uváděn počet rámečků, ze kterých protokormy pochází.

Stádium	Komplex	Čeď	OTU	Počet jedinců/ počet rámečků
Protokormy	NPR ZpH	Tulasnellaceae	2	4/4
Dospělci	NPR C	Tulasnellaceae	2	1
	NPR C	<i>Lycoperdon</i> sp.	/	1
	NPR C	<i>Malassezia</i> sp.	/	1
	NPR ZpH	<i>Malassezia</i> sp.	/	1
	NPR C	<i>Epicoccum</i> sp.	/	1
	NPR ZpH	<i>Chytridiales</i>	/	1

4. DISKUZE

4.1 Průběh klíčení na obnovených a kontrolních loukách

Ve své diplomové práci jsem se zabýval klíčivostí šesti druhů orchidejí (*Gymnadenia conopsea* subsp. *conopsea*, *Anacamptis pyramidalis*, *Neottia ovata*, *Platanthera bifolia*, *Orchis militaris* a *Traunsteinera globosa*), které byly zasazeny do půdy na podzim roku 2013. V roce 2014 (jaro a podzim) byly rámečky vytaženy z půdy a zkontrolovány. U všech druhů bylo zjištěno počáteční stádium klíčení (nabobtnalé embryo s rhizoidy), a to na obnovených i kontrolních loukách. Pokročilé stádium klíčení (mykorhizní stav semene neboli protokorm) bylo na obnovených loukách zaznamenáno jen u tří druhů (*G. conopsea* subsp. *conopsea*, *N. ovata*, *P. bifolia*), na kontrolních plochách byly protokormy zaznamenány u všech studovaných druhů.

Z celkového hlediska se podíl klíčících semen nelišil mezi obnovenými a kontrolními loukami, pouze u některých druhů orchidejí bylo zaznamenáno průkazně větší množství klíčících semen, a to buď na kontrolní louce NPR Zahrady pod

Hájem, nebo v NPR Čertoryje. Co se týče podílu rámečků s přítomností protokormů a jejich průměrného počtu na plochu lze říci, že protokormy se s větší pravděpodobností vyskytovaly v rámečcích na kontrolních plochách (především NPR Zahrady pod Hájem u druhů *A. pyramidalis*, *O. militaris*, *P. bifolia*), pouze druh *G. conopsea* měl průkazně větší průměrný počet protokormů na plochu na obnovených loukách.

Bylo zjištěno, že pouze dva druhy orchidejí (*G. conopsea* a *N. ovata*) tvořily na obnovených loukách ve větší míře semenáčky ve fázi protokormu. Z rozšíření těchto druhů v CHKO Bílé Karpaty víme, že to jsou velmi časté druhy květnatých luk oproti ostatním druhům – *P. bifolia*, *O. militaris*, *T. globosa*, které se v Bílých Karpatech vyskytují roztroušeně, nebo druh *A. pyramidalis*, který se vyskytuje pouze vzácně, a to v jihozápadní části s těžištěm výskytu v NPR Čertoryje (Jongepier & Pechanec, 2006).

Klíčivost semen a počet vytvořených protokormů v této studii byl výrazně vyšší než v mé bakalářské práci (inkubace semen v půdě obnovených luk v letech 2010 a 2011), kdy výrazněji klíčily pouze dva druhy *A. pyramidalis* a *G. conopsea*, avšak téměř bez přítomnosti protokormů (byly nalezeny pouze dva protokormy u *A. pyramidalis*). Ostatní druhy tehdy klíčily velmi málo (*P. bifolia* a *O. militaris*) nebo vůbec (*T. globosa* a *N. ovata*) (Sucháček, 2013). Možných důvodů tohoto rozdílu je více. Semena všech druhů sazených v roce 2010 měla výrazně horší životaschopnost semen. Při klíčení semen vyšetých v roce 2014 jsem však žádný výrazný pokles životaschopnosti semen nezaznamenal. Dalším důvodem může být období zasazení rámečků do půdy. V roce 2010 byla semena sázena do půdy až koncem listopadu zatímco semena z roku 2014 byla vysazena už v půlce října, tudíž byla skladována kratší dobu.

Obnovené a kontrolní louky se pohledově lišily strukturou půdy. Na obnovených loukách byla půda spíše hutnější oproti půdě na přirozených stanovištích, která se zdála spíše drolivější, propustnější (tento faktor je však pouze vypořádaný z odběrů rámečků z půdy – není potvrzen rozborem půdy). Wright *et al.*, 2007 zjistili, že struktura půdy silně ovlivňuje schopnost semen dostat se do požadované hloubky a tím, úspěšně vyklíčit; či může ovlivňovat šíření houbových mycelií (Otten *et al.*, 2001).

Dalším faktorem limitujícím klíčení na obnovených loukách může být vlhkost půdy. Při odběru rámečků na obnovených loukách byly síťky se semeny výrazně

sušší oproti rámečkům z přirozených stanovišť, kde byly rámečky mnohem vlhčí. Z literatury víme, že teplota a vlhkost jsou jedny z klíčových faktorů při klíčení orchidejových semen. Během sezóny se tyto faktory mění, tím vzniká pouze krátký časový úsek mezi zráním semen a ztrátou životaschopnosti, kdy mohou rostliny vyklíčit (Batty *et al.*, 2001). Není také známo, zdali má vlhkost nepřímý vliv na klíčení semen nebo přímý vliv na symbiotickou houbu (Scott & Carey, 2002; Diez, 2007).

Faktory ovlivňující klíčení semen nemusí mít pouze abiotický charakter. Na obnovených loukách bylo v malé míře (9 sítěk) zjištěna přítomnost predátorů, kteří požírali semena orchidejí. Tento faktor může v přirozených podmínkách ovlivňovat klíčení semen – v mém pokusu byla semena alespoň částečně chráněna síťovinou, tím byla zajištěna nepřístupnost predátorů větších než 42 μm (průměr oka na síťovině). V přirozených podmínkách, tak predátoři či parazité rostlin nebo hub můžou mít vliv na klíčení semen (McCormick *et al.*, 2013).

Struktura půdy, vlhkost či predátoři a paraziti mohou limitovat klíčení orchidejí na obnovených loukách v Bílých Karpatech.

Studii zabývajících se klíčením vstavačovitých rostlin na obnovených lučních společenstvech nebylo dosud mnoho publikováno. Existuje práce De Herta *et al.*, (2012), ve které zkoumali tři druhy vstavačovitých rostlin (*Dactylorhiza praetermissa*, *D. fuchsii*, *Herminium monorchis*) na obnovených dunách. Autoři zjistili, že tyto druhy na obnovených plochách klíčí a dokonce tvoří i mykorhizní stav semen (protokorm), a to i na stanovištích bez výskytu dospělých jedinců. Studie pocházející ze severovýchodního Estonska se zabývala identifikací houbových symbiontů orchidejí (*Epipactis atrorubens*, *Orchis militaris*, *Dactylorhiza baltica*) v těžbou narušených břidlocových dolech (Shefferson *et al.*, 2008). Srovnávali houbové symbionty na antropogenně narušených místech a přirozených stanovištích výskytu. Zjistili, že orchideoidní mykorhizní houby se vyskytují i na místech bezprostředně po těžbě.

Z výše uvedeného je patrné, že se vstavačovité rostliny mohou vyskytovat i na místech narušených antropogenními vlivy a pokud to podmínky stanoviště a přísun semen dovolují, tak narušené plochy rychle kolonizují.

4.2 Průběh klíčení na obnovených loukách různého stáří

Během pokusu nebyly zaznamenány rozdíly v průběhu klíčení a v množství vytvořených protokormů mezi obnovenými loukami různého stáří u žádného ze zkoumaných druhů. Protože semena vstavačovitých rostlin potřebují k úspěšnému vyklíčení přítomnost mykorhizních hub (Gryndler, 2004), zdá se, že vhodné mykorhizní houby musí být na obnovených loukách přítomné již krátce po rekultivaci orné půdy.

Bylo by zajímavé se v budoucnu zaměřit na prozkoumání diverzity orchideoidních hub na různě starých obnovených loukách pomocí moderních molekulárních metod (sekvenování nové generace, Real-time PCR) a tím zjistit zda se liší spektrum a abundance mykorhizních hub na různě starých obnovených loukách.

4.3 Mykorhizní asociace studovaných druhů

Druhy *A. pyramidalis*, *G. conopsea* a *P. bifolia* převážně tvořily mykorhizní symbiózu s houbami čeledi Tulasnellaceae. Druhy *O. militaris*, *T. globosa* a *N. ovata* tvořily symbiózu převážně s houbami čeledí Tulasnellaceae i Sebacinaceae. Tato skutečnost odpovídá poznatkům z dostupných studií na stejných či příbuzných druzích orchidejí: *Anacamptis laxiflora* – Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae (Girlanda *et al.*, 2011), *Anacamptis morio* – Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae (Jacquemyn *et al.*, 2012), *Gymnadenia conopsea* – Tulasnellaceae a Ceratobasidiaceae, Pezizales (*Peziza*, *Terfezia*, *Morchella*, *Geopyxis*, *Wilcoxina*), Lyophyllaceae, Serpulaceae a Hymenochaetaceae) (Těšitelová *et al.*, 2013), *Orchis mascula* – Tulasnellaceae (Jacquemyn *et al.*, 2012), *Neottia ovata* – Sebacinaceae (dominantní skupina), Tulasnellaceae a Ceratobasidiaceae (Kotlínek *et al.*, 2015), Russulaceae, Thelephoraceae, Atheliaceae (Těšitelová *et al.*, 2015), *Platanthera bifolia* – Ceratobasidiaceae, Thanatephorus, Tulasnellaceae, Sebacinaceae (Filipello, *et al.*, 1985), *Leptodontidium orchidicola* (Rasmussen, 1995).

Z výše uvedených studií je patrné, že u mých vzorků nebyly zanedbány houby ze skupiny Ceratobasidiaceae, tuto skutečnost přisuzuji malému počtu analyzovaných vzorků.

5. ZÁVĚR

Výsledky diplomové práce, které jsou založené na sledování klíčivosti šesti druhů orchidejí (*Gymnadenia conopsea subsp. conopsea*, *Anacamptis pyramidalis*, *Neottia ovata*, *Platanthera bifolia*, *Orchis militaris* a *Traunsteinera globosa*) na 10 obnovených loukách v CHKO Bílé Karpaty (Malá Vrbka - Vojšické louky a Hrubá Vrbka) a dvou kontrolních loukách (NPR Čertoryje a NPR Zahrady pod Hájem), naznačují, že většina druhů má potenciál se uchytit na obnovených loukách.

- U všech druhů bylo zjištěno počáteční stádium klíčení (nabobtnalé embryo s rhizoidy), a to na obnovených loukách i kontrolních loukách.
- Pokročilé stádium klíčení (mykorhizní stav semene - protokorm) bylo na obnovených loukách zaznamenáno u tří druhů (GC, NO, PB), na kontrolních plochách byly protokormy zaznamenány u všech druhů (AP, GC, NO, OMi, TG, PB).
- Během analýz byly zjištěny jako dominantní mykorhizní druhy hub u druhu AP, GC, PB houby z čeledi Tulasnellaceae. U druhů OMi, TG, NO to byly kromě hub z čeledi Tulasnellaceae také zástupci z čeledě Sebacinaceae. Zároveň bylo také zjištěno velké množství endofytických nemýkorhizních hub.

Další výzkum by bylo vhodné směřovat k analýzám DNA houbových symbiontů z půdních vzorků v blízkosti rámečků se semeny a tím potvrdit či vyvrátit přítomnost symbiotických hub na cílových lokalitách. Rovněž by bylo vhodné v průběhu sezony měřit fyzikální vlastnosti prostředí (odběry půd, měření vlhkosti, teploty apod.). Tímto přístupem bychom mohli objasnit absenci klíčení a tvorbu protokormů na loukách, kde semena klíčila málo nebo zde netvořila žádné protokormy.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. – *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Barsberg S., Rasmussen H. N., Kodahl N. (2013): Composition of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) seeds analyzed by attenuated total reflectance IR spectroscopy: in search of understanding longevity in the ground. – *American Journal of Botany* 100: 2066-2073.
- Batty A. L., Dixon K. W., Brundrett M., Sivasithamparam K. (2001): Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushl &. – *New Phytologist* 152: 511-520.
- Bernard N. (1909): L'évolution dans la symbiose des orchidées et leur champignons commensaux. – *Annales des Sciences Naturelle Paris*, 9. sér., 9: 1-196.
- Bidartondo M. I. (2005): The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. – *New Phytologist* 167: 335-352.
- Cameron D. D., Leake J. R., Read D. J. (2006): Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant – fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. – *New Phytologist* 171: 405-416.
- Cribb P. J., Kell S. P., Dixon K. W., Barrett R. L. (2003): Orchid conservation: a global perspective. – *Natural History Publications*, Kota Kinabalu, Malaysia. pp 1-24.
- De hert K., Jacquemyn H., Provoost S., Honnay O. (2012): Absence of Recruitment Limitation in Restored Dune Slacks Suggests That Manual Seed Introduction Can Be a Successful Practice for Restoring Orchid Populations. – *Restoration ecology* 21: 159-162

- Dearnaley J. D. W., Martos F., Selosse M. A. (2012): Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. – *The Mycota* 9, 207-230.
- Diez J. M. (2007): Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. – *Journal of Ecology* 95: 159-170.
- Downie D. G. (1957): *Corticium solani* – an orchid endophyte. – *Nature* 179: 160.
- Drummond A. J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R. (2012). Geneious v8.0.5. <http://www.geneious.com>.
- Dutra D., Kane M. E., Richardson L. (2009): Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. – *Plant Cell Tissue Culture* 96: 235-243.
- Eriksson O., Kainulainen K. (2011): The evolutionary ecology of dust seeds. – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic* 13: 73-87.
- Filipello M. V., Berta G., Fontana A., Marzetti M. F. (1985): Endophytes of wild Orchids native to Italy: Their morphology, caryology, Ultrastructure and cytochemical characterization. – *New Phytologist* 100: 623–641.
- Fisch M. H., Brigitta H. F., Arditti J. (1973): Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. – *Phytochemistry* 12: 437-441.
- Gäumann E., Nuesch J., Rimpau R. H. (1960): Weitere Untersuchungen über die chemische Abwehrreaktionen der Orchideen. – *Phytopathologische Zeitschrift* 38: 274-308.

- Gebauer G., Meyer M. (2003): ^{15}N and ^{13}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., Segreto R., Cafasso D., Liebel H. T., Rodda M., Ercole E., Cozzolino S., Gebauer G., Perotto S. (2011): Photosynthetic mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. – *American Journal of Botany* 98: 1148-1163.
- Grulich V. (2012): Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. – *Preslia* 84: 631–645.
- Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J., Vosátka M. (2004): Mykorhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin. – Academia, Praha.
- Hashimoto Y., Fukukawa S., Kunishi A., Suga H., Richard F., Sauve M., Selosse M. A. (2012) Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. – *New Phytologist*, 195, 620–630.
- Hu Z., Huang Q. (1994): Induction and accumulation of the antifungal protein in *Gastrodia elata*. – *Acta Botanica Yunnanica* 16: 169-177.
- Hughes K. W., Petersen R. H., Lickey E. B. (2009). Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for enviromental species delimitation across basidiomycete fungi. – *New Phytologist* 182: 795 - 798.
- Chytrý M. (2007): Vegetace České republiky 1. Travinná a keříčková vegetace / Vegetation of the Czech Republic 1. Grassland and Heathland Vegetation. – Academia, Praha, 525 pp.
- Jacquemyn H., Honnay O., Cammue B. P. A., Brys R., Lievens B. (2010): Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal

associations in five closely-related species of the genus *Orchis*. – *Molecular Ecology* 19: 4086-4095.

Jacquemyn H., Brys R., Lievens B., Wiegand T. (2012): Spatial variation in below-ground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species. – *Journal of Ecology* 100: 1328-1337.

Jersáková J. & Kindlmann P., (2004): *Zásady péče o orchidejová stanoviště*. – KOPP, České Budějovice.

Jongepier J. W. & Jongepierová I. (2006): *Komentovaný seznam cévnatých rostlin Bílých Karpat*. – ZO ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou.

Jongepier J. W. & Pechanec V. (2006): *Atlas rozšíření cévnatých rostlin CHKO Bílé Karpaty*. – ZO ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou.

Jongepierová I. (ed.) (2008): *Louky Bílých Karpat (Grasslands of the White Carpathian Mountains)* – ZO ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou, 421.

Jongepierová I., Pešout P., Jongepier J. W., Prach K. (2012): *Ekologická obnova v České republice*. Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha.

Joppa L. N., Roberts D. L., Pimm S. L., (2011): How many species of flowering plants? – *Proceedings of the Royal Society of London B*. 278: 554-559.

Katoh F. (2010): Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. – *Bioinformatics* 26: 1899-1900.

Klimeš L. (1997): *Druhové bohatství luk v Bílých Karpatech*. Sborn. Přír. Klubu Uherské Hradiště 2: 31-42.

- Konvička M., Čížek L., Beneš J. (2006) Ohrožený hmyz nížinných lesů: ochrana a management. – Sagittaria, Olomouc.
- Kottke I., Suarez J. P., Herrera P., Cruz D., Bauer R., Haug I., Garnica S. (2010): Atractiellomycetes belonging to the 'rust' lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids. – Proceedings of the Royal Society B 277: 1289-1298.
- Leake J. R. (1994): The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. – New Phytologist 127: 171-216.
- Liebel H. T. & Gebauer G. (2011): Stable isotope signatures confirm carbon and nitrogen gain through ectomycorrhizas in the ghost orchid *Epipogium aphyllum*. – Swartz. Plant Biology 13: 270-275.
- Mackovčín P., Jatiová M. (2002): Zlínsko, Chráněná území ČR, svazek II. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno, Brno, Praha.
- Marrs R. H. (1993): Soil fertility and nature conservation in Europe: theoretical considerations and practical management solutions. – Adv. Ecol. Res. 24: 242-300.
- Martos F., Munoz F., Paillet T., Kottke I., Gonneau C., Selosse M. A. (2012): The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. – Molecular Ecology 21: 5098–5109.
- McCormick M. K., Parker K. L., Szlavecz K., Whigham D. F. (2013): Native and exotic earth worms affect orchid seed loss. AoB Plants 5, doi:10.1093/aobpla/plt018.
- Merckx V. & Freudenstein J. V. (2010): Evolution of myco-heterotrophy in plants: a phylogenetic perspective. – New Phytologist 185: 607-610.

- Milne I., Lindner D., Bayer M., Husmeier D., McGuire G., Marshall F. D., Wright F. (2009): TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops.
- Motomura H., Selosse M. A., Martos F., Kagawa A., Yukawa T. (2010): Mycoheterotrophy evolved from mixotrophic ancestors: evidence in *Cymbidium* (Orchidaceae). – *Ann. Bot.* 106:573-581.
- Muller S., Dutoit T., Alard D., Grevilliot F. (1998): Restoration and rehabilitation of species-rich grassland ecosystems in France: a review. – *Restor. Ecol.* 6: 94-101.
- O'Donnell K. (1993): *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds D. R., Taylor J. W and eds. *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. – CAB International, Wallingford, USA. pp 225-233.
- Ogura-Tsujita Y., Yukawa T. (2008): *Epipactis helleborine* shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan. – *Mycorrhiza* 18: 331-338.
- Okayama M., Yamato M., Yagame T., Iwase K. (2012): Mycorrhizal diversity and specificity in *Lecanorchis* (Orchidaceae). – *Mycorrhiza* 22: 545-553.
- Otero J. T., Flanagan N. S., Herre E. A., Ackerman J. D., Bayman P. (2007): Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). – *American Journal of Botany* 94: 1944-1950.
- Otten W., Hall D., Harris K., Ritz K., Young I. M., Gilligan C. A. (2001). Soil physics, fungal epidemiology and the spread of *Rhizoctonia solani*. – *New Phytologist* 151: 459-468.

- Porebski S., Bailey G., Baum R. (1997): Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. – *Plant molecular reporter* 15: 8-15.
- Pridgeon A.M., Cribb P.J., Chase, M.W., Rasmussen F. (1999): *Genera Orchidacearum: Volume 1: General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae* - Oxford University Press, New York, United States.
- Procházka F. (1980): *Naše orchideje*. Krajské muzeum východních Čech, Pardubice, ČR.
- Procházka F. (2010): *Orchidaceae Juss. - vstavačovitě (orchideje)*. Eds: Štěpánková J., Chrtek J., Kaplan Z.: *Květena České republiky* 8. – Academia, Praha. 430.
- Rasmussen H. N., Whigham D. F. (1993): Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. – *American Journal of Botany* 80: 1374-1378.
- Rasmussen H. N. (1995): *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant* – Cambridge University Press, Great Britain.
- Rasmussen H. N., Whigham D. F. (2002): Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. – *New Phytologist* 154: 797-807.
- Rasmussen H. N., Rasmussen F. N. (2009): Orchid mycorrhiza: implications of amycophagous life style. – *Oikos* 118: 334-345.
- Rasmussen H. N. (2011): Methods of studying field germination and seedling physiology: present potential and drawbacks. – *European Journal of Environmental Sciences* 1: 55-59.

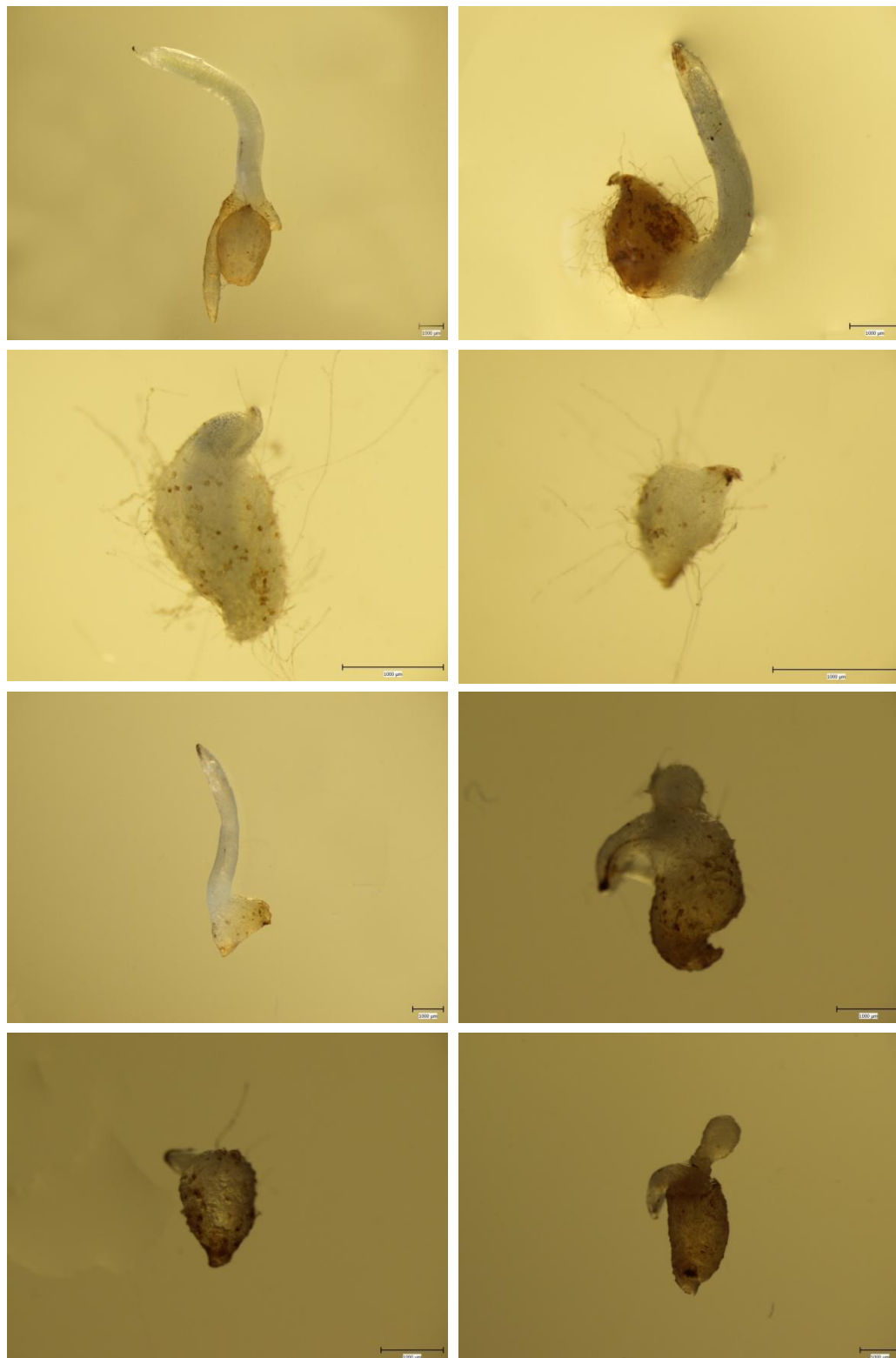
- Rasmussen H. N., Dixon W., Kingsley, Jersáková J., Těšitelová T. (2015): Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. – *Annals of Botany* 116: 391-402.
- Scott H. S., Carey P. (2002): The effects of water application on seed germination and infection in *Gymnadenia conopsea* under field conditions. In: P Kindlmann, D. F Whigham, J. H Willems, eds. Trends and fluctuations, and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations. Leiden: Bakkhuys Publishers, 155-165.
- Selosse M. A. & Le Tacon F. (1998): The land flora: a phototroph-fungus partnership? – *Trends in Ecology & Evolution* 13 (1): 15-20.
- Selosse M. A., Weiß M., Jany J. L., Tillier A. (2002): Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L. C. M. Rich. And neighbouring tree ectomycorrhizae. – *Molecular Ecology* 11: 1831-1844.
- Selosse M. A., Faccio A., Scappaticci G., Bonfante P. (2004): Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including Truffles. – *Microbial Ecology* 47: 416-426.
- Selosse M. A., Setaro S., Glatard F., Richard F., Urcelay C., Weiss M. (2007): Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. – *New Phytologist* 174: 864- 878.
- Selosse M. A, Roy M. (2009): Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. – *Trends in Plant Science* 14: 64-70.
- Shefferson R. P., Weiss M., Kull T., Tayllor D. E. (2005): High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. – *Molecular Ecology* 14: 613-626.

- Shefferson R. P., Kull T., Tali K. (2008): Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian Mine Tailings hills. – *American Journal of Botany* 95(2): 156 - 16.
- Smith S. E., Read D. J. (2008): *Mycorrhizal Symbiosis*, Third Edition. – Academic press, New York, USA.
- Stark C., Babik W., Durka W. (2009): Fungi from the roots of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. – *Mycological Research* 113: 952-959.
- Sucháček P. (2013): Klíčivost vybraných druhů vstavačovitých rostlin na obnovených loukách na území CHKO Bílé Karpaty. [Germination of selected species of Orchidaceae in the restored meadows in the Protected Area Bílé Karpaty. Bc. Thesis, in Czech]. – 60p., Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Taylor D. L., McCormick M. K. (2008): Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. – *New Phytologist* 117: 1020-1033.
- Těšitelová T., Těšitel J., Jersáková J., Říhová G., Selosse M. A. (2012): Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. – *American Journal of Botany* 99: 1020-1032.
- Těšitelová T., Jersáková J., Roy M., Kubátová B., Těšitel J., Urfus T., Trávníček P., Suda J. (2013): Ploidy-specific symbiotic interactions: divergence of mycorrhizal fungi between cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* group (Orchidaceae). – *New Phytologist* 199: 1022-1033.
- Těšitelová T., Kotlínek M., Jersáková J., Joly F. X., Košnar J., Tatarenko I., Selosse M. A. (2015): Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebaciales in various habitats and ontogenetic stages. – *Molecular Ecology*, 24: 1122-1134.

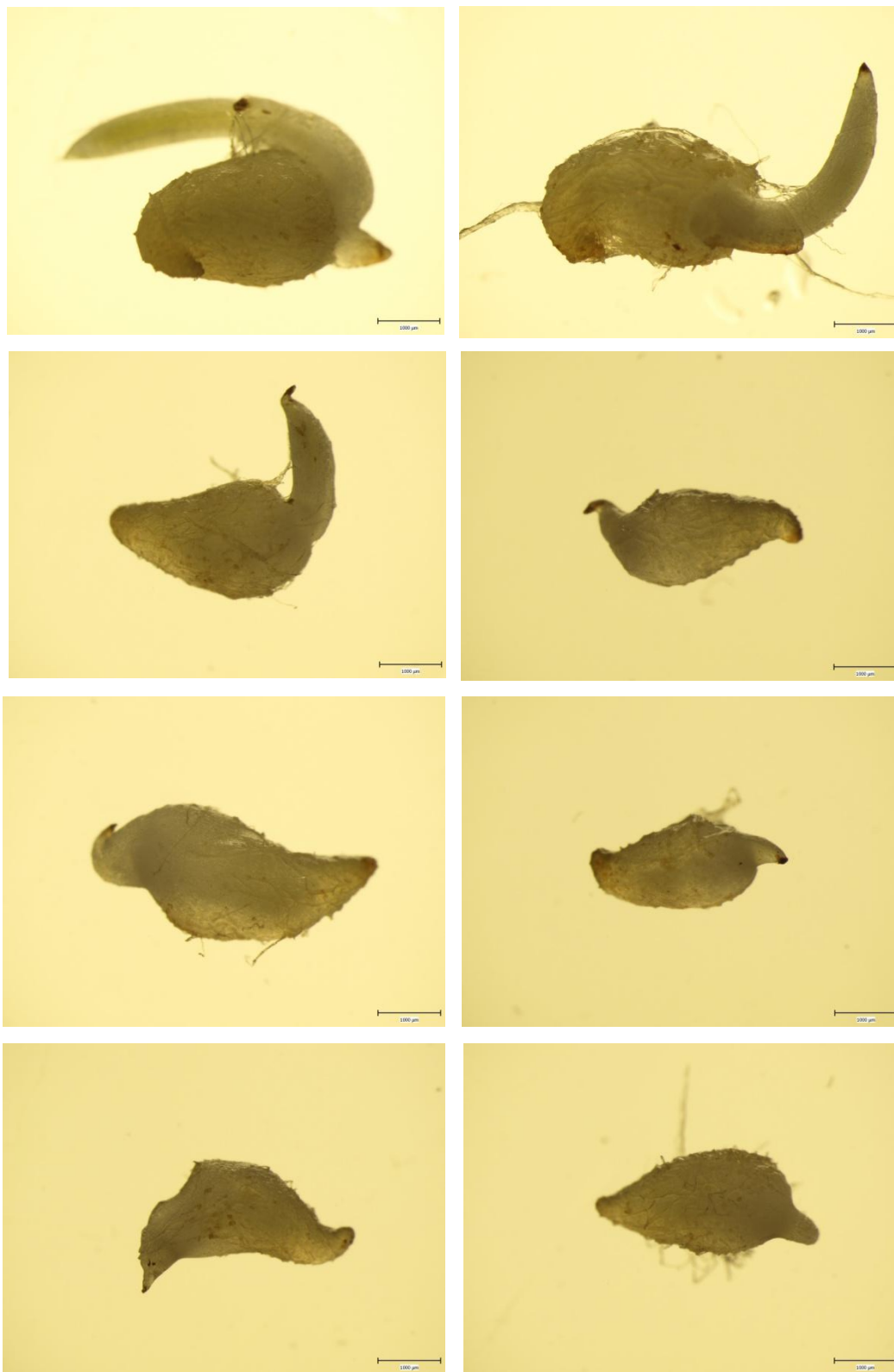
- Tlusták V. (1972): Xerothermní travinná společenstva lesostepního obvodu Bílých Karpat. Ms., dipl. pr., PřF MU, Brno.
- Tlusták V. (1975): Syntaxonomický přehled travinných společenstev Bílých Karpat. – Preslia 47: 129-144.
- Van der Kinderen G. (1995): A method for the study of field germinated seeds of terrestrial orchids. – Lindleyana 10: 68-73.
- Vasudevan R., Van Staden J. (2010): In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. – Scientia Horticulturae 123: 496-504.
- Vera F. W. M. (2000): Grazing Ecology and Forest History, CABI Publishing.
- Wang B., Qui Y. L. (2006): Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. – Mycorrhiza 16: 299-363.
- Weiss M., Selosse M. A., Rexer K. H., Urban A., Oberwinkler F. (2004): Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. – Mycological Research 108: 1003-1009.
- Wright M., French G., Cross R., Cousens R., Andrusiak S., McLean C. B. (2007): Site amelioration for direct seeding of *Caladenia tentaculata* improves seedling recruitment and survival in natural habitat. – Lankesteriana 7: 430-432.
- Zettler L. W., Poulter S. B., McDonald K. I. (2007): Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. – Hortscience 42: 135-139.
- Zi X. M., Sheng C. L., Goodale U. M., Shao S. C, Gao J. Y. (2014): In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). – Mycorrhiza 24: 487-499.

7. PŘÍLOHY

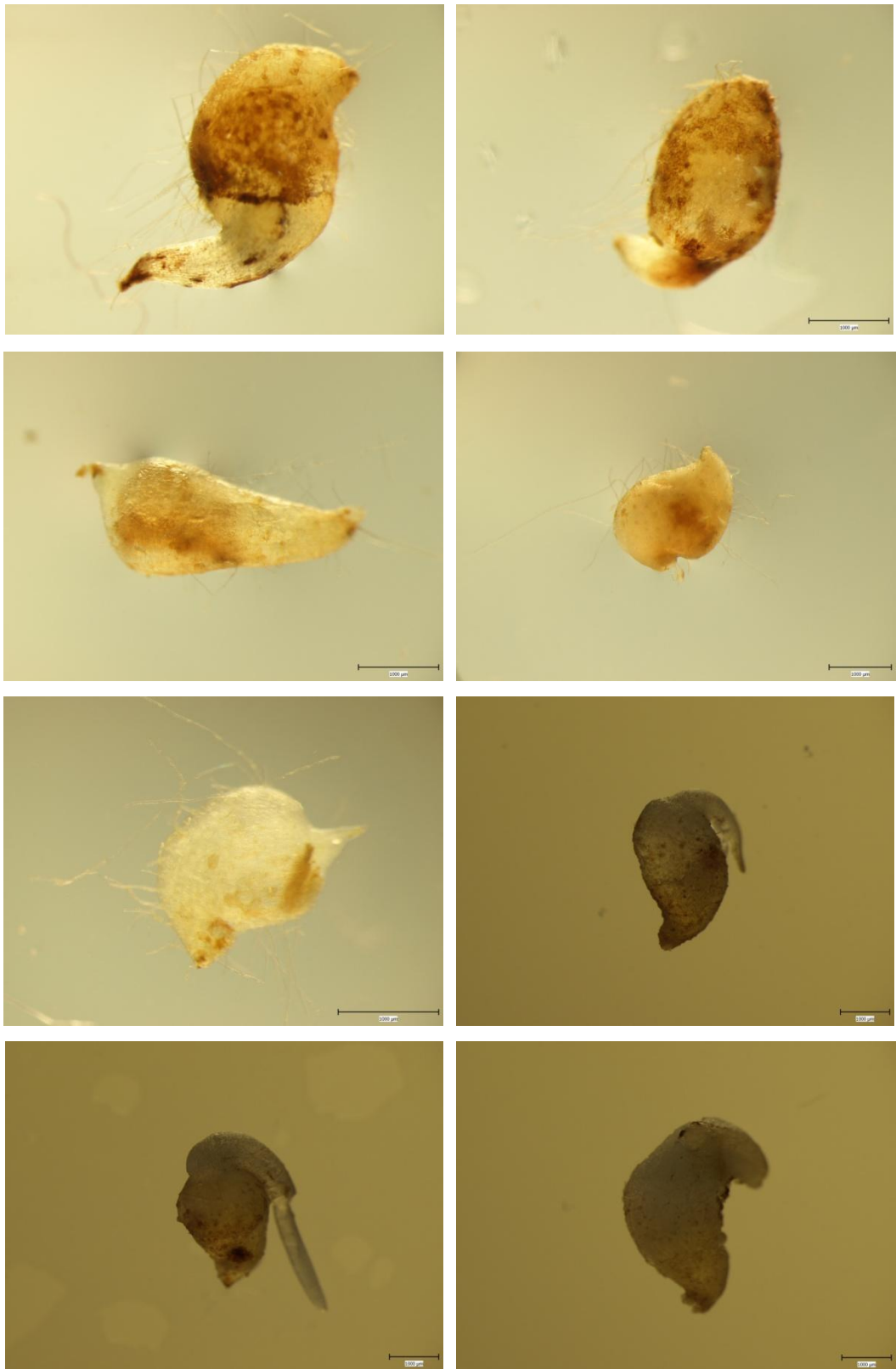
Příloha 1. Přehled nalezených protokormů u druhu *Anacamptis pyramidalis*.



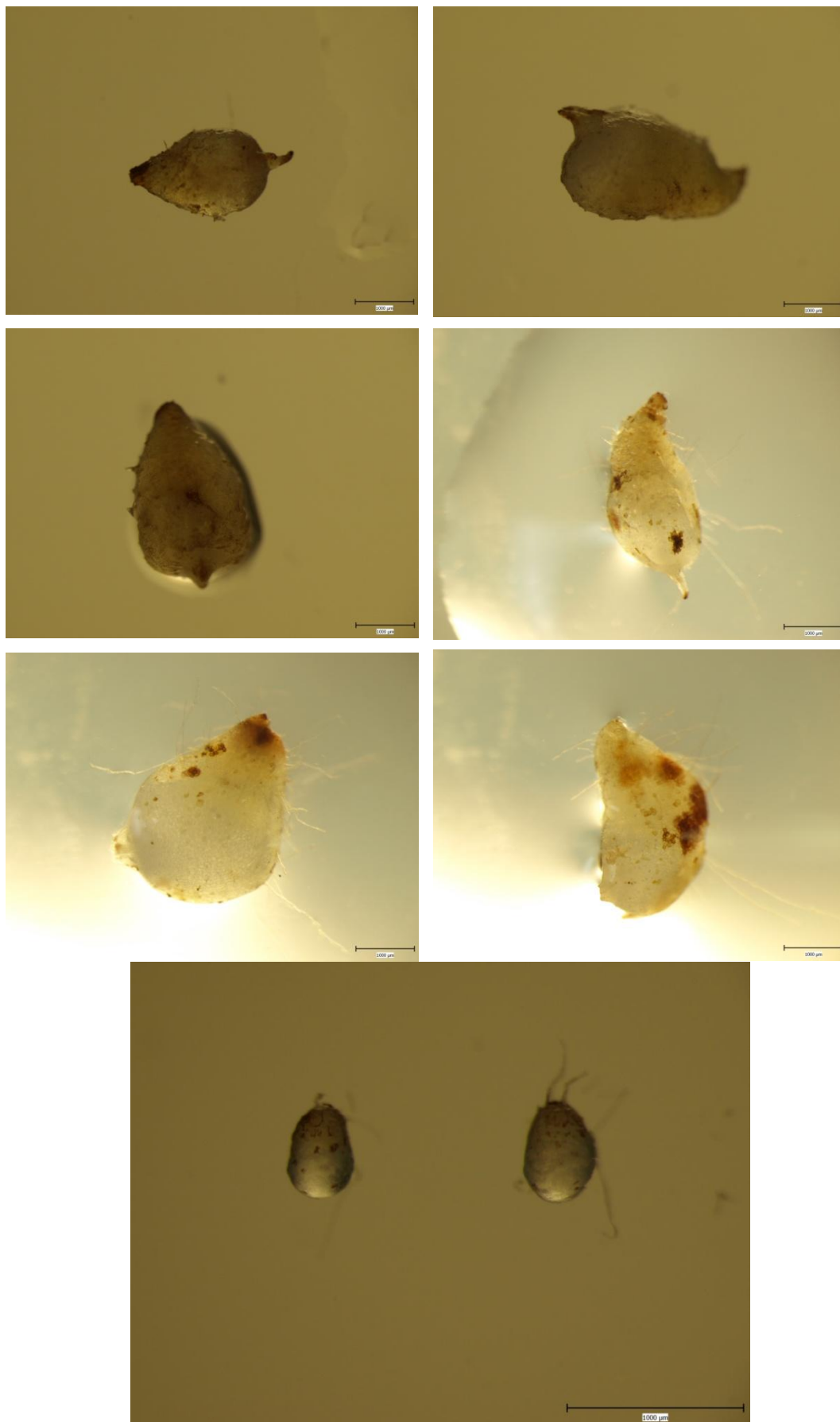
Příloha 2. Přehled části nalezených protokormů u druhu *Gymandenia conopsea*.



Příloha 3. Přehled nalezených protokormů u druhu *Orchis militaris*



Příloha 4. Přehled nalezených protokormů u druhu *Traunsteinera globosa*.



Příloha 5. Přehled nalezených protokormů u druhu *Neottia ovata*.



Příloha 6. Přehled nalezených protokormů u druhu *Platanthera bifolia*.

