Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Fyziologická a ekologická míra specificity orchidejí a mykorhizních hub

Bakalářská práce

Linda Šternerová

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

České Budějovice 2020

ŠTERNEROVÁ, L., 2020: Fyziologická a ekologická míra specificity orchidejí a mykorhizních hub. [Physiological and ecological rate of specificity orchids and mycorhizal fungis. Bc. Thesis, in Czech.] – 23 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:
Bakalářská práce se zaměřuje na problematiku specifičnosti mykorhizních hub u vybraných druhů z čeledi Orchidaceae. Práce je složena ze dvou částí, z literární rešerše a z návrhu vlastního vědeckého projektu.

Annotation:
The bachelor thesis focuses on the issue of specificity of mycorrhizal fungi in selected species of the Orchidaceae family. This thesis is composed of two parts, a literature review, and a scientific project proposal.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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.

České Budějovice, 18. 5. 2020

……

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především mé školitelce Janě Jersákové za vedení této práce, za každou radu, připomínku a čas, který mi věnovala i v této složité době. Dále bych chtěla poděkovat Alžbětě Novotné za připomínky a rady, které mi pomohly práci dokončit. V neposlední řadě děkuji svým blízkým za podporu a důvěru, kterou do mě během celého mého studia vkládali.

Obsah:

1. Literární rešerše....1
1.1 Úvod....1
1.2. Čeleď Orchidaceae a její ochrana....1
1.3. Komplikovaný životní cyklus orchidejí....3
1.4. Orchideoidní mykorhiza....4
1.4.1 Mykotrofní výživa....4
1.4.2 Houby uplatňující se v orchideoidní mykorhize....5
1.5. Specificita vztahu....6
1.6. Metody studia....8
1.6.1 Izolace hub do kultury....9
1.6.2 Klíčení semen *in vitro*....10
1.6.3 Symbiotické klíčení semen *in situ*....11
1.7. Využití pro ochranu přírody....13
2. Projektová část....14
2.1. Úvod....14
2.2. Cíle projektu a hypotézy....14
2.3. Metodika projektu....14
2.3.1 Výběr vhodné lokality pro projekt....14
2.3.2. Odebírání semen a kořenů....15
2.3.3. Kultivace mykorhizních hub....15
2.3.4. *In vitro* výsev....15
2.3.5. *In situ* výsev....16
2.3.6. Analýza a vyhodnocení projektu....16
2.4. Časový harmonogram projektu....17
2.5. Finanční rozpočet projektu....17
2.6. Spolupracující subjekty....18
3. Seznam literatury....19

1. Literární rešerše

1.1 Úvod

Orchideje jsou bezpochyby jednou z nejohroženějších skupin rostlin na světě (Fay, 2018). Zranitelnost orchidejí vychází jak z velmi složitého vývojového cyklu, tak z vysoce specializovaných vztahů s opylovači, či mykorhizními houbami, které jsou pro orchideje nezbytně nutné k přežití (Rasmussen a Rasmussen, 2014). Studium orchideoidní mykorhizy nám může poskytnout důležité informace pro ochranu a obnovu orchidejových populací nejenom v České republice. V současné době však existuje pouze malé množství vědeckých studií, které zkoumají specificitu mykorhizních hub orchidejí v laboratorním i přirozeném prostředí.

Cílem této literární rešerše je poskytnout přehled současného poznání v oblasti orchideoidní mykorhizy terestrických druhů orchidejí a porovnat míru specificity mykorhizních hub v laboratorních a přirozených podmínkách.

1.2. Čeleď Orchidaceae a její ochrana

Čeleď Orchidaceae je jednou z největších a nejdiverzifikovanějších skupin krytosemenných rostlin na světě. Počet druhů této čeledi je odhadován na 28 000 druhů (Fay, 2018), což je více než 40% z celkového počtu jednoděložných rostlin a 10% z celkového počtu všech krytosemenných rostlin (Rasmussen a Rasmussen, 2014). Orchideje jsou prastarou skupinou, která se podle fosilních záznamů vyvinula zhruba před 65 miliony let (Ramírez et al., 2007). Současné fylogenetické studie dále potvrzují monofyletičnost orchidejí a staví je jako sesterské ostatním Asparagales (Chase, 2004; Rasmussen a Rasmussen, 2014).

I přes obrovskou diverzitu orchidejí lze skupinu charakterizovat několika základními znaky: spodním semeníkem, zygomorfními květy a redukovanými tyčinkami, které jsou alespoň částečně srostlé v gynostemium (Rasmussen a Rasmussen, 2014). Dále je pro květ orchidejí typický pysk (labellum) a pyl sdružený do brylek (Tsai et al., 2013). Většina těchto znaků však chybí u bazální podčeledi Apostasioideae (Zhang et al., 2017). Zcela typický je pak pro orchideje složitý vývojový cyklus, který zahrnuje podzemní mykotrofní, nefotosyntetizující stádium, které je plně závislé na houbovém endosymbiontovi, takzvaný protokorm (Rasmussen a Rasmussen, 2014).

Zástupci čeledi Orchidaceae jsou ze dvou třetin epifyté s centrem diverzity v tropech. Zbývající jedna třetina připadá na druhy terestrické (Dressler, 1993). Právě terestrickým druhům se v této práci budu věnovat dále.

U orchidejí se v průběhu jejich vývoje vyvinulo velké množství rozličných opylovacích mechanismů. Ve volné přírodě se však poměrně běžně rozmnožují také vegetativně. Tento jev můžeme nalézt jak u rostlin hlíznatých (např. *Dactylorhiza majalis*), tak i u rostlin oddenkatých (např. rod *Goodyera*). Vegetativní rozmnožování v tomto případě znamená jakousi pojistku k přežití, pokud dojde k významnému narušení možnosti generativního rozmnožování, např. rozrytí lokality od divokých prasat (Průša, 2019).

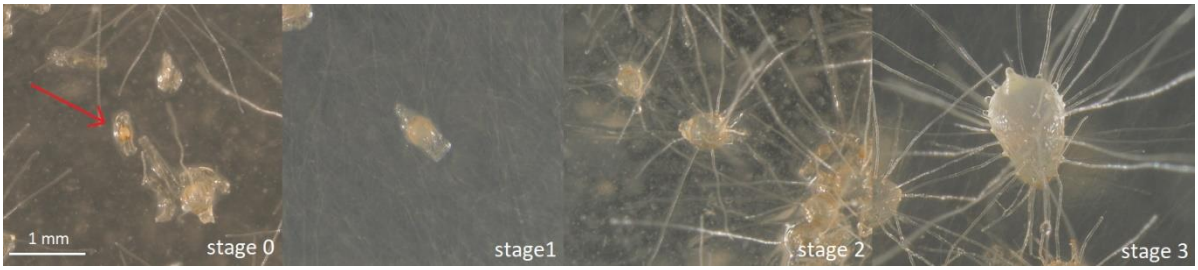
Čeleď Orchidaceae je jednou z nejohroženějších skupin rostlin na světě (Fay, 2018). S vymíráním orchidejí v České republice souvisí především současný způsob hospodaření a využívání krajiny. Mezi nejvýznamnější faktory způsobující úbytek orchidejí patří absence sečení či spásání luk, intenzivní přihnojování, splachy z okolních polí a v případě lesních porostů například nevhodná skladba dřevin v lese, nedostatečná podpora přirozené obnovy lesa, holoseče, nedostatek ponechaného mrtvého dřeva v lesích a přemnožená zvěř (Průša, 2019). Velkým problémem pro orchideje je také zhoršující se sucho (McCormick a Jacquemyn, 2014). Atraktivním druhům dále hrozí nebezpečí nelegálního vykopávání a sběru. Tímto nebezpečím je v našich končinách zejména ohrožen druh *Cypripedium calceolus* (Průša, 2019; Wotavová et al., 2004).

Téměř všechny, v České republice se vyskytující druhy orchidejí, jsou chráněny zákonem. Pro zákonnou ochranu orchidejí však dále zůstává problematický rozpor mezi Červeným seznamem a přílohou zákona 114/1992 Sb. Při tvorbě zákona byly některé vzácné druhy opomenuty, u jiných se jejich početnost od doby vzniku rapidně změnila. Příkladem mohou být druhy *Epipactis pseudopurpurata* a *E. pontica*, rostliny extrémně vzácné, vyskytující se pouze na několika lokalitách v republice, které v příloze zákona 114/1992 Sb. zahrnuty nejsou a jsou tedy chráněny pouze obecnou ochranou. Červený seznam České republiky tyto druhy však řadí do kategorie C1 – kriticky ohrožený taxon. Orchideje jsou také chráněny Washingtonskou úmluvou – CITES, která chrání celou čeleď Orchidaceae zejména před nelegálním obchodem. Dále platí směrnice 92/43 EHS (O ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin), která chrání tři naše druhy (*C. calceolus, Himantoglossum adriaticum* a *Liparis loeselii*). Existuje dále ještě Bernská úmluva, která u nás z orchidejí chrání druhy *C. calceolus* a *L. loeselii* (Průša, 2019).

1.3. Komplikovaný životní cyklus orchidejí

Semena orchidejí jsou mezi krytosemennými rostlinami unikátní svou velikostí a váhou. Díky těmto atributům se nazývají jako semena prachová. Velikost semen se obvykle pohybuje v rozsahu 0,05 – 0,6 mm a jejich váha dosahuje maximálně 24 μg. Rostlina je schopna produkovat v jedné tobolce i několik tisíc takových semen. Embryo se skládá pouze z několika buněk a semena většiny druhů orchidejí neobsahují žádný endosperm (Arditti a Ghani, 2000). To také znamená, že semena obsahují velmi malé množství živin pro další vývoj. Díky velikosti a váze semen je ideální rozšiřovací strategií přenos větrem. Některé studie naznačují, že semena temperátních druhů orchidejí jsou následně schopna přežít v semenné bance v půdě až několik let (Whigham et al., 2006).

Semenům většiny druhů orchidejí stačí k iniciaci klíčení pouze voda, avšak pro další vývoj semenáčku je již nutné navázat symbiotický vztah s houbou, díky kterému získá embryo chybějící živiny nutné pro svůj další vývoj. Kolonizace endosymbiontem probíhá po nabobtnání semene a protržení testy. Klíčící embryo se dále vyvíjí a vzniká protokorm, který na rozdíl od klíčících semen ostatních krytosemenných rostlin nemá radikulu. Meristémy protokormu však produkují rhizoidy (Rasmussen, 1995). Pod zemí se protokormy dále několik měsíců vyvíjejí a zvětšují (Rasmussen a Whigham, 1998). V další fázi vyrůstá prýt, který se dostává nad povrch půdy a dochází k tvorbě listů. Z původně heterotrofního protokormu se tak stává fotosyntetizující jedinec (Rasmussen, 1995). Doba, za kterou se z miniaturního prachového semene vyvine jedinec s nadzemní částí, se druhově liší, avšak v průměru trvá 2-4 roky (Rasmussen a Whigham, 1998).



Obr. 1: Fáze klíčení semen u druhu *Anacamptis morio*: stage 0 - semeno v základním stavu, stage 1 - nabobtnané semeno, stage 2 - semeno s viditelnými rhizoidy, stage 3 – protokorm.

1.4. Orchideoidní mykorhiza

Orchideoidní mykorhiza (OM) představuje soužití mezi orchidejí a mykorhizní houbou. Tento jev patří mezi endomykorhizy, což znamená, že houbové hyfy prorůstají až do vnitřního prostoru buněk kořene. Kromě orchideoidní mykorhizy patří mezi endomykorhizy dále erikoidní a abskulární mykorhiza. Pro OM platí, že hyfy prorůstají kořeny pouze prostorem mezi buněčnou stěnou a cytoplasmatickou membránou a vůbec tak nepřicházejí do kontaktu s cytoplasmou buněk. Houbová vlákna nikdy neprorůstají až do středního válce, jejich šíření je omezeno pouze na primární kůru kořene (Rasmussen, 1995).

Tento symbiotický vztah je pro rostlinu nezbytně nutný zejména v prvních fázích vývoje, kdy houba poskytuje klíčící rostlině potřebné živiny pro její další vývoj. V dospělosti se míra závislosti na OM druhově liší (Jacquemyn a Merckx, 2019). Terestrické autotrofní druhy orchidejí mají obvykle málo vyvinutý kořenový systém, což si kompenzují právě vztahem s houbou, díky němuž mohou snáze čerpat živiny z půdy (Gebauer a Meyer, 2003). Pro nefotosyntetizující druhy orchidejí (např. *Neottia nidus-avis*) je tento vztah pak naprosto nebytný, protože houba je jediným zdrojem uhlíku pro rostlinu (Whigham et al., 2002; Jacquemyn a Merckx, 2019).

Při OM se vytvářejí tzv. pelotony, což jsou smotky hyf uvnitř buněk kortexu (Rasmussen, 1995). Výměna živin poté může probíhat buď přímo přes cytoplazmatickou membránu, nebo při rozkladu starých pelotonů orchidejí (Cameron et al., 2006; Fochi et al., 2017). Růst houby v kořeni je rostlinou usměrňován pomocí fytoalexinů (Rasmussen, 1995).

1.4.1 Mykotrofní výživa

Dlouhou dobu bylo obecně přijímáno, že OM je stejně jako abskulární mykorhiza vztah oboustranně prospěšný. Současné poznání však naznačuje, že se jedná o vztah prospěšný především pro orchidej. Na původně mutualistické soužití je nyní nahlíženo spíše jako na jednostranný mykofágní vztah. Zatímco orchideje jsou na svém houbovém mykobiontovi životně závislé, není znám žádný případ, kdy by byla mykorhizní houba naopak závislá na hostitelské orchideji (Rasmussen a Rasmussen, 2009).

Orchideje lze dělit podle typu výživy. Naprostá většina zástupců jsou zelené autotrofní rostliny, které získávají uhlík za pomoci fotosyntézy. Druhou skupinou jsou rostliny mykoheterotrofní, které jsou nezelené a celý svůj životní cyklus závislé na OM (Dearnaley, 2007). Plně mykoheterotrofních orchidejí je popsáno asi 235 druhů, ale v důsledku nových taxonomických studií a nedávných objevů nových druhů toto číslo stále roste (Schiebold et al., 2018). Existuje ještě třetí skupina mixotrofních rostlin, které jsou zelené, ale uhlík získávají částečně i mykorhizou. Tyto rostliny by mohly být evolučním přechodem mezi autotrofní a mykoheterotrofní výživou (Těšitelová et al., 2015).

Orchideje však kromě uhlíku od svých mykorhizních hub přijímají i jiné živiny. Jedná se zejména o vodu, minerální látky a různé organické sloučeniny (Cameron et al., 2008). Jak již bylo řečeno, tyto živiny jsou důležité zejména pro klíčení a pozdější rozvoj protokormu orchidejí v prvních fázích jejich života. Přísun živin však neustává ani v dospělosti, kdy houba dále pomáhá rostlině v zásobování vodou, dusíkem a fosforem, u mykoheterotrofních a mixotrofních druhů i uhlíkem (Dearnaley, 2007).

Orchideje pojící se s ektomykorhizními houbami dále mohou být skrze jejich mycelium propojené s okolními stromy a tvořit tak trojstranný vztah. Část hub, která tvoří OM, je totiž schopna tvořit také ektomykorhizu se stromy či keři. Vzniká tedy síť hyf, která nepřímo propojuje kořeny stromu s kořeny orchideje. Zatímco stromy v horních patrech jsou dostatečně osvětleny a mohou fotosyntetizovat, orchideje v bylinném patře jsou zastíněné a tím pádem mají horší podmínky pro získávání uhlíku pomocí fotosyntézy. Vyrovnat se s nedostatkem světla jim však pomáhá jejich mykobiont. Houba je schopná čerpat uhlíkaté zdroje z kořene stromů a přes své mycelium je dodávat orchideji (Whigham et al., 2002). Přenos uhlíku mezi stromem a rostlinou byl prokázán například za pomoci radioaktivního značení (McKendrick et al., 2000).

1.4.2 Houby uplatňující se v orchideoidní mykorhize

Houby uplatňující se v OM patří především do oddělení Basidiomycota, třídy Agaricomycetes. Jedná se zejména o houby z řádu Sebacinales (konkrétně čeledi Sebacinaceae a Serendipitaceae) a Cantharellales (konkrétně čeledi Tulasnellaceae a Ceratobasidiaceae). Tyto tři skupiny byly v minulosti běžně řazeny do polyfyletického rodu *Rhizoctonia* (Dearnaley, 2007; Smith a Read 2008).

Ekologicky jsou tyto houby saprofyté, parazité, rostlinné patogeny, ektomykorhizní symbionti, ale v případě Sebacinales i endofyté (Dearnaley, 2007). Sebacinales se dále uplatňují v erikoidní mykorhize (Těšitelová, 2014; Weiss et al 2016). V tropech pak vhodné mykorhizní partnery tvoří i houby z třídy Atractiellomycetes (Dearnaley et al., 2012).

Dalšími mykorhizními symbionty mohou být houby z čeledi Rusullaceae a Thelephoraceae vyskytující se jak v Evropě, tak i v Austrálii. Nalézt je můžeme jak v plně mykoheterotrofních rostlinách, tak i v zelených lučních i lesních druzích. Houby z těchto čeledí běžně tvoří ektomykorhizu, ale mohou tvořit i OM s orchidejemi (McCormick et al., 2004). U rodu *Epipactis* byla dále prokázána přítomnost hub z oddělení Ascomycota, konkrétně rod *Tuber* (Sellose et al., 2004). Dalšími vhodnými, jinak ektomykorhizními, symbionty ze stejného oddělení jsou zástupci rodu *Wilcoxina* a *Peziza* (Bidartondo et al., 2004; Selosse et al., 2004). Avšak u poměrně běžného rodu *Peziza* panují jisté pochybnosti, zda se nejedná pouze o nemykotrofního endofyta.

Obecně lze říci, že zatímco orchideje otevřených stanovišť se pojí s houbami z bývalého polyfyletického rodu *Rhizoctonia*, orchideje lesních stanovišť navazují mykorhizní vztah spíše s ektomykorhizními houbami z oddělení Basidiomycota a Ascomycota (Dearnaley et al., 2012).

1.5. Specificita vztahu

Specificita mykorhizních hub je dlouho zkoumaným fenoménem, avšak její pochopení stále není dostatečné. Specificita se může lišit od velmi úzkých vztahů pouze s jediným houbovým mykobiontem až po široké vztahy kombinující houby z různých skupin (Dearnaley et al.,2012). Teorie o specificitě hub často dále dělí orchideje do skupin na základě jejich schopnosti fotosyntetizovat a jejich ekologie (McCormick et al., 2004).

Ve studii (Rasmussen, 2002) bylo navrženo, že zelené fotosyntetizující orchideje mají širší škálu možných mykobiontů než orchideje mykoheterotrofní. Ukazuje se však, že je situace složitější. Některé zelené druhy orchidejí mají totiž pouze jednoho dominantního mykobionta. Například druh *Orchis mascula* se primárně váže pouze na jeden druh houby z čeledi Tulasnellaceae (Jacquemyn et al., 2010). Naopak některé mykoheterotrofní druhy navazují OM s velkou řadou nepříbuzných hub. Specificita houbových mykobiontů se tedy neodvíjí ani tak od způsobu výživy, ale je dána spíše druhově (Dearnaley, 2007).

Lze také říci, že u protokormu je specificita mykorhizních hub užší, zatímco dospělci jsou schopni navázat funkční vztah s více druhy mykobiontů (Rasmussen et al., 2015).

Míra specificity se ale může měnit v průběhu ontogeneze jedince. Například u nezeleného druhu *Gastrodia elata* bylo pozorováno, že se rostlina ve fázi protokormu váže na zcela jiné mykobionty než dospělá rostlina (Chen et al., 2019). Změny specificity lze pozorovat však i v průběhu sezony. U druhu *Anacamptis morio* bylo prokázáno, že zatímco při izolaci mykorhizních hub z pelotonů na podzim a v zimě převažují houby z rodu *Tulasnella*, z jara se jedná spíše o houby rodu *Peziza* a v létě jsou převažujícími mykobionty houby rodu *Ceratobasidium* (Ercole et al., 2015).

V některých případech se ukázalo, že semena nejsou schopna navázat funkční vztah s mykobiontem extrahovaným z dospělce a neklíčí (Rasmussen, 2002). Jako vhodnější zdroj mykorhizních hub pro klíčení semen orchidejí se zdají být houby izolované z mladých rostlin (Meng et al., 2019). K výměně houbového partnera může docházet i z důvodu změny podmínek pro mykobionta, avšak u druhu *Goodyera pubescens* se ukázalo, že pokud je protokorm nucen změnit náhle svého houbového partnera, stává se to pro něho ve většině případů smrtící. Přeživší jedinci se však díky této schopnosti mohou vyrovnat s více extrémními podmínkami (McCormick et al., 2006).

Houbová specificita může také souviset s možným ohrožením druhu v případě, že je houba v krajině nedostatečně rozšířená (Bonnardeaux et al., 2007). Pokud se orchidej váže pouze na úzkou skupinu mykobiontů, může být právě tímto faktorem limitována a její výskyt je pak omezen specifickými přírodními podmínkami vhodnými pro houbu. Zejména v současnosti s probíhajícími změnami klimatu se může jednat o přispívající faktor poklesu početnosti populací orchidejí (McCormick et al., 2006). Stále však nejsou přesvědčivé důkazy, že dostupnost mykorhizních hub zásadně ovlivňuje dynamiku orchidejových populací. Udává se, že další faktory (např. disperze semen, vlhkost půdy, pH půdy) ovlivňující rozšíření orchidejí, jsou stejně, ne-li více významné pro jejich výskyt na dané lokalitě (McCormick a Jacquemyn, 2014), což potvrzují i studie provedené v Austrálii na několika druzích z rodu *Drakea* a *Pheladenia* (Phillips et al., 2011; Davis et al., 2015). Navzdory tomu některé studie však popisují, že u druhů vázajících se na specifické mykorhizní houby, může opravdu docházet k omezení rozšíření populací. Nejedná se však ani tak o omezení v geografickém měřítku, ale spíše v měřítku lokálním (McCormick et al., 2018).

Příbuzné druhy orchidejí se velmi často vážou na mykobionty ze stejné čeledi. Například ve studii Taylor a Bruns (1999) bylo vypozorováno, že dva blízce příbuzné druhy rodu *Corallorhiza* vyskytující se na jednom stanovišti se vážou na houby ze stejné čeledi, které se však druhově liší, a proto nedochází k vzájemné konkurenci.

Docházet ke konkurenci nemusí ani u orchidejí stejného druhu. U orchidejí vyskytujících se společně na jedné lokalitě lze nalézt tendenci pojit se s odlišnými druhy hub (Jacquemyn et al., 2015). Konkurenci se mohou vyhnout i orchideje stejného druhu na základě své ploidie. U druhu *Gymnadenia conopsea* bylo dokázáno, že se zvyšující se ploidií dochází i ke změně houbového symbionta (Těšitelová et al., 2013).

Závěrem lze říci, že specificita mykorhizních hub stále není plně pochopena. Jednotlivé studie se mezi sebou liší použitými metodami a způsoby vyhodnocení. Problematické je i klíčení *in vitro*, které má dokazovat schopnost houby navázat s rostlinou mykorhizní vztah.

Houby mohou rozdílně reagovat na zvolené médium, *in vitro* nečelí kompetici jiných druhů, pomalu rostoucí druhy nemusí mít dostatek času na navázání mykorhizy a některé houby izolované z dospělých rostlin nemusí nutně podporovat klíčení. Studie *in vitro* dále neodráží skutečné podmínky ve volné přírodě, ale zkoumá pouze specificitu fyziologickou za optimálních podmínek. Je tedy vhodné ve výzkumu kombinovat jak metodu *in vitro* klíčení (fyziologickou kompatibilitu), tak metodu *in situ* klíčení (ekologickou kompatibilitu), kde se projevují biotické a abiotické faktory, se kterými se rostliny na stanovišti musí vyrovnat (Rasmussen et al., 2015). Právě kvůli výše zmíněným důvodům je složité jednotlivé studie porovnávat a vyvozovat z nich všeobecně platné závěry.

1.6. Metody studia

Jak již bylo řečeno, zatímco fyziologickou míru specifity je možné zkoumat *in vitro*, pro testování ekologické specificity musíme provést výsev *in situ*. Oběma těmto metodám výsevu předchází správná izolace hub do *in vitro* kultury, které jsou následně k výsevům použity.

1.6.1 Izolace hub do kultury

Mykorhizní houby můžeme získat jak z protokormů pěstovaných *in situ* pro tento účel, tak i z pelotonů, které se vyskytují v kořenech. Vhodné je pro odběr mykorhizních hub upřednostňovat právě semenáčky, avšak v praxi jsou houby získávány především z kořenů dospělých rostlin kvůli nedostupnosti mladých semenáčků (Rasmussen, 2002).

Kořeny jsou opatrně vyhrabány a několik jich je odebráno. Následně jsou umístěny do uzavíratelných sáčků s malým množstvím vody a transportovány do laboratoře ke zpracování. V laboratoři jsou následně kořeny jemně očištěny od hlíny a sterilizovány 70% ethanolem či savem zředěným destilovanou vodou v poměru 1:5. Poté jsou několikrát promyty destilovanou vodou, ve které mohou být i krátkodobě uchovány do jejich zpracování pod stereoskopickým mikroskopem. S kořeny se dále pracuje za pomoci sterilních nástrojů, aby se předcházelo kontaminaci vzorku. Kořen je nejprve rozdělen na menší úseky a posuzuje se míra kolonizace mykorhizní houbou. Pokud je kořen houbou kolonizován, je rozdělen do dvou částí, z nichž jedna je zamrazena pro případ, že by mykorhizní houba na médiu nevzrostla a bylo by nutné ji molekulárně určit přímo z kořene. Druhá část kořene je nařezána na tenké plátky a za pomoci preparační jehly jsou pod stereoskopickým mikroskopem uvolňovány jednotlivé pelotony do autoklávované destilované vody (Kohout et al., 2013). Po rozvolnění kořenové tkáně se v roztoku kromě pelotonů objevuje také škrob. Ten lze částečně odstranit několikanásobným promytím destilovanou vodou, při kterém se také odstraní další kontaminanty jako bakterie, kvasinky či jiné houby. Promytí lze provádět 4x – 7x (Rasmussen a Whigham, 1998; Kohout et al. 2013). Poté jsou jednotlivé pelotony ve sterilním prostředí přemístěny na kultivační médium s rozestupy alespoň několik centimetrů, aby bylo zabráněno příliš časnému prorůstání houbových hyf do sebe (Kohout et al., 2013). Jako kultivační medium je vhodné použít například PDA – potato dextrose agar (Rasmussen, 1995; Rasmussen a Whigham, 1998), MNM - Melin Norkrans medium (Marx, 1969), či E-medium (modifikováno od Caldwell et al. 1991). Misky jsou poté uzavřeny Parafilmem. Houbové kolonie je třeba dále včas přesadit na nové médium a uložit do kultivačního boxu, kde je udržována teplota 20 °C. Poté, co houby dostatečně narostou, jsou za pomoci molekulárních metod určeny. Mykorhizní houby ve většině případů nejsou zařazeny do morfologických druhů. Běžně se proto používají operační taxonomické jednotky, tzv. OTU, které jsou analogické k určení do druhu. Například u hub z oddělení Basidiomycota se OTU obvykle rozlišují na základě 97% podobnosti v ITS úseku (Hughes et al., 2009).

1.6.2 Klíčení semen *in vitro*

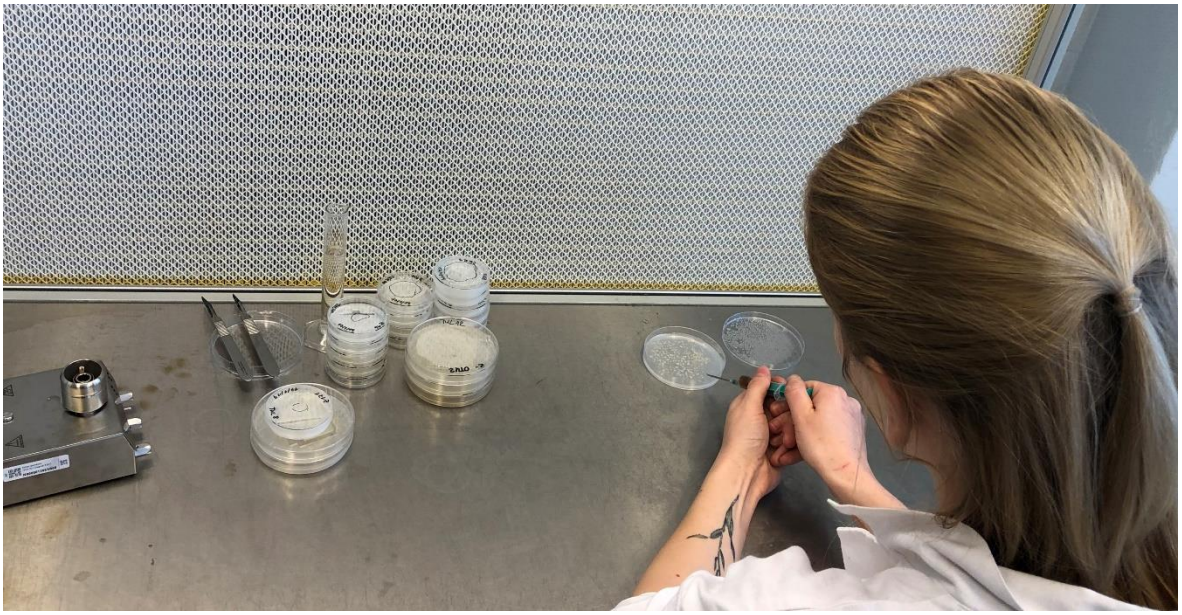
Pro ověření schopnosti jednotlivých hub navazovat funkční mykorhizní vztah je potřeba provést symbiotický výsev, který je nutné doplnit i o výsev asymbiotický. Ten poté slouží jako kontrola, do jakého stádia jsou schopna semena dorůst bez mykorhizní houby. Díky porovnání symbiotického a asymbiotického výsevu lze spolehlivě určit mykorhizní stádium. Oba výsevy probíhají stejným způsobem, liší se pouze přítomností houbového izolátu.

Výsev probíhá za pomoci injekční stříkačky, do které jsou vložena semena. Stříkačka je následně uzavřena a mezi špičku a jehlu (1,2 x 20) je vložena nylonová látka, kterou semena neprojdou. Stříkačka je následně asi do poloviny naplněna na 1-5 minut 70% ethanolem. Roztok semen je vhodné v průběhu několikrát jemně protřepat. Po uplynutí stanoveného času jsou semena třikrát promyta destilovanou vodou. Až do této fáze je možné pracovat mimo sterilní flowbox, další postup je již nutné provádět za přísných podmínek zabraňujících kontaminaci výsevu.

Následuje naleptání testy a úplná sterilizace za pomoci 2,5 – 5% roztoku chlorovaného vápna (NaOCl) a smáčedla, který je nasán do stříkačky. Doba působení je 3 – 30 minut a liší se druhově. Ideální dobu působení lze poznat podle zbarvení testy, které postupně světlá. Jako ideální se udává barva slonovinové kosti. Roztok je také vhodné ve stříkačce v průběhu působení alespoň jednou vyměnit. Po uplynutí doby stanovené pro sterilizaci NaOCl jsou semena ve stříkačce opět třikrát promyta. Tentokrát se již používá autoklávovaná destilovaná voda. Dále je do stříkačky nasáto 1-5 ml autoklávované vody, odebere se nylonová látka a proběhne výměna jehly za širší (1,8 x 40). Semena jsou poté vysévána na předem připravené OMA medium (oatmeal agar) ve sterilních Petriho miskách (Ponert et al., 2011). OMA medium se připravuje ze 3g mletých ovesných vloček, 10g agaru a 1 l destilované vody. Ideální pH se pohybuje okolo 5,6 (Clements et al., 1985; Zi et al., 2014). Tím končí asymbiotický výsev, miska je takto uzavřena Parafilmem a kultivována ve tmě za konstantní teploty 20 °C. V případě symbiotického výsevu je k semenům přidán izolát houby asi 4 mm^3 velký. Poté jsou všechny takto připravené misky opět uzavřeny a kultivovány při konstantní teplotě 20°C ve tmě (Ponert et al., 2011).

Doba, za kterou je možné provést vyhodnocení výsevů, se liší dle rychlosti klíčení daného druhu. Zatímco u rychle rostoucího druhu *Orchis morio* postačí dva měsíce, u pomalu rostoucích druhů jako je *Neottia ovata* je možné stanovení provést až po šesti měsících.

Za mykorhizní je poté možné izolát považovat, pokud zkoumaná semena dosáhnou pokročilejšího stádia než při asymbiotickém kontrolním výsevu.



Obr. 2: *In vitro* výsev.

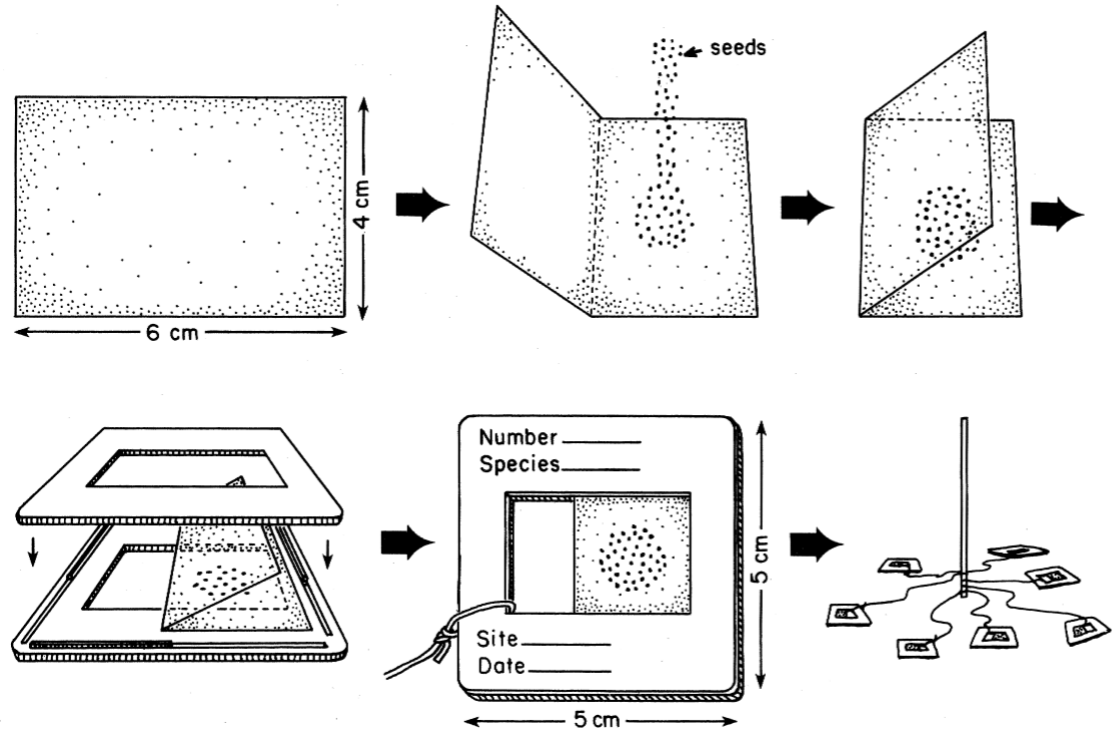
1.6.3 Symbiotické klíčení semen *in situ*

Pro klíčení semen *in situ* je používáno několik různých metod. Kvůli velikosti semen orchidejí je téměř nemožné pozorovat jejich klíčení přímo v půdě. Proto je nutné semena klíčit v síťkách, kterými mohou prorůst houbové hyfy. Nejznámější metodou je v tomto případě síťka poprvé popsána ve studii Whigham a Rasmussen (1993). V této studii byly využity diarámečky běžně používané pro diaprojektory. Do tohoto rámečku je vkládána nylonová síťovina o velikosti ok 35 μm. Velikost pórů musí být tak velká, aby mohly houbové hyfy prorůst k semenům a aby mohla do kapsy pronikat voda, ale zároveň tak malá, aby udržela prachová semena orchidejí (Rasmussen et al., 2015). U druhů klíčících na dřevní hmotě lze do takto připravené síťky vkládat kromě samotných semen i drcené dřevo, které udržuje vyšší vlhkost v okolí semen a poskytuje organickou hmotu pro houbu (McCormick et al., 2012).

Do síťky se vkládá asi 100-300 semen. Kvůli velikosti semen je ideální využít kalibrované odměrky, jejíž použití alespoň částečně sníží variabilitu množství semen. Rámečky je poté možné nylonovým vlascem navázat ke kovovému hřebíku, díky kterému je možné je za pomoci detektoru kovu při vyhodnocování snáze nalézt. Rámečky jsou následně vertikálně umístěny do půdy do blízkosti dospělé orchideje, kde jsou kolonizovány houbou

dostupnou v půdě. Tuto metodu lze provádět pouze na lokalitě, kde se již orchideje vyskytují, nebo se zde vyskytuje vhodná mykorhizní houba (Rasmussen a Whigham, 1998).

Pokud však chceme testovat vliv různých houbových izolátů na klíčení semen, je nutné nalézt lokalitu, která je pro výskyt orchidejí vhodná, ale orchideje se tam nevyskytují. Experiment je nejvhodnější zakládat na podzim, kdy jsou pro houby příhodnější podmínky pro jejich růst, zejména z důvodu vyššího srážkového úhrnu. Jednou z prvních prací, kde byla inokulace *in situ* provedena, je magisterská práce L. Klimešové (2019). V této práci byla semena vyseta s předem sterilizovaným senem a kousky agaru s houbovým izolátem. Do připraveného substrátu jsou poté vertikálně uloženy diarámečky se semeny a díra je poté překryta zbytkem zeminy a drnu. Takto jsou semena (v případě středoevropských druhů) uložena v půdě jeden až dva roky. Po skončení experimentu jsou rámečky z půdy vyzvednuty a očištěny. V laboratoři je síťovina se semeny umístěna buď na vodní agar (Rasmussen a Whigham, 1993), či pouze na Petriho misku, a množství vyklíčených semen do stádia protokormu je vyhodnoceno pod stereoskopickým mikroskopem (Whigham et al., 2002).



Obr. 3: Nákres síťky používané ke klíčení semen orchidejí *in situ*. Převzato ze studie Rasmussen a Whigham (1993).

1.7. Využití pro ochranu přírody

Nové technologie nám umožňují studovat druhy a jejich vzájemné působení podrobněji než kdykoliv předtím (Fay, 2018). Výskyt orchidejí je podmíněn jak vlastními abiotickými a biotickými požadavky, tak i požadavky svých mykobiontů (McCormick a Whigham, 2012). Jak již bylo zmíněno, pro klíčící semena je nezbytně nutné navázat funkční mykorhizní vztah pro jejich další vývoj. Nepřítomnost houbových mykobiontů proto vede k neúspěšnému klíčení a postupnému úbytku orchidejí (Rasmussen a Whigham, 1998). Ochrana orchidejových stanovišť je z důvodu úzkých a specifických vazeb orchidejí na jejich mykobionty a opylovače velmi náročná a musí být co nejvíce komplexní (Swarts a Dixon, 2009). To, co vyhovuje jednomu druhu, nemusí vyhovovat jinému, proto je nutné pojmout ochranu více druhově specificky (McCormick a Jacquemyn, 2014).

Za pomoci *in situ* výsevů bez houbového izolátu je například možné zjistit, zda se na testované lokalitě vyskytují mykorhizní houby potřebné pro klíčení a zda je tak plocha vhodná pro re-introdukci orchidejí. Naopak *in vitro* výsevy nám řeknou, s jakou houbou je možné orchideje kultivovat, či zda houby izolované z dospělců budou schopné iniciovat klíčení (Reiter et al., 2016). Dále nám experimentální klíčení *in vitro* a *in situ* může pomoci identifikovat specifické požadavky pro klíčení rostlin a jejich další vývoj. Studium specificity mykorhizních hub také vede k hlubšímu poznání houbových mykobiontů a jejích požadavků na prostředí (Rasmussen et al., 2015). Některé asociace mezi orchidejí a houbou jsou funkční pouze v laboratorních podmínkách, v přirozeném prostředí jsou pak nepoužitelné. Je tedy vhodné takové vztahy zkoumat i v přirozených podmínkách *in situ* (Rasmussen, 2002). Takovýchto studií však zatím bylo provedeno minimum.

Rostliny je také možné napěstovat *in vitro* a na vhodnou lokalitu je poté vysadit či re-introdukovat. Tento postup je možné provádět jak s klíčícími semeny, tak i s dospělými rostlinami. Dospělé rostliny je ale nutné předem naočkovat vhodnými mykorhizními houbami, či zajistit jejich přítomnost v místě výsadby, aby byla zvýšena šance na uchycení rostlin ve volné přírodě (McCormick et al., 2018).

2. Projektová část

2.1. Úvod

Rostliny z čeledi Orchidaceae mají velmi komplikovaný životní cyklus značně závislý na orchideoidní mykorhize. Znalost specificity mykorhizních hub orchidejí nám může pomoci pochopit nejenom rozšíření orchidejových populací, zajistit účinnější ochranu našich ohrožených druhů tvorbou vhodného a cíleného managementu, ale také poskytuje nové možnosti při obnově orchidejových stanovišť. V přírodě však klíčení významně ovlivňují jak abiotické, tak biotické faktory, které jsou v experimentech prováděných *in vitro* zcela zanedbané. Detailnějších studií, které se pokouší porovnat jak fyziologickou míru specificity (*in vitro*), tak i ekologickou míru specificity (*in situ*), je však stále minimum.

Předkládaný projekt je zaměřen na porovnání fyziologické i ekologické míry specificity mykorhizních hub u našich orchidejí.

2.2. Cíle projektu a hypotézy

Cílem projektu je porovnat fyziologickou a ekologickou míru specificity mykorhizních hub u orchidejí pomocí *in vitro* a *in situ* výsevů. *In vitro* výsevem bude otestována fyziologická míra specificity, zatímco *in situ* výsev prověří ekologickou míru specificity. Hypotézou tohoto projektu je, že fyziologická míra specificity zjištěna *in vitro* je širší (orchideje jsou schopné klíčit s více druhy symbiontů), než ekologická míra specificity zjištěná *in situ*.

2.3. Metodika projektu

2.3.1 Výběr vhodné lokality pro projekt

Pro projekt byla vybrána druhově bohatá louka nacházející se v PR Nad Zavírkou (GPS: 49.1294469N, 13.6598997E). Rezervace se nachází na pomezí obcí Stachy a Vacov, okres Prachatice. Předmětem ochrany jsou suché, svažité a mokřadní louky s výskytem vzácných a chráněných druhů rostlin. Lokalita se rozkládá na jižních svazích hory Javorník. Louka zvolená pro projekt se nachází v nadmořské výšce 898 m. n. m. a je udržována kosením. Na lokalitě je v dostatečném množství potvrzen výskyt pěti druhů orchidejí, a to: *Anacamptis morio, Dactylorhiza sambucina, Gymnadenia conopsea, Neottia ovata* a *Platanthera bifolia*.

Na louce lze nalézt i druh *Coeloglossum viride*, který se zde však nachází v pouze malém množství jedinců.

2.3.2. Odebírání semen a kořenů

Na jaře prvního roku bude na lokalitě náhodně vybráno deset zástupců každého druhu, tzn. celkem 50 rostlin. U těchto rostlin budou co nejméně destruktivním způsobem odebrány tři mykorhizní kořeny, které budou následně transportovány do laboratoře. V průběhu sezóny bude z deseti jiných náhodně zvolených rostlin každého druhu odebrána tobolka se semeny pro nadcházející výsevy.

2.3.3. Kultivace mykorhizních hub

Odebrané kořeny budou očištěny a povrchově sterilizovány. Z dobře kolonizovaných fragmentů bude vypreparováno 15-20 pelotonů, které budou promyty v autoklávované vodě a přemístěny na Petriho misky s E-mediem (modifikováno od Caldwell et al. 1991). Inkubace pelotonů přenesených na médium bude probíhat ve tmě při 20 °C v kultivačním boxu. Podrobný postup kultivace mykorhizních hub je popsán v kapitole 1.6.1. Houby budou poté molekulárně určeny. DNA bude extrahována NaOH extrakcí a amplifikována sadou primerů specifických pro houby navazující orchideoidní mykorhizu. Konkrétně budou použity sady ITS1OF/ITS4OF, nebo ITS1/ITS4Tul (Taylor a McCormick 2008). V případě, že se amplifikace nepodaří, budou použity univerzální primery ITS1/ITS4. Získané PCR produkty budou podrobeny RFPL analýze (HinfI a HaeIII enzymy). Zástupci každého RFPL vzoru budou osekvenováni. Z důvodu, že se orchideje obvykle pojí s více druhy mykorhizních hub, očekáváme získání 10 cílových OTU. Zatímco u druhů *A. morio, D. sambucina, G. conopsea* a *P. bifolia* předpokládáme výskyt hub z čeledi Ceratobasidiaceae a Tulasnellaceae, u druhu *N. ovata* jsou známy interakce s houbami z čeledě Sebacinaceae.

2.3.4. *In vitro* výsev

Na podzim prvního roku budou semena povrchově sterilizována podle Ponert et al. (2011) a vyseta na OMA medium inokulované houbou. Každá kombinace orchidej-houba bude vyseta sedmkrát, kvůli případným kontaminacím. Kontrolu představují misky s vysetými semeny na OMA medium bez přidané houby. Stejně jako v případě inokulovaných misek,

bude i kontrola v sedmi opakováních. Vyseté misky budou poté kultivovány při 20°C ve tmě v kultivačním boxu. Po několika měsících (podle rychlosti růstu jednotlivých druhů) budou misky nafoceny. Z každé misky bude náhodně spočítáno 100 objektů a zaznamenáno jejich dosažené stádium. Pro oba výsevy budou použity kategorie: 1) semeno v základním stavu, 2) nabobtnané semeno, 3) semeno s viditelnými rhizoidy, 4) protokorm. Protože prvních tří stádií jsou semena schopna dosáhnout i bez mykorhizní houby, projevem úspěšného navázání mykorhizního vztahu je čtvrté stádium.

2.3.5. *In situ* výsev

Poblíž lokality, kde byly odebírány mykorhizní kořeny a semena, bude na podzim prvního roku vybrána plocha, kde se v současné době nevyskytují žádné orchideje, ale složení vegetace je pro jejich výskyt vhodné. Zde budou do půdy uloženy diarámečky se semeny a inokulovány jednotlivými houbovými OTU. Návrh počítá se třemi čtverci, kdy každý čtverec bude obsahovat všechny kombinace orchidejí (5 druhů) a hub (10 OTU) ve dvou opakováních. Protože lze v jednom mikrostanovišti kombinovat rámečky semen všech druhů orchidejí s jedním OTU, každý čtverec bude mít 20 mikrostanovišť náhodně rozmístěných v síti 5*4 se vzdáleností 1 m mezi mikrostanovišti. V každém čtverci bude v místě mikrostanoviště vykopána díra, kam bude vložena vykopaná hlína promíchaná se sterilizovaným senem, houbová kultura na agaru ze dvou Petriho misek a diarámečky se semeny (dle Klimešová, 2019). Vše bude poté zakryto zbývající půdou a drnem. Takto bude výsev ponechán rok. Na podzim druhého roku budou rámečky vyzvednuty a v laboratorních podmínkách vyhodnoceny. Z každého rámečku bude spočítáno 100 objektů, které budou zařazeny do výše zmíněných kategorií 1-4 . Z každého rámečku, ve kterém se budou vyskytovat protokormy, bude vybrán jeden největší, který projde molekulárním screeningem pro určení mykorhizní houby podobně jako v části 2.3.3.

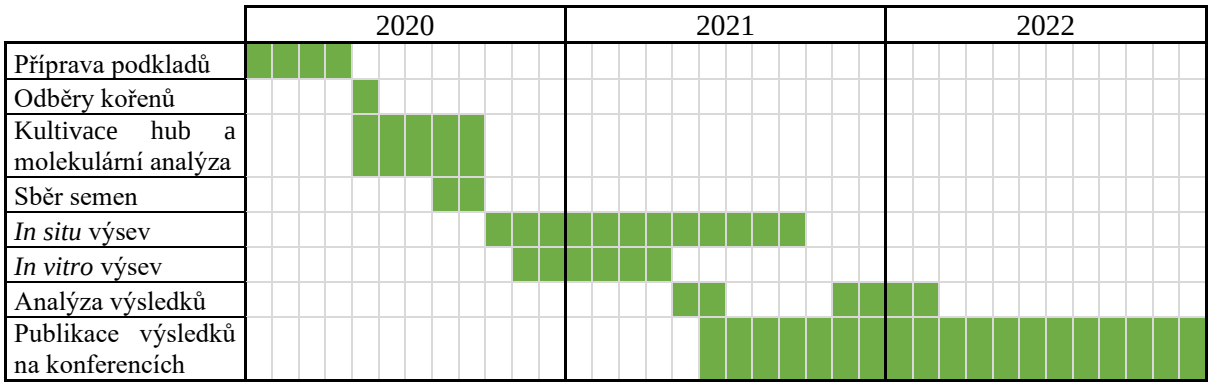
2.3.6. Analýza a vyhodnocení projektu

Po dokončení obou výsevů budou data analyzována pomocí smíšených lineárních modelů v programu R. Výsledkem bude potvrzení, či vyvrácení výzkumné hypotézy, že fyziologická míra specificity zjištěná *in vitro* je širší, než ekologická specificita zjištěná *in situ.* Dále bude statisticky vyhodnoceno, zda je klíčení semen úspěšnější s houbou, která byla izolována

z daného druhu, či je klíčení možné i s houbou vyizolovanou z jiného druhu. Porovnáno bude také, jak se tyto preference liší mezi *in vitro* a *in situ* výsevy. Výsledky budou následně prezentovány na vědecké konferenci týkající se ekologie rostlin, či rostlinných mykorhiz. Výstupem projektu bude vědecký článek zveřejněný v odborném periodiku.

2.4. Časový harmonogram projektu

Tabulka 1: Přibližný harmonogram projektu.



Celkové trvání projektu je 36 měsíců. Za tuto dobu budou upořádány čtyři výjezdy na výše zmíněnou lokalitu kvůli sběru materiálu, vytvořen *in vitro* a *in situ* výsev, provedeny veškeré potřebné laboratorní analýzy a výsledky veřejně prezentovány na vybraných konferencích.

2.5. Finanční rozpočet projektu

Tabulka 2: Rozpočet projektu podle kategorií.

Položka	**tis. Kč**
Mzdové náklady	800
Zákonné odvody	259
Drobný dlouhodobý majetek	30
Spotřební materiál	55
Cestovné	155
Služby	90
Režijní náklady	300
Celkem	**1689**

Celkové finanční náklady na projekt tvoří 1 689 000 korun. Nejvýznamnější položkou rozpočtu jsou mzdové náklady (760 tis.) včetně povinných zákonných odvodů na financování řídícího pracovníka zaměstnaného na 100 % úvazek po celou dobu trvání projektu a jednoho technického pracovníka zaměstnaného na 50% úvazek. Dále mzdové náklady tvoří finanční odměnu tří terénních a dvou laboratorních pracovníků, zaměstnaných formou Dohody o provedení práce v období terénních výjezdů, přípravy a vyhodnocení výsevů (40 tis.). Do položky služby spadá zhotovení nákladných molekulárních analýz, a údržba přístrojů Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, které budou využity pro analýzy vzorků. Drobný dlouhodobý majetek obsahuje částku na pořízení kultivačního boxu. Spotřební materiál zahrnuje především nákup laboratorního spotřebního materiálu a chemikálií potřebných pro laboratorní práce, vybavení pro práci v terénu, ale také odbornou literaturu věnující se ekologii orchidejí a mykorhize. Cestovné je tvořeno náklady na pohonné hmoty pro čtyři terénní výjezdy a náklady spojenými s účastí na zahraničních konferencích týkajících se mykorhizních symbióz a ekologie rostlin.

2.6. Spolupracující subjekty

Projekt bude řešen ve spolupráci s Přírodovědeckou fakultou, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Fakulta má plně vybavenou molekulární laboratoř a další vybavení vhodné pro laboratorní analýzy. Celý projekt bude konzultován a prováděn ve spolupráci s pracovní skupinou doc. RNDr. Jany Jersákové, Ph.D., která se problematikou specificity mykorhizních hub zabývá. *In vitro* výsev bude dále konzultován s RNDr. Janem Ponertem, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, který má v tomto oboru cenné praktické zkušenosti.

3. Seznam literatury

Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145, 367-421.

Bidartondo, M. I., Burghardt, B., Gebauer, G., Bruns, T. D., & Read, D. J. (2004). Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271, 1799-1806.

Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., & Sivasithamparam, K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research*, 111, 51-61.

Caldwell, J., Locey, B., Clarke, M. F., Emerson, S. G., & Palsson, B. O. (1991). Influence of medium exchange schedules on metabolic, growth, and GM-CSF secretion rates of genetically engineered NIH-3T3 cells. *Biotechnology Progress*, 7, 1-8.

Cameron, D.D., Johnson, I., Read, D.J. & Leake, J. R. (2008). Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist*, 180, 176-184.

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.

Clements, M. A., Muir, H., & Cribb, P. J. (1985). A Preliminary Report on the Symbiotic Germination of European Terrestrial Orchids. *Kew Bulletin*, 41, 437-445.

Davis, B. J., Phillips, R. D., Wright, M., Linde, C. C., & Dixon, K. W. (2015). Continent-wide distribution in mycorrhizal fungi: implications for the biogeography of specialized orchids. *Annals of Botany*, 116, 413-421.

Dearnaley, J. D. W., Martos, F., & Selosse, M. -A. (2012). 12 Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. In B. Hock, *Fungal Associations*. Springer Berlin Heidelberg. Německo.

Dearnaley, J. D. W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17, 475-486.

Dressler, R. L. (1993). Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Cambridge University Press. Velká Británie.

Dykyjová, D. (2003). Ekologie středoevropských orchidejí. Kopp. Česká republika.

Ercole, E., Adamo, M., Rodda, M., Gebauer, G., Girlanda, M., & Perotto, S. (2015). Temporal variation in mycorrhizal diversity and carbon and nitrogen stable isotope abundance in the wintergreen meadow orchid *Anacamptis morio*. *New Phytologist*, 205, 1308-1319.

Fay, M. F. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanical Studies*, 59, 16.

Feuerherdt, L., Petit, S., & Jusaitis, M. (2005). Distribution of mycorrhizal fungus associated with the endangered pink-lipped spider orchid (*Arachnorchis* (syn. *Caladenia*) *behrii*) at Warren Conservation Park in South Australia. *New Zealand Journal of Botany*, 43, 367-371.

Fochi, V., Chitarra, W., Kohler, A., Voyron, S., Singan, V. R., Lindquist, E. A., Barry, K. W., Girlanda, M., Grigoriev, I. V., Martin, F., Balestrini, R., & Perotto, S. (2017). Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora - Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 213, 365-379.

Gebauer, G., & Meyer, M. (2003). 15N and 13C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist*, 160, 209-223.

Girlanda, M., Selosse, M. A., Cafasso, D., Brilli, F., Delfine, S., Fabbian, R., Ghignone, S., Pinelli, P., Segreto, R., Loreto, F., Cozzolino, S., & Perotto, S. (2006). Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology*, 15, 491-504.

Hock, B. (2012). *Fungal Associations*. Springer Berlin Heidelberg. Německo.

Hughes, K.W., Petersen, R.H. and Lickey, E.B. (2009). Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist*, 182, 795-798

Chase, M. W. (2004). Monocot relationships: an overview. *American Journal of Botany*, 91, 1645-1655.

Chen, L., Wang, Y. -C., Qin, L. -Y., He, H. -Y., Yu, X. -L., Yang, M. -Z., & Zhang, H. -B. (2019). Dynamics of fungal communities during *Gastrodia elata* growth. *BMC Microbiology*, 19, 158.

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 & Merckx, V.S.F.T. (2019). Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants. *Journal of Ecology*, 107, 1567-1581.

Jacquemyn, H., Waud, M., Merckx, V. S. F. T., Lievens, B., & Brys, R. (2015). Mycorrhizal diversity, seed germination and long-term changes in population size across nine populations of the terrestrial orchid *Neottia ovata*. *Molecular Ecology*, 24, 3269-3280.

Klimešová, L. (2019). Amelioration of orchid germination in restored grasslands [Magisterská práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.

Lee Taylor, D., & Bruns, T. D. (1999). Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology*, 8, 1719-1732.

Marx, D. S. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistence of pine roots to pathogenic infections. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59, 153-163.

McCormick, M. K., & Jacquemyn, H. (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist*, 202, 392-400.

McCormick, M. K., Taylor, D. L., Juhaszova, K., Burnett, R. K., Whigham, D. F., O´Neill, J. P. (2012). Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. *Molecular Ecology* 21, 1511–1523.

McCormick, M. K., Taylor, D. L., Whigham, D. F., Burnett, R. K., & Jacquemyn, H. (2016). Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 104, 744-754.

McCormick, M. K., Whigham, D. F. (2012). Using the complexities of orchid life histories to target conservation efforts. *The Native Orchid Conference Journal*, 9.

McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219, 1207-1215.

McCormick, M. K., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163, 425-438.

McKendrick, S. L., Leake, J. R., & Read, D. J. (2000). Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist*, 145, 539-548.

Meng, Y. -Y., Zhang, W. -L., Selosse, M. -A., & Gao, J. -Y. (2019). Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? A case study. *Mycorrhiza*, 29, 541-547.

Phillips, R. D., Barrett, M. D., Dixon, K. W., & Hopper, S. D. (2011). Do mycorrhizal symbioses cause rarity in orchids? *Journal of Ecology*, 99, 858-869.

Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K., & Lipavská, H. (2011). European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences*, 1, 95-107.

Průša, D. (2019). Orchideje České republiky. CPress. Česká republika.

Ramírez, S. R., Gravendeel, B., Singer, R. B., Marshall, C. R., & Pierce, N. E. (2007). Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, 448, 1042-1045.

Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244, 149-163.

Rasmussen, H. N. (1995). Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press. Velká Británie.

Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116, 391-402.

Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118, 334-345.

Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2014). Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of The Linnean Society*, 175, 313-327.

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., & Whigham, D. F. (1998). The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126, 49-64.

Reiter, N., Whitfield, J., Pollard, G., Bedggood, W., Argall, M., Dixon, K., Davis, B., & Swarts, N. (2016). Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia. *Plant Ecology*, 217, 81-95.

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.

Schiebold, J. M. -I., Bidartondo, M. I., Lenhard, F., Makiola, A., Gebauer, G., & Heijden, M. (2018). Exploiting mycorrhizas in broad daylight: Partial mycoheterotrophy is a common nutritional strategy in meadow orchids. *Journal of Ecology*, 106, 168-178.

Smith, S.E. & Read, D.J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London. Velká Británie.

Swarts, N. D., & Dixon, K. W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104, 543-556.

Taylor, D. L., & McCormick, M. K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 177, 1020-1033.

Tesitelova, T., Tesitel, J., Jersakova, J., Rihova, 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. (2014). Ecological and evolutionary consequences of orchid dependence on mycorrhizal fungi [Disertační práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.

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., Kotilínek, M., Jersáková, J., Joly, F. -X., Košnar, J., Tatarenko, I., & Selosse, M. -A. (2015). Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for Sebacinales in various habitats and ontogenetic stages. *Molecular Ecology*, 24, 1122-1134.

Tsai, W. -C., Fu, C. -H., Hsiao, Y. -Y., Huang, Y. -M., Chen, L. -J., Wang, M., Liu, Z. -J., & Chen, H. -H. (2013). OrchidBase 2.0: Comprehensive Collection of Orchidaceae Floral Transcriptomes. *Plant and Cell Physiology*, 54, e7-e7.

Weiss, M., Waller, F., Zuccaro, A., & Selosse, M. -A. (2016). Sebacinales – one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, 211, 20-40.

Whigham, D. F., O'Neill, J. P., McCormick, M., Smith, C., Rasmussen, H., Caldwell, B., Daniell, T. (2002). Interactions between decomposing wood, mycorrhizas, and terrestrial orchid seeds and protocorms. In: Trends and fluctuations and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations. Backhuys Publishers, Leiden. Nizozemsko.

Whigham, D. F., O'Neill, J. P., Rasmussen, H. N., Caldwell, B. A., & McCormick, M. K. (2006). Seed longevity in terrestrial orchids – Potential for persistent in situ seed banks. *Biological Conservation*, 129, 24-30.

Wotavová, K., Balounová, Z., & Kindlmann, P. (2004). Factors affecting persistence of terrestrial orchids in wet meadows and implications for their conservation in a changing agricultural landscape. *Biological Conservation*, 118, 271-279.

Zhang, G. -Q., Liu, K. -W., Li, Z., Lohaus, R., Hsiao, Y. -Y., Niu, S. -C., Wang, J. -Y., Lin, Y. -C., Xu, Q., Chen, L. -J., Yoshida, K., Fujiwara, S., Wang, Z. -W., Zhang, Y. -Q., Mitsuda, N., Wang, M., Liu, G. -H., Pecoraro, L., Huang, H. -X., et al. (2017). The Apostasia genome and the evolution of orchids. *Nature*, 549, 379-383.

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.