

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Experimentální biologie rostlin



Ing. Mgr. Tomáš Figura

Interakce iniciálně mykoheterotrofních rostlin s prostředím
(Interactions of initially mycoheterotrophic plants with environment)

Disertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ponert Ph.D.

Konzultant: prof. Marc-André Selosse

Praha, 2021



Předchozí strana: *Cephalanthera damasoinium*, albinotické formy (vlevo) a zelené rostliny (vpravo).

Prohlášení studenta

Prohlašuji, že jsem tuto práci sepsal samostatně, všechny použité zdroje náležitě cituji a že jsem tuto práci nepoužil k získání jiného titulu.

V Praze dne 23.6.2021

Ing. Mgr. Tomáš Figura

Prohlášení školitele o podílu na publikacích

Potvrzuji, že Tomáš Figura se podílel na publikacích uvedených v této práci tak, jak je uvedeno níže.

V Praze, 23.6.2021

RNDr. Jan Ponert Ph.D.

Pod'akovanie/Acknowledgements/Reconnaissance

Chcel by som poďakovať hlavne svojmu školiteľovi Hopovi, ktorý hlavne zo začiatku môjho štúdia prejavoval extrémnu dávku trpezlivosti a naučil ma množstvo vecí, od trojčlenky po detaily života orchideí. Ďakujem Ti! Honzovi Šochovi hlavne za pomoc pri spracovávaní experimentov, nastavenia číslovania strán, a pívne prestávky. Edite Tylovej hlavne za anatomickú výpomoc, perfektné fotky ktoré predávajú, Doc. Lipavskej za rady v začiatkoch môjho štúdia a ďalšiemu kolektívu lab 007 a 008 za rôznu výpomoc a vlastne takmer všetkým z katedry KEBR a Botaniky. Špeciálne ďakujem aj Elene za veľkú pomoc pri prekonávaní byrokratických problémov. Ďakujem Dušanovi Senkovi za jeho ochotu, extrémnu rýchlosť a nekonečné diskusie cez telefón. Otovi Rauchovi ďakujem za pomoc pri práci s pôdou a jeho extrémnu ochotu (a týmto sa zaväzujem pozvať ho do krčmy). Ďakujem aj Jane Jersákovej, Martinovi Vohníkovi, Honzovi Smyčkovi a Petrovi Kohoutovi za rôzne rady, obom Rydlom za viac či menej plodné diskusie pri pive a v teréne. Jakubovi Starostovi ďakujem za fyzickú podporu a Standovi Vosolsobě za to že je.

V neposlednom rade ďakujem svojej rodine a Ive Jadrej za podporu. Bez týchto blízkych ľudí by som sa musel venovať zjavne niečomu inému, asi omnoho nudnejšiemu.

I would like to thank to whole ORCHIDOMICS team for the nice fields and knowledge they passed to me. Namely from Uniwersytet Gdański especially Julitka Minasiewicz, Marcin Jąkałski, Michał May and Monique Lipińska, then to Piotr Mleczko from Uniwersytet Jagielloński and Macin Pietras from Instytut Dendrologii Polskiej Akademii NAUK in Kórnik. For help with text big thanks to Łukasz Minasiewicz. Special thanks belongs to Gerharda from Golczowice and to Planeta restaurant which fed us well and cheap. I am also thankful to Yosuke Matsuda for fruitful discussions and his super-quick responses. Thanks also belongs to Alžbeta for bottomless bucket of questions and to horse flies from Kalina lishinois to not eat us fully.

I would like to thank also Abo Marzok from Al-'Ula for all his help with driving, teaching local habits and problem solving and to mr. الله ع بد to give me opportunity to escape.

Enfin et surtout, je tiens à exprimer mes vifs remerciements envers mon (partial ?) mixo-directeur de thèse. Tu m'as supporté avec une patience inépuisable. Merci d'avoir survécu à tant de mes questions fréquemment très stupides. Merci Marc-André. Remerciements particuliers aussi à Félix qui ne m'a pas laissé dormir sous le pont d'Austerlitz et qui a été pour moi comme un troisième directeur de thèse lors de mon premier séjour à Paris. Merci à Chantal pour avoir résolu tous les problèmes possibles. Merci à Florent, Étienne, Pauline, Benoît, Liam et Rémi pour m'avoir accueilli et aidé sur le terrain comme au labo. Merci à Denis et Olivier pour les isotopes, et pour m'avoir laissé accéder si longuement au labo. Merci à l'équipe du Service Systématique Moléculaire du Muséum, et en particulier à Céline, Delphine et Thomas. Un grand merci également pour Aloïs pour l'aide au logement. Enfin, merci à l'équipe du SOFUNLAND et en particulier à Marc Ducouso, Kenji, Stéphane, Jérôme, Hassan, Robin, Odille et Julie pour avoir survécu à ma présence.

This research was funded by Grant Agency of Charles University (grant no. 468318 and 365115), by the grant of Czech Ministry of Education, Youth and Sports (grant no. LO1417). Travels mainly to Paris were also financed by Foundation of Faculty of Science, POINT (POINT/Ai/2019-1-045), Mobility Fund (FM/b/2019-1-019) and Internationalization fund of Faculty of Science. This project was also supported by Radek Labuřa Fund (F.R.L. 2021).

Abstrakt

Iniciálně mykoheterotrofní rostliny v poslední době ubývají z přírody, a to i bez zjevných příčin. Jsou ovlivňovány řadou biotických i abiotických faktorů. Cílem této práce je zjistit, jak mohou vybrané faktory, např. nitrát nebo symbiotické houby, ovlivňovat jejich rozšíření v přírodě. Práce využívá zejména *in vitro* experimenty, molekulární určování houbových symbiontů v kořenech a analýzy obsahu stabilních izotopů. Popisuje jak působení abiotického faktoru, konkrétně dusičnanu, tak biotické interakce iniciálně mykoheterotrofních rostlin s houbovými symbionty. Pozorovaná byla inhibice klíčení extrémně nízkými koncentracemi dusičnanu v asymbiotických kulturách *in vitro* u několika druhů orchidejí. Míra citlivosti jednotlivých druhů k dusičnanům odpovídá obsahu nitrátu v půdě a nárokům daného druhu na dostupnost živin podle Ellenbergových indikačních hodnot. Inhibiční efekt nitrátu na klíčení orchidejí se jsme pozorovali i v symbiotických kulturách *in vitro*, s výjimkou jediného izolátu rodu *Ceratobasidium*. Dále práce odhaluje, že mixotrofní orchideje mohou využívat vlastní fotosyntáty pro výživu nadzemních částí, zatímco podzemní jsou živeny symbiotickými houbami. Na rozdíl od autotrofů mají mixotrofní druhy obvykle v kořenech široké spektrum symbiotických hub. Během evoluce k mykoheterotrofii se ale stávají závislé na specifické houbě, což bylo pozorováno jak u mixotrofních hruštiček s redukovanými listy i jejich albinotických forem, tak u mixotrofních orchidejí s redukovanými listy a mykoheterotrofních orchidejí. Albinotické formy se svojí nízkou fitness jsou méně pravděpodobným evolučním mezikrokem k mykoheterotrofním druhům než jedinci s redukovanými listy. Přežití iniciálně mykoheterotrofních rostlin a jejich houbových symbiontů je tedy v přírodě závislé na mnoha faktorech, které jsou vzájemně propojené.

Klíčová slova: vstavačovité, hruštičkové, iniciální mykoheterotrofie, mixotrofie, mykoheterotrofie, albinotické formy, mykorhizní houby, dusičnan, dusík, půda, klíčení semen

Abstract

Initially mycoheterotrophic plants have recently been declining in the wild, even without apparent causes. They are affected by a number of biotic and abiotic factors. The aim of this work is to investigate how selected factors, such as nitrate or symbiotic fungi, may influence their distribution in nature. In particular, the work applies *in vitro* experiments, molecular determination of fungal symbionts and stable isotope analyses. It describes both the effects of abiotic factor, specifically nitrate, and biotic interactions of initially mycoheterotrophic plants with fungal symbionts. The inhibition of germination by extremely low concentrations of nitrate in asymbiotic *in vitro* cultures was observed in several orchid species. The degree of sensitivity of each species to nitrate corresponds with the nitrate content of the soil and the nutrient availability requirements of the species according to Ellenberg indicator values. The inhibitory effect of nitrate on orchid germination was also observed in symbiotic *in vitro* cultures. Out of five tested fungal strains, only one *Ceratobasidium* was capable of eliminating the inhibitory effect of nitrate. Furthermore, the work reveals that green mixotrophic orchids use photosynthates to nourish the aboveground parts, whereas the belowground parts are nourished almost exclusively by symbiotic fungi. Unlike autotrophs, roots of mixotrophic species are usually occupied by wide range of fungi. However, during the evolution to mycoheterotrophy, the specialisation towards narrow fungal lineage has been noted. Such a trend has been observed in both mixotrophic pyroloids with reduced leaves and their albinotic forms, as well as in mixotrophic orchids with reduced leaves and mycoheterotrophic orchids. Albino variants, with their low fitness, are less likely to be an evolutionary intermediate to mycoheterotrophic species than mixotrophic individuals with reduced leaves. Thus, the survival of initially mycoheterotrophic plants and their fungal symbionts in nature is dependent on many interrelated factors.

Keywords: Orchidaceae, Pyroloideae, initial mycoheterotrophy, mycoheterotrophy, mixotrophy, albino variants, mycorrhizal fungi, nitrate, nitrogen, soil, seed germination

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Mykoheterotrofní, mixotrofní a iniciálně mykoheterotrofní rostliny	1
1.2. Interakce IMR s prostředím	4
1.2.1 Biotické interakce	4
1.2.1.1 Diverzita hub asociujících s IM rostlinami	6
1.2.1.2 Generalisté a specialisté k houbovým symbiontům	7
1.2.2 Abiotické interakce IMR.....	10
1.2.2.1 Živiny v půdě ve vztahu k IM rostlinám	10
1.2.2.2 Dusík v rostlinách.....	11
1.2.2.3 Dusík a IM rostliny	11
1.2.2.4 Znečištění dusíkem.....	12
2. Cíle práce	14
3. Shrnutí publikovaných výsledků.....	15
3.1 Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content... 15	
3.2. Fungal symbionts may modulate nitrate inhibitory effect on orchid seed germination 16	
3.3 Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs 17	
3.4 Mycorrhizal Communities and Isotope Signatures in Two Partially Mycoheterotrophic Orchids.....	19
3.5 Communities of mycorrhizal fungi in different trophic types of Asiatic <i>Pyrola japonica sensu lato</i> (Ericaceae).....	20
4. Diskuze	22
4.1 Abiotické interakce.....	22
4.1.1. Inhibiční efekt nitrátu na klíčení semen orchidejí.....	22
4.1.1.1 Koncentrace nitrátu na přirozeném stanovišti.....	22
4.1.1.2 Míra citlivosti jednotlivých druhů orchidejí.....	22

4.1.1.3 Houby mohou zmírnit citlivost orchidejí k nitrátům.....	24
4.1.1.4 Význam a evoluce nitrátové inhibice	25
4.2 Biotické interakce	27
4.2.1 Evoluce mykoheterotrofie.....	27
4.2.1.1 Evoluce mykoheterotrofie s albinotickými formami jako mezičlánkem	27
4.2.1.2 Zdroj uhlíku z houbového symbionta a vlastní fotosyntézy	27
4.2.1.3 Specializace k houbovému partneru.....	29
4.2.1.4 Generalizmus vs. specificita.....	31
5. Závěry	33
6. Conclusions.....	34
7. Literatura.....	35
8. Přílohy.....	49

1. Úvod

1.1 Mykoheterotrofní, mixotrofní a iniciálně mykoheterotrofní rostliny

Předpokládá se, že většina rostlin (kolem 90-99 %) je mykorhizních (Smith *et* Read 2008; Brundrett 2009), přestože to u mnoha druhů zatím nebylo zkoumáno. Mykorhizní symbióza je komplexním vztahem, obecně považovaným za mutualistický, kdy rostlina dotuje houbu fotosyntáty a na oplátku houba poskytuje rostlině minerální látky a poskytuje kořenům ochranu (van der Heijden *et al.* 2015). Většina mykorhizních rostlin je schopna žít i bez houby - jsou autotrofní nebo mixotrofní a mykorhiza jim zvyšuje fitness. Nemykorhizní rostliny jsou zpravidla ruderalní či vodní rostliny – například nejzkoumanější rostlina vůbec *Arabidopsis thaliana*. Příkladem mykorhizních rostlin schopných žít bez houbového symbionta jsou například nejběžnější trávy i všechny dominantní stromy. Právě pod nimi můžeme nalézt nenápadné lesní orchideje (čeleď Orchidaceae; Gebauer *et* Meyer 2003) a hruštičkové rostliny (podčeleď Pyroloideae; Tedersoo *et al.* 2007; Zimmer *et al.* 2007), u kterých se setkáváme s tzv. mixotrofií (Selosse *et* Roy 2009), také nazývanou „částečná mykoheterotrofie“ z ang. "partial mycoheterotrophy" (Merckx 2013). Vzhledem k tomu, že používání těchto termínů při studiu zejména orchidejí vyvolává kontroverze, bude pro účely této práce používán termín mixotrofie protože je zažitý a využívá se napříč obory od algologie (Kulichová *et al.* 2014), přes poloparazitické rostliny (Těšitel *et al.* 2018; Obrázek 1), po kultury *in vitro* (Treat *et al.* 1989). Také jasně definuje duální způsob výživy. Za mixotrofní se označují někdy i masožravé rostliny (Schmidt *et al.* 2013; Obrázek 1).

V této práci budu jako mixotrofní rostliny označovat ty rostliny, které přijímají uhlík od houby i z vlastní fotosyntézy. Ty jsou obvykle celý život do určité míry závislé na houbovém symbiontovi, ale jsou zelené a produkují fotosyntáty. Na základě analýz obsahu stabilních izotopů ^{13}C a ^{15}N , které by měly značit příjem houbového uhlíku a dusíku, se u mixotrofních orchidejí rodů *Cephalanthera*, *Cymbidium* a *Epipactis* předpokládá, že fotosyntáty živí nadzemní části rostliny a mykorhiza podzemní (Roy *et al.* 2013, Gonneau *et al.* 2014; Suetsugu *et al.* 2018). Analýzy obsahu stabilních izotopů jsou ale jen nepřímým důkazem a kořeny byly zkoumány jen povrchně. Proto je tuto hypotézu potřeba ještě ověřit.

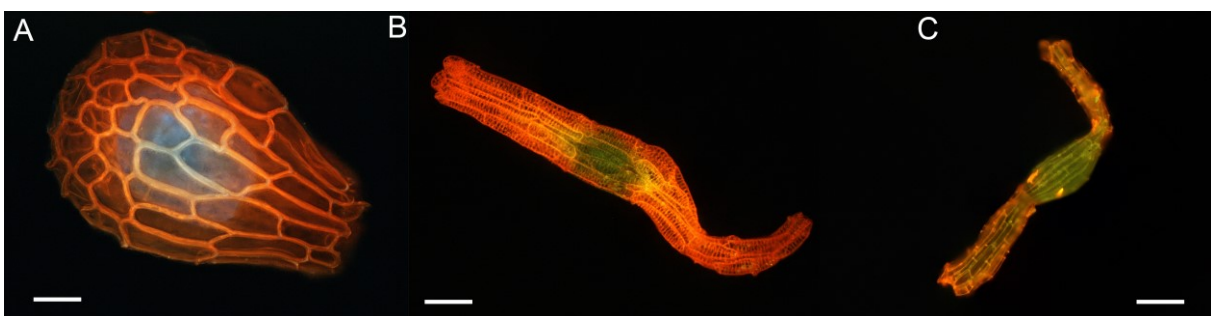


Obrázek 1: Příklady různých výživových strategií rostlin. Parazitické *Cynomorium coccineum* (A), masožravé *Drosophyllum lusitanicum* (B), poloparazit *Pedicularis sceptrum-carolinum* (C), v dospělosti autotrofní orchidej *Ophrys apifera* (D), jen minimálně fotosyntetizující mixotrofní orchidej *Limodorum abortivum* (E), mykoheterotrofní orchidej *Neottia nidus-avis* (F), mixotrofní *Cephalanthera damasonium* a její albinotická forma (G), dva jen minimálně houbový C využívající ale mixotrofní „C exchangers“ (hruštičkové) - autotrofnější *Chimaphila umbellata* (vlevo) a heterotrofnější *Orthilia secunda* (vpravo) (H), kořeny mykoheterotrofní orchideje *Neottia nidus-avis* (I) a mixotrofní kruštík *Epipactis placentina* (J).

Mixotrofní rostliny jsou sice na houbě do určité míry závislé, ale existuje kontinuum od autotrofie až po mykoheterotrofii (tedy různě silně závislých rostlin) (Selosse et Roy 2009). Mixotrofní rostlina se může výjimečně za určitých horších podmínek (např. světelných) posunout směrem k mykoheterotrofii (Matsuda *et al.* 2012) nebo naopak se dokonce může stát na houbě téměř nezávislou (May *et al.* 2020). Nejznámější mixotrofní rostliny jsou výše zmíněné orchideje (Selosse *et al.* 2018) a hruštičky (Matsuda *et al.* 2012) ale mixotrofní druhy existují zjevně i v čeledích Gentianaceae (Suetsugu *et al.* 2020), Burmaniaceae (Bolin *et al.* 2017) a pravděpodobně i v dalších. Existují však i skupiny rostlin, které fotosyntetizovat vůbec nedokážou. Typickým příkladem jsou holoparazitické rostliny, které uhlík získávají přímo od svých hostitelů. Existují však i nezelené rostliny parazitující na houbách. Tyto tzv. mykoheterotrofní rostliny jsou na spolužití s houbovým partnerem závislé a získávají veškerý uhlík od houby po celý život (Leake 1994). Přestože mykoheterotrofie byla považována za vzácný jev, bylo doposud popsáno přes 400 druhů mykoheterotrofních rostlin. Zřejmě se vyvinula nezávisle u více čeledí (alespoň 40x) a nejčastěji se s tímto způsobem výživy setkáme v tropech (např. čeledi Triuridaceae, Petrosaviaceae nebo některé Burmanniaceae a Orchidaceae; Merckx 2013). Dnes víme, že mixotrofních druhů je výrazně více než obligátně mykotrofních, ale přesný počet není známý (Merckx 2013). Zajímavou otázkou, diskutovanou

zejména v poslední době, je, jakým způsobem se mykoheterotrofie vyvinula. Předpokládá se, že z mixotrofie (Julou et al. 2005; Jacquemyn et Merckx 2019). Takovýto přechod nejspíš vyžaduje specifické adaptace (Roy et al. 2013; Gonneau et al. 2014) a mixotrofie poskytující duální zdroj uhlíku je asi výhodnější strategie než mykoheterotrofie (Těšitel et al. 2018). V rámci mixotrofních druhů (např. rody *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Calanthe*) se velmi vzácně vyskytují tzv. albinotické formy – rostliny, které jsou bílé a ztratily schopnost fotosyntézy. Tyto rostliny jsou také mykoheterotrofní a vyskytují se jednotlivě v populacích mixotrofních druhů. Předpokladem bylo že právě tyto albinotické formy jsou preadaptací ke vzniku mykoheterotrofního druhu (McCormick et al. 2016; Jacquemyn et Merckx 2019). Takovéto albinotické formy ale mají například nižší počet tobolek a nižší viabilitu semen, méně často vytváří nadzemní části, jsou náchylnější k patogenům a nadzemní části často brzy uschnou (Roy et al. 2013; Lallemand et al. 2019). Otázkou tedy zůstává, zda-li jsou albinotické formy skutečně evolučním krokem vedoucím k mykoheterotrofii (Roy et al. 2013; Gonneau et al. 2014).

Nakonec je nutno zmínit, že např. všechny orchideje a hruštičky jsou mykoheterotrofní v raných stádiích ontogeneze - jsou iniciálně mykoheterotrofní. Iniciální mykoheterotrofie (IM) je závislost rostliny na přísunu uhlíku z houby pouze v raných fázích ontogeneze po vyklíčení. Z iniciálně mykoheterotrofní rostliny (IMR) se může vyvinout plně nebo částečně autotrofní druh (Leake 1994; Merckx 2013; Lallemand et al. 2016). Obligátně mykoheterotrofní druhy se tradičně nezařazují k IM, i když samozřejmě jsou i tyto druhy po celý život včetně raných stádií plně závislé na houbě.



Obrázek 2: Redukovaná semena orchideje *Nigritella* cf. *rhelicani* (A), *pyroloudu* *Moneses uniflora* (B) a hniláku *Monotropa hypopitys* (C), Měřítka 100 μ m.

Mykoheterotrofní a IMR obvykle sdílejí redukovanou stavbu semen – mají velmi malá tzv. prachová semena (z angl. dust seeds; Obrázek 2). Na základě prozkoumaných skupin se dá říct, že jejich embrya jsou nediferencovaná a obvykle bez endospermu nebo s redukovaným endospermem. Osemení je mrtvé a může vytvářet i více vrstev (Leake 1994; Yamazaki et Miyoshi 2006; Selosse et al. 2016; Yeung 2017). Naopak typická autotrofní rostlina má

v semeni základ radikuly i plumuly, děloh i vyvinutý endosperm (Votrubová 2010). Například orchideje mají ve zralých semenech embryogenezi zastavenou v globulárním stádiu vývoje embrya (Rasmussen 1995; Arditti *et Ghani* 2000; Yeung 2017). Při takto nevyvinutých semenech lze očekávat, že bude nezbytná jejich externí výživa – například houbou, a proto lze očekávat objevy dalších IM, popřípadě mixotrofů z řad rostlin s prachovými semeny.

1.2. Interakce IMR s prostředím

1.2.1 Biotické interakce

Iniciálně mykoheterotrofní rostliny jsou životně závislé na interakcích s různými organismy (Selosse 2014) a jsou citlivé na změny, které tyto organismy ovlivňují (Waterman *et al.* 2011; McCormick *et al.* 2012). Zjevně nejdůležitější jsou interakce s mykorhizními houbami (viz kapitola 1.1), ale velká pozornost je věnována i opylování, zejména největší IM skupiny, orchidejí. Otázkou zůstává, do jaké míry jsou tyto interakce mutualistické a do jaké míry se jedná o jednostranné využívání (Selosse 2014). Jako příklad lze uvést protokormy orchidejí závislé na houbovém symbiontu (Eriksson *et Kainulainen* 2011), které nejspíš na houbě jen parazitují. Stejná situace bude zjevně i v případě dospělých, plně mykoheterotrofních a albinotických forem, které houbovému symbiontu nemohou poskytnout fotosyntáty. Je ale možné, že rostlina poskytuje například vitamíny nebo ochranu hyf (Selosse 2014). Na druhou stranu, velká většina IM rostlin v dospělosti alespoň částečně produkuje fotosyntáty a pravděpodobně je s houbovým symbiontem sdílejí (Cameron *et al.* 2008).

Iniciálně mykoheterotrofní rostliny mohou být významné i pro tok uhlíku v ekosystému. Například hruštičkové jsou stálezelené a je tedy možné, že na lokalitách, kde rostou ve velkých množstvích (zejména boreální lesy), by mohly celoroční respirací odebrat značné množství uhlíku z okolních rostlin a houbových symbiontů. Takovéto větší porosty mohou tedy ovlivňovat fitness ostatních rostlin (Tedersoo *et al.* 2007). V neposlední řadě jsou hostitelem rzi *Chrysomyxa pirolata* snižující klíčivost smrku (Singh *et Carew* 1990), což může mít vliv na boreální lesy, a IMR tak mohou být důležitým faktorem modelující celý biotop.

Příkladů různých interakcí IMR s jinými organismy je velké množství, zejména těch spojených s opylováním. Pro účely této práce není podrobný výčet nezbytný, navíc jej poskytuje např. přehledný článek o opylování orchidejí Jersáková *et al.* (2006) a hruštiček (Knudsen *et Olesen* 1993) a dalších mykoheterotrofních převážně autogamních a hmyzem opylovaných

mykoheterotrofech (Waterman *et al.* 2013). Nicméně považuji za vhodné zmínit alespoň příklady opylovacích strategií.

Evropské hruštičkové jsou opylovány hmyzem, přestože se vzhledem k nízké návštěvnosti květů předpokládala větrosprašnost. Kromě rostlin *Orthilia secunda* a *Chimaphila umbellata*, které mají nektar, odměňují ostatní hruštičky své opylovače jen pylem. Druhy odměňující jenom pylem opylují zejména čmeláci a to tak, že rozvibrují květ (angl. buzz pollination) (Knudsen *et Olesen* 1993).

Vzhledem k atraktivitě květů není divu, že orchideje jsou často zoogamní. Nejčastěji jsou opylovány hmyzem ale v menší míře i ptáky (Jersáková *et al.* 2006). Jejich květy jsou známy „podváděním“ kupříkladu šálivými květy např. bez nektaru (Ackerman 1986; Johnson *et al.* 2004). Šálivé květy mohou i napodobovat samičku opylovače, a tak je samečci opylí při tzv. pseudokopulaci (Peakall 1989; Vignolini *et al.* 2012; Obrázek 3). Zajímavým příkladem jsou květy rodu *Serapias*, které poskytují hmyzu úkryt (Dafni *et al.* 1981; Obrázek 3).

Dále je nutné zmínit i herbivorii a parasitismus – faktory významně ovlivňující všechny rostliny včetně IMR. Biotickou interakcí je i sběr orchidejí člověkem zejména pro jejich květy, na výrobu salepu, jako zdroj potravy a pro účely zejména čínské tradiční medicíny (Bulpitt *et al.* 2007; De Boer *et al.* 2017). Další aktivity člověka negativně ovlivňující především orchideje jsou mimo jiné nadměrná pastva, vysazování a kácení lesa, rozšiřování škůdců nebo používání pesticidů ničící opylovače (Swarts *et Dixon* 2009). Lze shrnout, že člověk je asi nejvýznamnějším faktorem způsobujícím převážně negativní biologické interakce.



Obrázek 3: Příklady opylovacích strategií u orchidejí. Druh *Ophrys sphegodes* napodobující samičky samotářských včel je opylován pseudokopulací (A) a druh *Serapias* cf. *aphroditae* poskytuje v květu pro hmyz úkryt (B).

1.2.1.1 Diverzita hub asociujících s IM rostlinami

Množství výzkumníků se zabývá identifikací mykorhizních hub IM rostlin. V dospělosti autotrofní orchideje, které rostou spíše na loukách, asociují nejčastěji s polyfyletickou skupinou tradičně nazývanou „rhizoctonie“. Tato skupina zahrnuje saprotrofní (ale pravděpodobně i endofytní) stopkovýtrusné houby čeledí Ceratobasidiaceae, Tulasnellaceae (Cantharellales) a Serendipitaceae (Sebacinales) (Taylor *et al.* 2002; Weiss *et al.* 2004; Selosse *et al.* 2014). Mixotrofní a mykoheterotrofní druhy orchidejí, které se vyskytují spíše na lesních stanovištích asociují obvykle s ektomykorhizními vřeckovýtrusými houbami, nalézány jsou ale i stopkovýtrusé. K nejčastěji nalézaným skupinám a rodům patří kupříkladu: Thelephoraceae, *Inocybe*, Cortinariaceae, *Wilcoxina*, *Tricholoma*, *Russula* ale i *Tuber* (Abadie *et al.* 2006; Jacquemyn *et al.* 2015; Jacquemyn *et al.* 2016a; Schiebold *et al.* 2017). V tropech byly ale jako symbionti silně mykotrofních rostlin pozorovány i saprofytické stopkovýtrusé houby, např. rod *Resinicium*, *Gymnopus* a *Mycena* (Martos *et al.* 2009; Ogura-Tsujita *et al.* 2009; Liu *et al.* 2015).

Co se týká dalších skupin IMR, s hruštičkovými asociují ektomykorhizní druhy (Tedersoo *et al.* 2007; Vincenot *et al.* 2008; Johansson *et al.* 2017; Jacquemyn *et al.* 2018). Identifikovány byly zejména rody stopkovýtrusých jako *Russula*, *Tomentella*, *Cortinarius*, *Hebeloma*, *Thelephora* a *Inocybe* ale i Sebacinaceae a Serendipitaceae (Tedersoo *et al.* 2007; Vincenot *et al.* 2008; Hashimoto *et al.* 2012; Johansson *et al.* 2017; Jacquemyn *et al.* 2018). Hruštičkám jsou příbuzné i mykoheterotrofní hniláky (Monotropoideae), které asociují také s ektomykorhizními stopkovýtrusými houbami (např. *Tricholoma spp.*, *Hemitomes congestum*, *Hydnellum spp.*, *Russula spp.* nebo *Rhizophogon spp.* (Bidartondo *et al.* 2001).

Další mykoheterotrofní rostliny (obvykle rostoucí v tropech a subtropích) asociují s arbuskulárními mykorhizními houbami (AM). Bylo zjištěno, že jak zástupci Triuridaceae (*Sciaphila*, *Kupea*), Burmaniaceae (*Burmannia*, *Thismia*, *Afrothismia*; Merckx *et al.* 2008; Yamato *et al.* 2011a; Suetsugu *et al.* 2012), Petrosaviaceae (*Petrosavia sakuraii*; Yamato *et al.* 2011b), Gentianaceae (*Voyria*, *Voyriella*; Bidartondo *et al.* 2002) tak i subantarktický *Arachnitis uniflora* z Corsiaceae asociují obvykle s úzkou skupinou AM hub v rámci skupiny „Glomus A“ (Bidartondo *et al.* 2002; Yamato *et al.* 2011a; Suetsugu *et al.* 2012). Nutno zmínit, že práce (Merckx *et al.* 2012) popisuje i asociaci s více AM symbionty, například u *Campylosiphon congestus* (Burmaniaceae) a *Sciaphila ledermannii* (Triuridaceae). Navíc tyto autoři našli jenom symbionty ze skupiny „Glomus A“ ale i z řádu Diversisporales (čeledi Acaulosporaceae a Gigasporaceae; Merckx *et al.* 2012). Arbuskulárně mykorhizní druhy IMR

byly nalezeny i v mírném pásu např. u rodu *Thismia* (čeleď Thismiaceae; Gomes *et al.* 2017). U těchto čeledí zahrnujících mykoheterotrofní druhy asociující s AM houbami se očekává i existence mixotrofie (rostliny s malými listy, absence kořenových vlásků apod.), ale dlouho nebyla uspokojivě prokázána (Cameron *et Bolin* 2010; Merckx *et al.* 2010, ale porovnej s Courty *et al.* 2011, resp. viz níž). Například zelené s AM asociující druhy *Bartonia virginica* a *Obolaria virginica* (Gentianaceae) nebo některé olistěné druhy rodu *Burmannia* jsou považovány za mixotrofní (Cameron *et Bolin* 2010; Merckx *et al.* 2010; Bolin *et al.* 2017). Tyto práce ale mohou být zatíženy chybou (viz další odstavec a Courty *et al.* 2011). Druhá jmenovaná práce navíc popisuje dopěstování čtyř druhů rodu *Burmannia* v květináčích, z čeho autoři usuzují možnost plně autotrofní výživy těchto rostlin (Merckx *et al.* 2010).

Existuje předpoklad, že i autotrofní druhy orchidejí asociující s „rhizoctoniemi“ nebo arbuskulárními houbami jsou tzv. skrytě mixotrofní (Selosse *et Martos* 2014), navíc alespoň u první skupiny jsou často v jejich kořenech nalézány i jiné houby než „rhizoctonie“ jako kupříkladu ektomykorhizní houby (Jacquemyn *et al.* 2017; Suetsugu *et al.* 2019). Jak bylo zmíněno výše, míra heterotrofie se u IMR často stanovuje na základě obsahu stabilních izotopů (Gebauer *et Meyer* 2003; Selosse *et al.* 2004). Ektomykorhizní houby (a IMR na ně navázaný) jsou obohaceny o stabilní izotopy ^{13}C a ^{15}N (Selosse *et Martos* 2014) pravděpodobně kvůli frakcionaci, která nastává na rozhraní kořen - houba. Zajímavé ale je, že arbuskulární houby (Courty *et al.* 2011; ale i některé jiné houby, viz Halbwachs *et al.* 2013 a citace uvnitř) a rostliny, které jsou s nimi v symbiotickém vztahu (například orchideje asociující s „rhizoctoniemi“), těmito izotopy obohaceny (zejména ^{13}C) nejsou. To může být způsobeno jinými biochemickými mechanismy transportu uhlíku na rozhraní houby a kořene, nebo to jen odráží obsah ^{13}C v houbě bez frakcionace (Selosse *et Martos* 2014). Práce citované v předešlém odstavci, které určují míru mixo/mykoheterotrofie u rostlin asociujících s AM, tedy mohly na základě analýz obsahu stabilních izotopů podhodnotit míru závislosti na houbě. Podobný problém může nastávat i u autotrofních orchidejí asociujících s rhizoctoniemi a ve skutečnosti tyto druhy mohou být mixotrofní.

1.2.1.2 Generalisté a specialisté k houbovým symbiontům

Otázka generalismu a specialismu k houbovému symbiontu je často nejasná. Práce popisující specifický druh IM rostliny často nachází v kořenech kromě dominantní houby množství dalších hub, které jsou méně zastoupeny a *vice versa*. Jestli jsou ale tyto méně zastoupené houby parazity, endofyty nebo symbionty, není jasné a závěry konkrétních článků závisí na

interpretaci jejich autorů. Termíny generalista a specialista ve smyslu jakési kvantifikace symbiotických hub v kořenech nejsou definovány a existuje plynulý přechod mezi těmito extrémny. Jedná se o široké pojmy, nicméně Shefferson *et al.* (2019) se pokusili o kategorizaci. Navrhují termíny i) „assemblage specialisation“, který značí, že se druh specializuje na specifické hostitele; ii) „apparent generalism“, kdy byli u druhu nalezeni početní symbionti, ale ve skutečnosti druh asociuje jen s dominantním symbiontem, zatímco ostatní symbionti přispívají málo nebo vůbec a iii) „true generalism“, kdy druh asociuje s více symbionty, kteří se funkčně překrývají a jsou geograficky nahraditelní, takže se houbové společenstvo v rámci areálu druhu liší (Shefferson *et al.* 2019).

Zdá se, že většina orchidejí jsou generalisté, co se týče houbového partnera, a to jak v dospělosti autotrofní, tak mixotrofní druhy (např. *Liparis loeselii*, Waud *et al.* 2017; různé druhy rodů *Cephalanthera*, *Dactylorhiza* a *Epipactis* nebo *Herminium monorchis* (Bidartondo *et al.* 2004; Jacquemyn *et al.* 2016a; Jacquemyn *et al.* 2017); *Neottia ovata*; Jacquemyn *et al.* (2015) a zjevně alespoň některé druhy snad mohou využívat jak „rhizoctonie“, tak ektomykorhizní symbionty (např. různé druhy *Epipactis* a *Dactylorhiza* či *Herminium monorchis*, (Jacquemyn *et al.* 2016b; 2017); *Liparis loeselii*, (Waud *et al.* 2017) nebo *Neottia ovata*, (Jacquemyn *et al.* 2015). Ale lze předpokládat, že tento jev bude pozorován častěji (Jacquemyn *et Merckx* 2019). Specifické druhy orchidejí (Schiebold *et al.* 2017; Swift *et al.* 2019) nebo dokonce celé rody jsou ale popisovány také (např. *Cypripedium*, Shefferson *et al.* (2007) ale často se jedná o téměř nezelené druhy s redukovanými listy jako *Limodorum abortivum* (*Russula*, Girlanda *et al.* 2006) nebo *Corallorhiza trifida* (*Tomentella*, Zimmer *et al.* 2007).

Zdá se, že vznik mykoheterotrofních druhů je v evoluci spojen s přechodem od „rhizoctonií“ k ektomykorhizním houbám (Bidartondo *et al.* 2004). Nezelené mykoheterotrofní druhy jsou obvykle specifické, zejména k ektomykorhizním stopkovýtrusým houbám, a to napříč čeledí Orchideaceae. Kupříkladu rod *Lecanorchis* z *Vanilloideae* (*Lactarius*, *Russula*, Okayama *et al.* 2012), nebo *Hexalectris* z *Epidendroideae* (*Thelephoraceae*, *Sebacinaceae* subgroup A, Kennedy *et al.* 2011). Z evropských druhů lze uvést např. *Neottia nidus-avis* (*Epidendroideae*; Taylor *et Bruns* 1997; McKendrick *et al.* 2001; Selosse *et al.* 2002) nebo *Epipogium aphyllum* (*Epidendroideae*; Roy *et al.* 2009).

Otázkou ale zůstává, proč jsou některé mykoheterotrofní druhy specializovány na ektomykorhizní a AM houby. Předpokládá se, že vzhledem k tomu, že ektomykorhizní houby jsou propojené s okolními stromy, dokáží lépe a delší dobu vyživovat rostlinu než saprotrofní rhizoctonie (Bruns *et al.* 2002; Selosse *et Martos* 2014) a lze předpokládat, že podobná situace

nastává i s arbuskulárními houbami. V některých tropických lesech totiž ektomykorhizní houby chybí nebo jsou alespoň méně časté (Martos *et al.* 2009; Corrales *et al.* 2018). A v těchto podmínkách s mykoheterotrofními rostlinami asociují zejména AM houby (viz předchozí kapitola). Zdá se ale, že saprotrofní druhy hub za určitých podmínek, které nastávají spíše v tropech a subtropích, jako je vyšší teplota, vlhkost a dostatek organické hmoty, mohou být i jediným houbovým partnerem dokonce i plně mykoheterotrofních druhů (Martos *et al.* 2009). Příkladem jsou například saprofytické stopkovýtřusé houby rodů *Resinicium*, *Gymnopus* a *Mycena*; (Martos *et al.* 2009; Ogura-Tsujita *et al.* 2009; Liu *et al.* 2015; Chen *et al.* 2019). Co se týká hruštiček, v jejich kořenech jsou nalézány různé houby, přičemž žádná výrazně nedominuje (Tedersoo *et al.* 2007; Vincenot *et al.* 2008; Johansson *et al.* 2017; Jacquemyn *et al.* 2018) a to i v případě jediného dosud popsání, plně mykoheterotrofního druhu *Pyrola aphylla* a příbuzné *P. picta* (Hynson *et al.* 2009), což je zvláštní vzhledem k úzké specificitě jiných mykoheterotrofií. Většina z doposud prozkoumaných hruštiček jsou ale v dospělosti velmi slabě mixotrofními rostlinami, tzv. „C exchangers“. Zatím byl popsán jen jeden skutečně na houbě silně závislý mixotrofní druh - *P. japonica* (Lallemand *et al.* 2017). Právě *P. japonica* může být druh závislý na symbiontech různou mírou, podle stupně ozáření. Když je jeho schopnost tvorby vlastních fotosyntátů snižena například stínem, čerpá od houby více látek a také se více specializuje, konkrétně na ektomykorhizní rod *Russula* (Matsuda *et al.* 2012). Práce Hashimoto *et al.* (2012), popisuje silnou specificitu klíčících, ještě plně mykoheterotrofních rostlin *P. asarifolia* ke skupině Sebaciales B a generalismus u dospělých rostlin. Obě práce naznačují specifitu ke konkrétnímu houbovému partnerovi u silně až plně mykoheterotrofních stádií hruštičkových. Na druhou stranu studie Johansson *et al.* (2017) popisuje specializaci klíčících rostlin během ontogeneze - klíčící rostliny byly méně specifické než starší semenáče. Nejedná se však o silnou specializaci jako u příbuzného druhu *Hypopitis monotropa* (Johansson *et al.* 2017). Podobně jako mykoheterotrofní orchideje jsou specifické i další mykoheterotrofní Ericaceae, s výjimkou hruštiček. Každý druh rostliny k určitému rodu houby (např. *Monotropa hypopitis* s *Tricholoma*, *Monotropastrum humile* s *Russula* nebo *Pterospora andromedea* s *Rhizophogon* (Bidartondo *et al.* 2001).

Podobně jako u mykoheterotrofních orchidejí a hniláků, i mykoheterotrofní rostliny asociující s AM jsou úzce specializované na konkrétního houbového symbionta nejčastěji ze skupiny Glomus A (Bidartondo *et al.* 2002; Yamato *et al.* 2011b; Gomes *et al.* 2017). Specializace na úzkou skupinu v rámci skupiny Glomus A byla pozorována i u potenciálně mixotrofního druhu rodu *Burmania* (Merckx *et al.* 2010). Ale i v rámci arbuskulárně mykorhizních rostlin byly

recentně objeveny generalistické druhy u čeledí Burmaniaceae a Gentianaceae (Merckx *et al.* 2010; Courty *et al.* 2011).

1.2.2 Abiotické interakce IMR

Méně studované jsou abiotické interakce u IMR, a ty se studují prakticky výlučně na orchidejích. Orchideje ovlivňuje množství faktorů prostředí jako například srážky, teplota (Tsiftsis *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015; Djordjević *et al.* 2016a,b), pH, obsah organické hmoty, a živin (Bowles *et al.* 2005; Diez 2007; Tsiftsis *et al.* 2012), světlo nebo podloží (Rasmussen *et al.* 2015; Djordjević *et al.* 2016a,b). Optimální podmínky pro klíčení semen jsou obvykle jiné než pro dospělé rostliny (Turnbull *et al.* 2000). Klíčení semen je citlivý proces a je známo že jej ovlivňuje jak vlhkost půdy (Scott *et al.* 2002; Diez 2007), tak kupříkladu světlo, které může inhibovat klíčení (Van Waes *et al.* 1986; Yamazaki *et al.* 2006; Ponert *et al.* 2011). Abiotické interakce jsou ale často spojeny s biotickými, například když jiný organizmus změní přirozené stanoviště – kompetice s jinými rostlinami o abiotický faktor jakým je dostatečné množství světla (Silvertown *et al.* 1994; Slaviero *et al.* 2016). Organismem významně měnícím abiotické podmínky je ale nejčastěji člověk, který mění přirozená stanoviště, např. zvyšuje salinitu, mění výskyt požárů či zvyšuje dezertifikaci (Sahagian 2000; Swarts *et al.* 2009). Přestože jsou mnohem více studovány orchideje, i u hruštičkových byl pozorován významný vliv abiotických faktorů jako množství světla (Matsuda *et al.* 2012) a jejich preference pro neutrální až vyšší pH (Jacquemyn *et al.* 2018) a spíše nižší obsah živin na lokalitách výskytu (Johansson *et al.* 2013; Jacquemyn *et al.* 2018). Z abiotických faktorů se výzkum soustřeďuje zejména na živiny.

1.2.2.1. Živiny v půdě ve vztahu k IM rostlinám

Je obecně známo, že orchideje preferují spíše na živiny chudé lokality. Často pozorovaná negativní korelace mezi zvýšenou koncentrací živin a výskytem orchidejí tomu nasvědčuje (Dijk *et al.* 1994; Silvertown *et al.* 1994; Mattila *et al.* 2000; Hejzman *et al.* 2010; Tsiftsis *et al.* 2012). Důležité je také zmínit, že některé práce nerozlišují efekt jednotlivých živin, ale zkoumají vícere dohromady (Silvertown *et al.* 1994; Hejzman *et al.* 2007).

Co se týká konkrétních živin, obsah fosforu negativně koreloval s rozšířením *Goodyera repens* (Tsiftsis *et al.* 2012) nebo způsobil pokles počtu kvetoucích rostlin *Anacamptis morio* (Silvertown *et al.* 1994) a *Dactylorhiza majalis* (Dijk *et al.* 1994). Početnost několika druhů

lučních orchidejí (*Dactylorhiza maculata*, *Platanthera bifolia* a *Listera ovata*) poklesla po aplikaci P v kombinaci s Ca nebo s Ca a N (dusičnan amonný), ale ne po aplikaci Ca nebo Ca a N bez P (Hejman *et al.* 2010). Nízké koncentrace P byly pozorovány také na stanovištích hruštičky *Pyrola rotundifolia*, a to jak na lesních stanovištích tak na dunách (Jacquemyn *et al.* 2018). Fosfor negativně ovlivňoval i semenáčky hruštičkových, konkrétně *Chimaphila umbellata* nebo klíčení *Moneses uniflora* (Johansson *et Eriksson* 2013). Naopak P neměl efekt na klíčení hruštičky *P. chlorantha* ani na semenáčky *O. secunda* (Johansson *et Eriksson* 2013).

Bylo pozorováno, že klíčivost australského druhu orchideje *Caladenia arenicola* pozitivně korelovala s množstvím draslíku v půdě (Batty *et al.* 2001) a draslík pozitivně koreloval i s výskytem *Dactylorhiza majalis* (Dijk *et Olff* 1994). Další vesměs pozitivní informace o vlivu draslíku na klíčení orchidejí jsou shrnuty v Rasmussen (1995). Menší pozornost byla věnována i vápenatým iontům Ca^{2+} , u kterých se předpokládalo, že spíše nemají žádný efekt (*cf.* Rasmussen 1995). Vápenaté ionty jsou ale nejspíš nezbytné k degradaci polymeru podobnému ligninu, který je hlavní složkou osemení a tedy nutné k vyklíčení semen (Barsberg *et al.* 2018).

Vedle fosforu (a draslíku) je významně studován také dusík. Vzhledem k tomu, že je pro tuto práci důležitý, je mu věnována následující kapitola.

1.2.2.2 Dusík v rostlinách

Dusík (N) je pro rostliny jednou z nejdůležitějších minerálních živin obsaženou v rostlině přibližně v 0,5-6 % sušiny. Je to esenciální makroprvek, stavební kámen proteinů, chlorofylu, aminokyselin či nukleových kyselin a jeho nedostatek rychle zhoršuje růst rostliny (Epstein 1994; Taiz *et Ziegler* 1998; Miller *et Cramer* 2005; Marschner 2011). Nitrát následován amonným iontem jsou nejvíce přijímané formy anorganického N rostlinou (Alvarez *et al.* 2012), ale přijímán může být i v organické formě zejména ve formě aminokyselin (Falkengren-Grerup *et al.* 2000; Finzi *et Berthrong* 2005; Näsholm *et al.* 2009).

1.2.2.3 Dusík a IM rostliny

Na rozdíl od většiny rostlin (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010; Dechorgnat *et al.* 2011) orchideje preferují příjem spíše organického dusíku než anorganického (Arditti 1967; Rasmussen 1995 a citace tam; Stewart *et al.* 2008; Sgarbi *et al.* 2009; Nadarajan *et al.* 2011). Také kultivační média pro kultivaci orchidejí *in vitro* většinou obsahují méně anorganického dusíku (Knudson 1922;

Ponert *et al.* 2011) než média pro ostatní druhy (Murashige *et al.* 1962) nebo dokonce žádný (Van Waes *et al.* 1986). Efekt nitrátu a amonného iontu se však u většiny studií nerozlišuje (Dijk *et al.* 1994; Dijk *et al.* 1995b; Mujica *et al.* 2021) a téměř vždy se uvádí efekt celkového dusíku (Hejman *et al.* 2010; Tsiftsis *et al.* 2012; Vogt-Schilb *et al.* 2020). Proto nelze stanovit, která forma byla odpovědná za pozitivní (*cf.* Dijk *et al.* 1995) nebo negativní efekt (*cf.* Silvertown 1994). Navíc obsah celkového dusíku v půdě sám o sobě neříká nic o množství pro rostliny dostupného dusíku. Přesto se zdá, že z anorganických forem je amonný iont orchidejemi obecně preferován před nitrátem (*cf.* Rasmussen *et al.* 1995).

Co s týče hruštiček, *Pyrola rotundifolia* preferuje lokality s nízkým obsahem nitrátu v půdě (0,78 mg/kg; Jacquemyn *et al.* 2018), ale Johansson *et al.* (2013) nepozorovali žádný efekt N na klíčení ani růst semenáčku tohoto druhu. Semenáčky *P. chlorantha* negativně reagovaly na obsah anorganického N v půdě (i když práce měřila nitrát a amonný iont, prezentované výsledky jsou sčítané hodnoty obou forem), zatímco *O. secunda* na živiny (P i N) v půdě nijak nereagovala (Johansson *et al.* 2013). Johansson *et al.* (2013) ale pozorovali i mírně pozitivní efekt N v půdě na klíčení hruštičky *P. minor*, ale nepozorovali žádný efekt na další růst semenáček tohoto druhu (Johansson *et al.* Eriksson 2013). Převažují tedy pozorování negativního efektu dusíku na hruštičkové, přičemž se zdá, že tyto rostliny preferují lokality s nižší koncentrací nitrátu v půdě (Johansson *et al.* Eriksson 2013; Jacquemyn *et al.* 2018).

Otázkou zůstává, jestli obsah živin ovlivňuje IMR přímo nebo nepřímo, například přes houbové symbionty nebo přes kompetici s jinými rostlinami (Rasmussen 1995; Batty *et al.* 2001). Lze předpokládat, že se bude jednat o přímý efekt na rostlinu, protože nitrát u rostlin často působí jako signál (Zhang *et al.* Forde 1998). Nicméně, opak naznačuje práce Mujica *et al.* (2016) s rodem *Bipinnula*, kde byla diverzita hub v kořeni negativně korelována s dusíkem v půdě. Navíc různé houbové izoláty i v rámci jedné taxonomické skupiny mohou reagovat na dusík rozdílně (Mujica *et al.* 2021).

1.2.2.4 Znečištění dusíkem

Po objevu Fritze Habera v r. 1908 a následné realizaci Karlem Boshem v r. 1914 se v továrně tzv. Haber-Boshovým procesem začala masivně průmyslově vyrábět dusíkatá hnojiva a jejich spotřeba se razantně zvýšila. Předěšlé metody totiž byly extrémně energeticky náročné (Smil 2001). Následoval větší obrat v koloběhu dusíku, který je projevem globální změny (Fowler *et al.* 2015). Dusík se do půdy dostává nejenom prosakováním z přehnojených polí, ale i pomocí

suché nebo mokré depozice ze vzduchu (Bowman *et al.* 2008; Engardt *et al.* 2017; Paladino *et al.* 2020). I když mokrá depozice v podobě kyselých dešťů je v současnosti méně intenzivní než v minulosti, množství biologicky reaktivního dusíku v prostředí se zvyšuje (Bowman *et al.* 2008). Ten nesnižuje jen diverzitu rostlin, ale také ovlivňuje mikrobiální aktivitu v půdě, rozklad organické hmoty a okyseluje půdu (Janssens *et al.* 2010). Jelikož se některé formy dusíku jako N_2O chovají jako skleníkové plyny, způsobuje N i zvyšování teploty planety (Fowler *et al.* 2015). Okyselování půdy např. kyselým deštěm vyčerpává kationty jako Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ nebo Mn^{2+} a zvyšuje obsah Al^{3+} a později Fe^{3+} v půdě často do toxických koncentrací (Bowman *et al.* 2008). Depozice reaktivního dusíku má množství přímých i nepřímých vlivů na změnu klimatu (Erisman *et al.* 2011, 2013).

V současnosti se nitrát v půdním roztoku na hnojených polích vyskytuje v rozmezí 1-6 mM, v půdě je mobilnější než jiné živiny a jeho koncentrace prudce kolísá (Lark *et al.* 2004; Miller *et al.* 2007; Kaiser *et al.* 2010). Zato amonný iont se vyskytuje v mnohem nižších koncentracích (20 μM -0.8 mM) a jeho koncentrace v půdě fluktuují méně (Lark *et al.* 2004; Miller *et al.* 2007). V přirozených podmínkách se v půdním roztoku koncentrace nitrátu pohybuje v rozmezí od 1-100 mg/l (tedy 16.129 μM – 1.6129 mM; Callesen *et al.* 1999; Pedersen *et al.* 2007; Fetter *et al.* 2012). Za zmínku stojí i práce zkoumající obsah nitrátu ve vodě. Lidskou činností neovlivněné vodní zdroje obsahují méně než 10 mg/l (161.2903 μM) nitrátu, zatímco v prostředí ovlivněném lidskou činností může kontaminace nitrátem dosahovat hodnot až 250 mg/l (4.0323 mM) (Feth 1966; Kreitler *et al.* Jones 1975). Feth (1966) dále tvrdí, že již hodnoty přesahující 3 mg/l (48.3871 μM) mohou indikovat lidskou činnost. Existenci problému, jakým je kontaminace nitrátem, naznačuje i jeho ukotvení v legislativě. V Evropské unii existuje tzv. nitrátová směrnice, předpis EÚ (Směrnice rady 91/676/EHS o ochraně vod před znečištěním způsobeném dusičnany ze zemědělských zdrojů), který je implementován do národních legislativ. Za znečištěné vodní plochy a ohrožené znečištěním označuje nitrátová směrnice ty které by mohly obsahovat nebo obsahují 50 mg/l nitrátu (Nitrátová směrnice).

2. Cíle práce

1. Zjistit, zda se citlivost semen orchidejí k nitrátu může lišit mezi druhy a jak míra citlivosti koreluje s úživností lokality, na které rostou.
2. Zjistit, zda působení dusičnanů na klíčení semen orchidejí může být ovlivněno houbovým symbiontem.
3. Zjistit, jaký zdroj uhlíku využívají podzemní orgány mixotrofních rostlin, jestli houbový, z vlastní fotosyntézy nebo jejich kombinaci.
4. Zjistit, jaký zdroj uhlíku využívají podzemní orgány albinotických forem mixotrofních rostlin, jestli houbový, z vlastní fotosyntézy nebo jejich kombinaci.
5. Zjistit, zda mohly být albinotické formy evolučním mezikrokem k mykoheterotrofnímu druhu u orchidejí a hruštiček.
6. Zjistit, jestli rozdíly v obsahu stabilních izotopů ^{13}C a ^{15}N lze vysvětlit houbovým společenstvem v kořeni a zda jsou autotrofní a mykoheterotrofní orchideje více specializované k mykorhizním houbám než mixotrofní orchideje.

3. Shrnutí publikovaných výsledků

Publikace v plném znění jsou v Přílohách.

3.1 Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content

Tomáš Figura, Martin Weiser, Jan Ponert. *Plant Biology*, 2019, 22: 21-29. (IF 1.529)

Testovali jsme odpověď na nitrát v podmínkách *in vitro* v kombinaci s půdní analýzou zaměřující se na dusík u sedmi druhů terestrických orchidejí. Oligotrofní horský *Pseudorchis albida*, druhy mezotrofních luk *Gymnadenia conopsea* a *Anacamptis morio*, mezotrofní druh močálů *Dactylorhiza majalis* a druhy rostoucí na úživnějších stanovištích jako jsou vlhkomilný *Anacamptis laxiflora*, luční *Ophrys neglecta* a ruderalní stanoviště často osídlující *Himantoglossum robertianum*.

Již extrémně nízké koncentrace nitrátu – 2 mg/l významně inhibovaly klíčení horského oligotrofního druhu *Pseudorchis albida* a koncentrace 10 mg/l snížila klíčivost téměř na nulu. Méně ale stále významně byl inhibován druh *Gymnadenia conopsea*, zatímco druhy *H. robertianum*, *A. laxiflora* a *O. neglecta* byly téměř necitlivé k nitrátu. Modelem předpovězená koncentrace, na které vyklíčí polovina semen daného druhu, byla nejnižší u *P. albida* a nejvyšší u *H. robertianum*, což odpovídá zjištěním výsledkům z *in vitro* experimentů.

Půda z lokalit, ze kterých pocházela semena, byla analyzována na obsah nitrátu, amonného iontu, uhličitanu vápenatého, celkového uhlíku a dusíku. Pozorovali jsme obecně velmi nízké koncentrace nitrátu v odebraných vzorcích ale relativně vysoké koncentrace celkového dusíku. Vzorky z lokalit, na kterých se vyskytovaly druhy s vysokou tolerancí k nitrátu, obsahovaly největší koncentrace nitrátu a také měly vysoký poměr C:N a nejvyšší obsah uhličitanu vápenatého. Naopak hodnoty z lokalit, na kterých se vyskytovaly oligotrofní druhy, se blížily mezi detekce. Toto zjištění by mohlo vysvětlovat, proč některé orchideje jako například druh *P. albida*, ubývají z přírody bez zjevných příčin. Koncentrace dusičnanů se v přírodě v poslední době zvyšuje i jinde než v zemědělských oblastech, což může mít za následek úbytek nejen oligotrofních druhů.

Hlavní zjištění:

Článek pojednává o tom, že všechny testované druhy orchidejí byly inhibovány nitrátem. Síla citlivosti na nitrát koreluje s trofií druhu a obsahem nitrátu v půdním roztoku lokality konkrétního druhu.

Prohlášení o podílu na autorství:

Drtivou většinu experimentální práce jsem provedl já s pomocí Dr. Oty Raucha (půdní analýzy), který není uveden jako autor. MW statisticky vyhodnotil data a vygeneroval grafy. JP a já jsme vymysleli design experimentů a napsali článek.

3.2. Fungal symbionts may modulate nitrate inhibitory effect on orchid seed germination

Tomáš Figura, Edita Tylová, Jana Jersáková, Martin Vohník, Jan Ponert. Mycorrhiza, 2021, 31(2): 231-241 (IF 3.069)

Článek se zabývá druhem *Dactylorhiza majalis* a zjišťuje, jestli houboví symbionti izolovaní z kořenů tohoto druhu mohou modulovat reakci semen na nitráty popsanou v předchozím článku. Použity byly dva izoláty rodu *Ceratobasidium*, dva izoláty rodu *Tulasnella* a jeden z rodu *Serendipita*. Experimenty proběhly v podmínkách *in vitro* na médiu OMA s asymbiotickými kontrolami na médiu OMA bez přidaného sacharidu a také na médiu MoN se sacharózou. Všechny testované izoláty, s výjimkou jediného izolátu *Tulasnella*, vytvořily v protokormech pelotony a signifikantně podpořily růst protokormů oproti kontrole. Klíčení semen bylo inhibováno nitrátem na všech variantách včetně asymbiotických kontrol na OMA ale i na MoN, kromě jediné – s izolátem „*Ceratobasidium* 1“. Zmíněný izolát „*Ceratobasidium* 1“ umožnil klíčení semen na inhibičních koncentracích dusičnanu a klíčivosti se na různých koncentracích dusičnanu významně neměnily. Předchozí publikované studie vysvětlovaly inhibiční efekt nitrátu nebo amonného iontu na klíčení orchidejí u symbiotických kultur změnou

vztahu mezi houbou a orchidejí, a to posunem houby k parazitizmu na orchideji v případě dostatku živin. To by mohlo znamenat, že naše „*Ceratobasidium* 1“ na rozdíl od ostatních testovaných houbových izolátů ztratilo schopnost parazitovat na protokormech. Další publikované studie ale odhalily že *Ceratobasidium* je schopné využít nitrát, zatímco *Serendipita* nebo *Tulasnella* ne a *Ceratobasidium* má geny kódující asimilaci nitrátu, zatímco *Tulasnella calospora* je nemá. Navíc *Ceratobasidium* je možné najít častěji na opuštěných polích nebo spáleništích, kde se dá čekat větší množství anorganických forem dusíku včetně nitrátu. Za zmínku stojí i fakt, že letos byla publikována studie popisující obdobné pozorování, kdy jeden izolát *Ceratobasidium* reagoval jinak než jiné, umožňoval klíčivost semen *Bipinnula fimbriata* na inhibičních koncentracích dusičnanu amonného.

Hlavní zjištění: Nitrát snížil klíčivost jak u kontrolních asymbiotických výsevů, tak u symbiotických. Jediný izolát dokázal zvrátit inhibiční efekt nitrátu na klíčící *Dactylorhiza majalis* a semena u této experimentální varianty nereagovala na přítomnost nitrátu v médiu.

Prohlášení o podílu na autorství:

Drtivou většinu experimentální práce jsem provedl já. E.T. udělala anatomické analýzy. JP a já jsme vymysleli design experimentů. JJ dodala některé houbové izoláty. Článek psali všichni autoři.

3.3 Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs

Félix Lallemand, Tomáš Figura, Claire Damesin, Chantal Fresneau, Chantal Griveau, Ninon Fontaine, Bernd Zeller, Marc-André Selosse. *New Phytologist* 2019, 221(1):12-17 (IF 8.512)

V tomto článku jsme zkoumali, jestli mixotrofní druh *Cephalanthera damasonium* využívá své vlastní fotosyntáty v podzemních orgánech. Na základě obsahu stabilních izotopů ^{13}C ve škrobu a různých rostlinných orgánech, obsahu škrobu v různých rostlinných orgánech, míry kolonizace kořenů a značení $^{13}\text{CO}_2$ tento článek vyhodnocuje, jakým způsobem jsou

vyživovány podzemní a nadzemní orgány mixotrofní orchideje *Cephalanthera damasonium* a její vzácné albinotické mutace.

Kolonizace, množství ani obohacení škrobu ^{13}C se mezi kořeny albinotických a zelených rostlin statisticky nelišily. Obsah stabilního izotopu ^{13}C byl vyšší ve škrobu z kořenů než v kořenech u obou albinotických i zelených forem, a byl výrazně více obohacen izotopy než kontrolní rostliny. Tyto poznatky nás vedly k závěru, že obě formy *C. damasonium* využívají houbový uhlík v podzemních orgánech.

V dalším pokusu jsme odizolovali listy zelených rostlin (ale ne formující se plody) vzduchotěsnou folií a vpustili značený $^{13}\text{CO}_2$, který rostlina přijímala několik hodin. Obsah stabilních izotopů ^{13}C jsme měřili na rostlinném materiálu z různých orgánů po 4, 25 a 126 dnech. Na 4. a 25. den byly stonky, listy ale zejména tobolky silně značené (přes 70 % značeného ^{13}C), listeny středně, oddenky a kořeny téměř vůbec. Značené fotosyntáty, které se přesunuly do podzemních orgánů tvořily od 1.7 % (4. den) - 7.6 % (126. den). Zdá se tedy, že alespoň později ve vegetační době, je rostlina schopná mobilizovat část svých fotosyntátů do kořene. Zkoumali jsme jen fertillní zelené rostliny a otázkou zůstává, jak reagují ti jedinci, který v daný rok neplodí.

Hlavní zjištění: Mixotrofní druh orchideje *Cephalanthera damasonium* využívá uhlík získaný z fotosyntézy v nadzemních orgánech, zatímco ten od mykorizní houby v podzemních.

Prohlášení o podílu na autorství: Vykonal jsem druhé opakování drtivé většiny experimentů (obsah škrobu, kolonizace, izotopy v škrobu a orgánech). Podílel jsem se výrazně i na vyhodnocování dat a na úpravách pozdějších verzí článku. FL vykonal největší část experimentů. M-AS, CD a BZ naplánovali a vymysleli experimentální design projektu. FL, NF, BZ and M-AS dělali značící pokus. Analýza škrobu a obsahu stabilních izotopů byla provedena FL, TF, CF, CG and NF. M-AS a FL napsali první verzi manuskriptu, kterou pak později editovali všichni autoři.

3.4 Mycorrhizal Communities and Isotope Signatures in Two Partially Mycoheterotrophic Orchids

Hans Jacquemyn, Rein Brys, Michael Waud, Alexandra Evans, Tomáš Figura and Marc-André Selosse. *Frontiers in Plant Science* 2021, 12:618140. doi: 10.3389/fpls.2021.618140 (IF 4.402)

Článek zkoumá diverzitu houbových symbiontů a míru závislosti na nich u dvou mixotrofních druhů rodu *Epipactis* (*E. neglecta* a *E. helleborine*), v dospělosti autotrofního druhu *Platanthera chlorantha* a mykoheterotrofního druhu *Neottia nidus-avis*. Zaměřili jsme se ale na kruštíky, protože míra jejich závislosti na houbových symbiontech ani míra specifity nebyly dostatečně známé. Co se týká houbových symbiontů, druhy rodu *Epipactis* byly jednoznačně generalisté, složení společenstva hub se mezi dvěma zkoumanými lokalitami výrazně lišilo. Naproti tomu v kořenech autotrofního druhu *P. chlorantha* a mykoheterotrofního druhu *N. nidus-avis* bylo nalezeno také více skupin hub, ale výrazně dominovala jedna skupina (Ceratobasidiaceae u *P. chlorantha*, Sebacinaceae u *N. nidus-avis*). Otázkou zůstává, jestli se jedná v případě těchto minoritních hub o symbionty nebo endofyty. Izotopové analýzy odhalily, že *N. nidus-avis* byl výrazně obohacen o stabilní izotopy ^{13}C a ^{15}N potvrzující jeho mykoheterotrofní status, zatímco druh *P. chlorantha* byl obohacen jen minimálně, což naznačuje autotrofní způsob výživy. *Epipactis neglecta* byl významně obohacen stabilními izotopy s hodnotami blízcími se mykoheterotrofům, zatímco obsah ^{13}C (ale ne ^{15}N) u *E. helleborine* dosahoval hodnot typických pro autotrofní druhy. Navíc v kořenech druhu *E. helleborine* jsme našli velké množství „rhizoctonií“, což je netypické pro lesní mixotrofní druh. Nepozorovali jsme významné rozdíly v intenzitě fotosyntézy ani stomatální konduktanci mezi oběma studovanými kruštíky. Předšlé studie navrhovaly, že druh *E. neglecta* je obohacen stabilními izotopy ^{15}N z důvodu specifické asociace k rodu *Tuber* nebo jiným askomycetům. Na našich lokalitách byl tento druh také obohacen významně ale rod *Tuber* (a jiné Ascomycota) byl jen minoritním mykobiontem. To naznačuje, že změny v houbovém společenstvu v kořeni neodráží obsah stabilních izotopů. Na rozdíl od případu rostlin *P. chlorantha* a *N. nidus-avis* nebyl žádný mykobiont v kořenech *Epipactis* dominantní, z čeho se dá usuzovat, že studované kruštíky jsou opravdovými generalisty.

Hlavní zjištění: Nalezli jsme množství různých houbových symbiontů v kořenech kruštíků a obsah stabilních izotopů se u obou druhů lišil. Rozdíly v houbových společenstvech ale nesouvisí s obsahem stabilních izotopů.

Prohlášení o podílu na autorství:

HJ and RB vymyslely studii. HJ, AE a MW sbírali materiál. MW udělal molekulární analýzy. M-AS a já jsme udělali izotopové analýzy včetně vyhodnocení. HJ napsal první verzi manuskriptu.

3.5 Communities of mycorrhizal fungi in different trophic types of Asiatic *Pyrola japonica sensu lato* (Ericaceae)

Yosuke Matsuda, Yusuke Yamaguchi, Naoko Matsuo, Takashi Uesugi, Junko Ito, Takahiro Yagame, Tomáš Figura, Marc-André Selosse and Yasushi Hashimoto. Journal of Plant Research (2020) 133:841–853 <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01233-9> (IF 2.185)

Článek těží z nového objevu prof. Yosuke Matsuda, který našel albinotickou variantu u nejspíše jediného „pravého“ mixotrofního druhu *Pyrola japonica* z Japonska. Zajímalo nás, jaká bude míra mykoheterotrofie a jaké mykobionty nalezneme u zelené hruštičky *Pyrola japonica*, její malolisté varianty *P. japonica f. subaphylla*, někdy vyčleňované jako samostatný druh, a u nově objevené albinotické varianty.

Zkoumali jsme dvě lokality, jednu s výskytem zelených rostlin *Pyrola japonica* i poddruhu se zakrslými listy *P. japonica* subsp. *subaphylla* a druhou lokalitu rovněž se zelenou *Pyrola japonica*, kde se vyskytovala i albinotická forma. Fylogenetická analýza odhalila, že všechny tři varianty tvoří monofyletickou skupinu, v rámci které lze vyčlenit *P. japonica f. subaphylla* jako subklád což se shoduje i předešlými pracemi který tento taxon vyčleňují jako poddruh (Liu *et al.* 2014) i jako samostatný druh (Suetsugu *et al.* 2021). Albinotické rostliny byly obohaceny izotopy podobně jako kontrolní houba *Russula*, což naznačuje mykoheterotrofní způsob výživy. Rovněž vzorky *P. japonica f. subaphylla* byly značně obohaceny izotopy oproti kontrolním autotrofním rostlinám, což naznačuje minimální zisk uhlíku z fotosyntézy. Vzhledem k absenci

heterotrofní reference z dané lokality (houba, mykoheterotrofní rostlina) nemůžeme v tomto případě určit, jestli tato forma získává uhlík i z fotosyntézy, ale zelené zakrslé listy alespoň minimálnímu zisku z fotosyntézy nasvědčují. Obě silně resp. plně mykoheterotrofní varianty měly všechny orgány podobně obohaceny stabilními izotopy ^{13}C , zatímco listy zelených rostlin byly obohaceny méně než podzemní orgány. To naznačuje, že listy zelené rostliny *Pyrola japonica* získávají uhlík z fotosyntézy a ten pravděpodobně zůstává zejména v listech. V trochu větším množství, než jak jsme pozorovali u orchidejí je ale transportován do podzemních orgánů (viz kapitola 3.3).

Všechny tři zkoumané rostlinné fenotypy byly silně specifické k rodu *Russula* ale ještě užší míru specifity vykazovali dvě varianty více závislé na houbách. Nejdominantnější houba „*Russula* 1“ byla sdílena mezi albinotickou a zelenou rostlinou *P. japonica*, zatímco druhá nejdominantnější houba „*Russula* 2“ byla nalezena jen v symbióze s *f. subaphylla* a chyběla u zelené hruštičky *P. japonica* na stejném stanovišti. Navrhujeme, že i když byly albinotické formy považovány za chybějící krok v evoluci mezi mixotrofním druhem a mykoheterotrofním, právě jedinci se zakrslými listy jakými je *P. japonica f. subaphylla* mohou být lepším kandidátem. Takovýto mezičlánek se zakrslými listy by vznikal postupně, pomaleji než albinotické varianty a mohl by se postupně specializovat na houbu, která jej lépe „uživí“, jakou je v našem případě „*Russula* 1“ nebo „*Russula* 2“, která byla nalezena jen u této varianty.

Hlavní zjištění: Nově objevená albinotická forma je úplně závislá na mykorrhizních houbách a *f. subaphylla* je pravděpodobně jen minimálně fotosyntetizující. Rostlina *P. japonica f. subaphylla* je ještě více specifická k houbě rodu *Russula* než zelená mixotrofní rostlina *P. japonica* a její albinotická varianta. *P. japonica f. subaphylla* se zdá být nejvhodnějším kandidátem jako mezičlánek v evoluci z mixotrofního k mykoheterotrofnímu druhu u hruštiček a je nejvíce specializovaná na konkrétního houbového symbionta.

Prohlášení o podílu na autorství:

Spolu s YM a M-AS jsem psal manuskript. YM a YH vymysleli projekt. YM, YY, TU, JI, TY a YH se podíleli na sběru dat v terénu, YY, NM a TU na analýzách obsahu stabilních izotopů, YM, YY, TU na molekulárních analýzách a YM statisticky vyhodnocoval data.

4. Diskuze

4.1 Abiotické interakce

4.1.1. Inhibiční efekt nitrátu na klíčení semen orchidejí

4.1.1.1 Koncentrace nitrátu na přirozeném stanovišti

Půdní roztok hnojeného pole může mít až 62-372 mg/l (1-6 mM) nitrátu, zatímco přirozené lokality vykazují výrazně nižší hodnoty nepřesahující 100 mg/l (1.613 mM; Callesen *et al.* 1999; Pedersen *et al.* 2007; Fetter *et al.* 2012). Již hodnoty 3-10 mg/l (48.3871 μ M-161.2903 μ M) lze ale považovat za výsledek lidské činnosti (Feth 1966; Kreitler *et Jones* 1975). Na přirozených studovaných lokalitách jsme naměřili 0.03-1.18 μ g/g (483.831 pM-19.03 nM) nitrátu v půdním roztoku, což jsou hodnoty typické pro neproduktivní přirozené louky (*cf.* Březina *et al.* 2019). Zároveň jsme naměřili relativně vysoké koncentrace celkového dusíku (1.9 - 9.5 mg/g; Figura *et al.* 2021) i na lokalitách výskytu druhů citlivých na nitrát. Takovéto relativně vysoké koncentrace byly na orchidejových lokalitách již naměřeny a jsou porovnatelné se zemědělskou půdou (Krehan 2009; Tsiftsis *et al.* 2012). To svědčí o tom, že měřit celkový dusík, jak je často ve studiích studující vliv živin na orchideje a zároveň nerozlišovat efekt jednotlivých forem dusíku (Dijk *et Eck* 1995b; Diez 2007; Vogt-Schilb *et al.* 2020) nebo dokonce spojovat efekt živin dohromady (Hejzman *et al.* 2007) nemá dostatečnou výpovědní hodnotu a je nutné rozlišovat jednotlivé živiny a jejich formy. Na druhou stranu v naší studii (Figura *et al.* 2021) jsme provedli jediné měření. Zejména dusičnany jsou v půdě v čase i prostoru extrémně mobilní a jejich dynamika je rok od roku odlišná (Březina *et al.* 2019). Přestože jsme měřili v zimě, kdy je mikrobiální aktivita zpomalena a obsah dusičnanů kolísá minimálně (Weil *et Brady* 2016; Kabala *et al.* 2017), mohli jsme zaznamenat nereprezentativní hodnoty. V dalších studiích by bylo vhodné naše závěry ověřit opakovaným měřením vysoce mobilních živin, zejména dusičnanů ale i fosfátu a amonného iontu, po dobu alespoň jedné vegetační sezóny a na několika místech v rámci lokality.

4.1.1.2 Míra citlivosti jednotlivých druhů orchidejí

Ze sedmi námi studovaných druhů se na lokalitách s nejnižší koncentrací nitrátu v půdě vyskytoval druh *Pseudorchis albida*, který byl zároveň nejcitlivější v asymbiotických *in vitro* experimentech, kdy byl inhibován již koncentrací 2 mg/l nitrátu v médiu (Ponert *et al.* 2013, Figura *et al.* 2019). Je známo, že tento druh preferuje oligotrofní horské louky (Jeřábková 2006; Jersáková *et al.* 2011) a Ellenbergovy indikační hodnoty pro živiny tento druh označují jako

oligotrofní (Ellenberg *et al.* 1991). Velkou mírou citlivosti vykazoval také druh mezotrofních až oligotrofních luk *Gymnadenia conopsea* (Zajac *et al.* 2016), mokřadní *Dactylorhiza majalis* a luční *Anacamptis morio*, které v přírodě ubývají z důvodu ztráty stanovišť a jejich hnojení (Procházka *et al.* 1999). Nejméně citlivým v asymbiotických *in vitro* experimentech byl druh *Himantoglossum robertianum*, který se běžně vyskytuje na ruderalních stanovištích jako na okrajích cest nebo opuštěných polích (Delforge 2006; Petrou *et al.* 2011; Antonopoulos *et Tsiftsis* 2017; viz Obrázek 4 zobrazující lokality příbuzného druhu *H. hircinum*). Půdní analýzy odhalily nejvyšší obsah nitrátu právě na lokalitě druhu *H. robertianum*. Rostliny *Anacamptis laxiflora* a *Ophrys neglecta* rovněž osídlující eutrofnější biotopy byly po *H. robertianum* nejméně citlivé druhy (Figura *et al.* 2019).



Obrázek 4: Lokality výskytu druhu *Himantoglossum hircinum*, okraj pole (A) a silnice (B)

Různé druhy projevily různou mírou citlivosti k nitrátům, ale všechny byly negativně ovlivněny koncentracemi, které se v půdě mohou reálně vyskytovat a v poslední době narůstají (Callesen *et al.* 1999; Pedersen *et al.* 2007; Fetter *et al.* 2012). Některé druhy orchidejí z přirozených lokalit ubývají bez zjevných příčin (Jersáková *et al.* 2011) a lze se domnívat, že nitrát může být přímo odpovědný za úbytek alespoň některých druhů – zejména těch citlivých. Koncentrace dusíku v půdě a vodě v poslední době narůstá (Bowman *et al.* 2008; Engardt *et al.* 2017; Paladino *et al.* 2020). Využívání spalovacích motorů a hnojiv produkuje velké množství dusíku (např. reaktivního a dusičnanů) v prostředí, který patrně podporuje kompetičně silnější druhy a tím snižuje diverzitu rostlin (Janssens *et al.* 2010). Lze očekávat, že produkce reaktivních forem dusíku a používání dusičnanových hnojiv se bude spíše zvyšovat než snižovat. To by mohlo snižovat početnost orchidejí jednak přímo skrze ovlivnění klíčení semen. Jednak nepřímo kdy mohou být orchideje na úživnějších lokalitách vytlačovány kompetičně silnějšími druhy (Gloser *et al.* 2007; Hornemann *et al.* 2012). Zvyšování koncentrace dostupných forem dusíku je projevem globální změny, který se může v budoucnosti podepsat (a již se zjevně projevuje)

společně s např. destrukcí stanovišť (Swarts *et* Dixon 2009) na dalším dramatickém úbytku orchidejí v přírodě.

4.1.1.3 Houby mohou zmírnit citlivost orchidejí k nitrátům

Symbiotické houby byly izolovány z jednoho druhu citlivého k nitrátům – *Dactylorhiza majalis*. V podmínkách symbiotického výsevu *in vitro* se čtyřmi z pěti testovaných izolátů (2 *Ceratobasidium*, 2 *Tulasnella*, 1 *Serendipita*) klíčivost *D. majalis* klesala se zvyšující se koncentrací nitrátu v kultivačním médiu. Jeden izolát rodu *Ceratobasidium* zrušil inhibiční efekt nitrátu (Figura *et al.* 2021). Negativní efekt nitrátu na symbiotické kultivace *D. incarnata* s houbou *Rhizoctonia sp.* v podmínkách *in vitro* popisuje Beyrle *et al.* (1991), i když zkoumal jen jedinou koncentraci (21 mg/l). Inhibiči anorganickým dusíkem pozorovali rovněž Dijk *et* Eck (1995a), kteří popisují, že protokormy rostoucí s rodem *Ceratobasidium* (anamorfa *Ceratobasidium*) byly citlivější k nitrátům než *Epulorhiza* (anamorfa *Tulasnella*). Bohužel tato práce nerozlišuje efekt nitrátu a amonného iontu a rovněž používá velmi vysoké koncentrace, se kterými se na přirozeném stanovišti nesetkáme. Námi pozorované snížení citlivosti k nitrátům při klíčení *D. majalis* s jediným izolátem *Ceratobasidium* je nápadně podobné se zjištěním chilského týmu u orchideje *Bipinnula fimbriata*, kde ze čtyř izolátů rodu *Ceratobasidium* dva umožnily růst na inhibiční koncentraci dusičnanu amonného a dva nikoli (Mujica *et al.* 2021). Bohužel ani tato studie nerozlišovala efekt nitrátu a amonného iontu. Předešlé práce vysvětlovaly rozdílný efekt různých izolátů hub změnou vztahu houby k orchideji z mutualizmu na parazitismus (Beyrle *et al.* 1991, 1995; Dijk *et* Eck 1995a). Novější poznatky ale otevírají další možnost. Různé izoláty rodu *Ceratobasidium* rostly mnohem rychleji na médiu obohaceném o dusík než izoláty rodů *Tulasnella* či *Serendipita* (Hadley *et* Ong 1978; Nurfadilah *et al.* 2013). Navíc práce Fochi *et al.* (2017) popisuje absenci genů kódujících asimilaci nitrátu u *Tulasnella calospora* na rozdíl od rodu *Ceratobasidium*, které je má. Druhy rodu *Ceratobasidium* jsou navíc početnější na lokalitách jako opuštěné pole nebo spáleniště, kde lze očekávat vyšší obsah živin jako jsou opuštěné pole nebo spáleniště (Thixton *et al.* 2020; Vogt-Schilb *et al.* 2020).

Námi testované „*Ceratobasidium* 1“, které umožnilo klíčení na inhibičních koncentracích nitrátu tedy mohlo buď ztratit schopnost stát se při vyšším množství živin na orchideji parazitické, nebo jen díky své lepší schopnosti asimilovat dusík ve formě nitrátu mohlo například využít nitrát v médiu a metabolizovat jej, takže nitrát pro orchidej již nevykazoval překážku pro klíčení (Figura *et al.* 2021). Otázkou zůstává, jestli na hnojených lokalitách budou

upřednostněny houby jako „*Ceratobasidium* 1“. Tuto možnost by podporoval například pozorovaný častější výskyt Ceratobasidiaceae na úživnějších stanovištích (Thixton *et al.* 2020; Vogt-Schilb *et al.* 2020). Nitrát snížil diverzitu orchideoidních hub v kořenech dvou chilských orchidejí rodu *Bipinnula* a naopak fosfor jejich diverzitu zvýšil (Mujica *et al.* 2016). Podobně bylo pozorováno i snižování diverzity erikoidních hub při zvýšení koncentrace dusíku a fosforu v půdě na málo úživných stanovištích (Van Geel *et al.* 2020) ale i u arbuskulárních (Ceulemans *et al.* 2019) a ektomykorhizních hub (Van der Linde *et al.* 2018; Lilleskov *et al.* 2019). Živiny včetně nitrátu tvarují nejen rostlinná společenstva a zjevně snižují početnost orchidejí na lokalitě (Silvertown *et al.* 1994, naše výsledky), ale ovlivňují i houbová společenstva (Mujica *et al.* 2016). Nárůst koncentrace dusičnanů však ovlivňuje také mikrobiální společenstva nebo např. ovlivňuje rozklad organické hmoty v půdě (Janssens *et al.* 2010), čímž může ovlivňovat i houby.

4.1.1.4 Význam a evoluce nitrátové inhibice

U většiny rostlin je přítomnost nitrátu v půdě signálem pro zintenzivnění růstu kořenů směrem k jeho zdroji (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010). Společně s amonným iontem jsou to nejvíc přijímané formy anorganického dusíku rostlinou (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010; Dechorgnat *et al.* 2011; Alvarez *et al.* 2012). Orchideje vyhledávají na živiny chudé lokality (Swarts *et al.* Dixon 2017) a po přihnojení lokality jejich počty klesají (Silvertown *et al.* 1994; Hejzman *et al.* 2010; Swarts *et al.* Dixon 2017). Zjistili jsme, že nitrát inhibuje jejich klíčení i v extrémně nízkých koncentracích (Figura *et al.* 2019, 2021). Předpokládáme, a naše výsledky tomu naznačují, že orchideje klíčí na (mikro)lokalitách bez nitrátu. Otázkou ale zůstává, proč. Důvodem může být specializace na místo s nízkou kompeticí. Orchideje jsou spíše S-stratégové, vyhýbající se kompetici (Dressler 1981). Vzhledem k vysoké mobilitě nitrátu v čase a prostoru (Lark *et al.* 2004; Miller *et al.* 2007; Kaiser *et al.* 2010; Dechorgnat *et al.* 2011; Březina *et al.* 2019) lze očekávat, že místo, které je v daném momentu nevhodné, se časem může stát pro klíčení vhodné. Jiné v čase a prostoru proměnlivé živiny jako amonný ion nebo fosfát (Lark *et al.* 2004; Miller *et al.* 2007; Březina *et al.* 2019) mají pomalejší obrat. Semena by tak mohla „čekat“ na vhodnější podmínky a nitrátová inhibice se v evoluci mohla vyvinout jako mechanismus zabraňující klíčení na lokalitách s velkou kompeticí. Obecně se předpokládá, že prachová semena mají velmi dobrou schopnost se šířit a to jak vzduchem, tak vodou (Rasmussen 1995 a citace tam), což lze očekávat vzhledem k jejich minimální velikosti a hmotnosti (Leake 1994; Arditti *et al.* Ghani 2000). Přesto některé práce, které se šířením semen

experimentálně zabývaly, popisují opak (Jersáková *et Malinová* 2004; Johansson *et al.* 2014). Tyto práce ale využívají lepkových pastí – jakmile se semena nalepí, dál už nepoletí ani nebudou unášeny vodou. Klíčení orchidejí je často pozorováno zejména v blízkosti mateřské rostliny (Jacquemyn *et al.* 2017) což by nízkou mobilitu semen orchidejí podporovalo. Je ale možné, že klíčení je častější v blízkosti dospělé rostliny například z důvodu, že dané místo má vhodný pool symbiotických hub a/nebo vhodné půdní podmínky (např. absenci nitrátu). Vzhledem k tomu že IM rostliny produkují tisíce semen, tak i kdyby většina zůstala v blízkosti mateřské rostliny a jen část se dostala dál, pokryjí velké území a mohou lehce kolonizovat vhodná stanoviště – třeba ta méně úživná. Navíc alespoň některá orchidejová semena neztrácejí rychle klíčivost (Whigham *et al.* 2006; Rasmussen *et Pedersen* 2012, naše pozorování kdy 80 % semen *Himantoglossum robertianum* klíčilo i po 8 letech skladování v pokojové teplotě) a mohou tedy „čekat“ na lepší podmínky. Není známo, jak nitrátová inhibice funguje, jestli se jedná o pouhou neschopnost nitrátů využít, nebo působí na nějakou signální dráhu. Druhá možnost se zdá pravděpodobnější, protože v případě té první by se dal očekávat spíše pomalejší růst rostlin než neschopnost vyklíčit a semena by alespoň protrhla osetím a vytvořila malé protokormy, jako tomu bylo u našich experimentů na jednoduchém médiu OMA (které obsahuje jen agar a ovesné vločky, Ercole *et al.* 2015). Vzhledem k výše uvedenému bude citlivost k nitrátům nejspíš adaptivní vlastnost snižující mortalitu protokormů na nevhodném místě. Míst s vysokou koncentrací nitrátů recentně přibývá díky intenzivnímu hnojení polí a atmosférické depozici dusíku zpět do půdy (Bowman *et al.* 2008; Engardt *et al.* 2017; Paladino *et al.* 2020). Proto je studium této problematiky nanejvýš žádoucí. Vzhledem k tomu že i symbiotické houby jsou ovlivňovány zvýšenými koncentracemi živin v půdě, lze očekávat že i jiné skupiny mykorrhizních rostlin obývajících oligotrofní stanoviště jako např. hruštičky budou podobně strádat jako orchideje.

Nikdy nebyla testována reverzibilita nitrátové inhibice, která by se dala testovat např. *in vitro*, přenosem semen z média obohaceného nitrátem na médium bez nitrátu. To by nám umožnilo zjistit, jestli může např. vyklíčené semeno „čekat“ až se např. nitrát z okolí vyplaví. Bylo by také vhodné zjistit, jestli je nitrát odpovědný přímo za inhibiční efekt, který způsobuje, nebo je tento efekt zprostředkován nějakou jinou formou vzniklou jeho metabolizmem.

4.2 Biotické interakce

4.2.1 Evoluce mykoheterotrofie

4.2.1.1 Evoluce mykoheterotrofie s albinotickými formami jako mezičlánkem

Delší dobu se předpokládalo, že vzniku mykoheterotrofního druhu evolučně předchází právě albinotické formy a ty představují „chybějící krok“ k evoluční fixaci mykoheterotrofního druhu (Shefferson *et al.* 2016). Tyto formy ale mají nízkou fitness (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014; Shefferson *et al.* 2016) a zdá se tedy málo pravděpodobné, že mykoheterotrofní druh vznikne náhlou ztrátou schopnosti fotosyntetizovat (Roy *et al.* 2013). Jeden z důvodů nízké fitness albinotických forem jmenovaných v práci Roy *et al.* (2013) bylo, že jsou příliš nápadné (bílá rostlina na obvykle hnědém nebo zeleném pozadí), a proto podléhají častěji herbivorii (Roy *et al.* 2013, vlastní pozorování). Mykoheterotrofní druhy jsou tmavšího zbarvení – nejsou bílé ale hnědé nebo fialové a tedy lépe splývají s okolím (Roy *et al.* 2013). Tuto podmínku splňují druhy *Neottia nidus-avis*, *Monotropa hypopitys* i námi studovaná hruštička *P. japonica* subsp. *subaphylla* na rozdíl od kupříkladu albinotické formy *P. japonica* (Matsuda *et al.* 2020; Obrázek 5). Albinotické formy orchidejí navíc v přírodě dříve usychají, jsou náchylnější k patogenům, mají nižší bazální metabolismus a mají méně semen s nižší klíčivostí (Roy *et al.* 2013). Navíc naše výsledky naznačují, že mixotrofní lesní orchideje i jejich albinotické mutanty mají podzemní orgány vyživované téměř výlučně houbou a nadzemní vlastní fotosyntézou (Lallemand *et al.* 2019, viz kapitola 4.2.1.2). V případě albinotických forem by tohle vysvětlovalo, proč mají nadzemní části malou životnost a málo semen s nízkou klíčivostí, pokud vůbec nějaká mají. Roy *et al.* (2013) navrhuje, že evoluční posun směrem k mykoheterotrofii vyžaduje alespoň redukci listů a stomat a nové možnosti ochrany před patogeny a herbivory a ne rychlý přechod k nevitálním albinotickým formám. Naše výsledky tuto hypotézu podporují a to jak u orchidejí (Lallemand *et al.* 2019) tak u hruštiček (Matsuda *et al.* 2020).

4.2.1.2 Zdroj uhlíku z houbového symbionta a vlastní fotosyntézy

Na rozdíl od většiny rostlin, orchidejová semena obsahují jen minimální množství zásobních látek, a proto jsou orchideje v raných ontogenetických stádiích plně závislé na houbovém symbiontu (Rasmussen *et al.* 2015). Podobnou závislost na houbě známe u hruštičkových (Tedersoo *et al.* 2007; Matsuda *et al.* 2012; Hynson *et al.* 2013) a lze ji očekávat i u dalších rostlin s malými semeny (Eriksson *et al.* 2011). Dospělé orchideje (Jacquemyn *et al.* 2021) i hruštičky (Matsuda *et al.* 2012, 2020; Lallemand *et al.* 2017) mohou být buď mixotrofní, autotrofní nebo heterotrofní. Míra závislosti mixotrofního druhu na houbovém uhlíku se druh

od druhu liší a existuje plynulé kontinuum od autotrofie po mykoheterotrofi (viz např. Jacquemyn *et al.* 2021). I autotrofní druhy ale mohou od houby nějaké látky přijímat a nezelené mykoheterotrofní druhy mohou poskytovat hyfám jiné benefity – např. ochranu (Selosse 2014). Co je autotrofní druh a jestli mykoheterotrofové neposkytují žádnou „odměnu“, je stále předmětem diskuze.

Další nezodpovězenou otázkou bylo, zda se u mixotrofních orchidejí může lišit míra využití uhlíku z fotosyntézy a z hub v jednotlivých částech rostliny. Na základě obsahu stabilních izotopů v různých orgánech, míry houbové kolonizace kořenů (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014), nebo intenzity fotosyntézy (Roy *et al.* 2013) silněji na houbě závislých mixotrofních druhů orchidejí se předpokládá, že houba vyživuje podzemní orgány a fotosyntéza nadzemní (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014). Rašící prýty u rodů *Epipactis*, *Cephalanthera* a *Cymbidium* jsou téměř plně heterotrofní a po dobu sezóny postupně více využívají uhlík ze své vlastní fotosyntézy, při kvetení a tvorbě semen jsou již téměř plně autotrofní (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014; Suetsugu *et al.* 2018).

V našem výzkumu jsme tuto hypotézu ověřili analýzou obsahu stabilních izotopů přímo ze škrobu extrahovaného z kořenů u zelených i albinotických forem *C. damasonium* a sledováním pohybu značeného ^{13}C , kterým jsme v podobě $^{13}\text{CO}_2$ značili listy tohoto druhu. Zimní zásobní škrob byl významně obohacen o stabilní izotopy ^{13}C a jeho množství se nelišilo mezi zelenou a albinotickou variantou, což naznačuje houbový původ jeho uhlíku. Značený ^{13}C se transportoval jen v minimální míře do podzemních orgánů (Lallemand *et al.* 2019). Tato zjištění jsou v souladu s předchozím výzkumem (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014) a umožňují lépe vysvětlit, proč mají albinotické varianty méně tobolek s menšími semeny, která mají nižší klíčivost. Albinotické varianty „počítají“ s uhlíkem z fotosyntézy, který zelená varianta dostává, takže houbový uhlík nezásobuje nadzemní části dostatečně. Zkoumali jsme ale jen kvetoucí rostliny a není jasné, jestli podobně reagují i sterilní jedinci, kteří fotosyntázy nepotřebují na tvorbu květů a semen. Na základě předešlých výzkumů a naší práce (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014; Lallemand *et al.* 2019) lze předpokládat, že výživa podzemních orgánů houbou a nadzemních vlastní fotosyntézou bude společným znakem všech mixotrofních (alespoň těch více na houbě závislých) orchidejí tribu Neottieae a možná dokonce všech mixotrofních Epidendroideae (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014; Suetsugu *et al.* 2018; Lallemand *et al.* 2019). Bylo by ale vhodné prozkoumat více druhů. Obdobné pozorování, že podzemní orgány byly více obohaceny o stabilní izotopy ^{13}C než nadzemní je i u hruštičkových a to jak v naší práci u *P. japonica* (Matsuda *et al.* 2020) tak u *P. chlorantha* v práci Johansson

et al. (2015). V případě studované *P. japonica* jsme ale pozorovali, že kořeny a oddenky zelených rostlin byly obohaceny méně, než u albinotických variant, na základě čeho předpokládáme přesun alespoň části fotosyntátů do podzemních orgánů, který bude pravděpodobně ještě o něco vyšší než u orchidejí (Matsuda *et al.* 2020). Zatím ale neexistuje u hruštiček žádná práce využívající značení stabilními izotopy, ani taková, která by sledovala obohacení hruštiček stabilními izotopy v průběhu roku. V budoucnosti by bylo dobré takové experimenty provést, abychom věděli, zda-li se množství houbového uhlíku v průběhu roku liší a jaké množství se přesouvá z nadzemních částí do podzemních a *vice versa*.

4.2.1.3 Specializace k houbovému partneru

Formy mixotrofních rostlin s redukovanými ale zelenými fotosyntetizujícími listy (jako je *P. japonica* f. *subaphylla*) se specializují, dokonce více než albinotické formy, na určitého houbového symbionta, pravděpodobně takového, který dodává nejvíce uhlíku (Matsuda *et al.* 2020). V této práci byl studovaný druh *P. japonica* specializovaný na rod houby *Russula* a právě fenotypy s nižší fotosyntézou byly více specifické ke konkrétní houbě. Nejselektivnější byla právě *P. japonica* f. *subaphylla*, která asociovala s druhým nejčastějším izolátem „*Russula* 2“. Tato forma se zakrnělými listy nesdílela symbiotickou houbu „*Russula* 2“ se zelenou mixotrofní *P. japonica*, na rozdíl od albinotické formy, která nejdominantnější „*Russula* 1“ se zelenou *P. japonica* v rámci lokality sdílela (Matsuda *et al.* 2020). Zjištění, že albinotické formy mají podobné ne-li stejné houby v kořenech jako jejich zelené varianty popisuje i práce Suetsugu *et al.* (2019) na orchideji *Goodyera velutina* nebo práce Suetsugu *et al.* (2017) na druhu orchideje *Epipactis helleborine*. Předchozí práce Matsuda *et al.* (2012) ukazuje také na zvýšenou specifitu *P. japonica* k *Russula* spp. při zhoršeném osvětlení, tedy při snížené schopnosti rostliny fotosyntetizovat. Přirozené zastiňování lokality obvykle trvá delší dobu a rostlina má možnost se postupně přizpůsobit (Selosse *et Rousset* 2011). Na druhou stranu mixotrofní rostliny jsou nejčastěji generalisté, což jsme pozorovali při studiu dvou mixotrofních kruštíků *Epipactis helleborine* a *E. neglecta* (Jacquemyn *et al.* 2021), zatímco mykoheterotrofní a v dospělosti autotrofní (nebo téměř autotrofní) druhy jsou obvykle více specifické (Jacquemyn *et al.* 2021). Mykoheterotrofní druhy jsou sice typicky specializované, výjimkou je snad jen druh *Pyrola aphylla* (Hynson *et Bruns* 2009) ale zde existují pochybnosti, například se nedá vyloučit tzv. kryptická specializace (Suetsugu *et al.* 2021). Právě malolisté druhy dlouho považované za mykoheterotrofní, byť podle novějších výzkumů s minimální schopností fotosyntetizovat, jako je *Limodorum abortivum* (Girlanda *et al.* 2006) a *Corallorhiza trifida*

(Zimmer *et al.* 2008; Cameron 2009), jsou specifické. Tak jako námi studovaná hruštička *P. japonica* f. *subaphylla* i téměř bezlistý druh orchideje *Limodorum abortivum* asociuje dokonce právě s houbami rodu *Russula* (Girlanda *et al.* 2006). Asociace s rodem *Russula* byla u mykoheterotrofních rostlin pozorována často, většinou jako dominantní nebo dokonce jediný symbiont. Navíc k výše uvedeným rostlinám asociujících s rodem *Russula* patří například druhy *Monotropastrum humile* (Bidartondo *et* Bruns 2001), *Monotropa uniflora* (Kong *et al.* 2015) rod *Lecanorchis* (Okayama *et al.* 2012) nebo *Erytrorchis* (Dearnaley 2006; Ogura-Tsujita *et al.* 2018 a citace tam). Je možné, že některé houby jako např. rodu *Russula* mohou být lépe schopny uživit i téměř mykoheterotrofní a mykoheterotrofní rostliny a tyto rostliny se na ně právě pro to specializují. V tropech, kde jsou ektomykorhizní houby méně časté, žijí mykoheterotrofní rostliny často arbuskulární houby, zejména ze skupiny „Glomus A“ (Bidartondo *et al.* 2002; Yamato *et al.* 2011a; Suetsugu *et al.* 2012) nebo saprotrofní houby (Martos *et al.* 2009). Zajímavé je, že saprotrofní houby s mykoheterotrofními rostlinami neasociují mimo tropické oblasti. Důvodem může být, že je nedokážou uživit (Martos *et al.* 2009).

Dva výše zmíněné druhy orchidejí *Corallorhiza trifida* a *Limodorum abortivum* jsou nejenom specifické, ale jsou i hnědé nebo nafialovělé, splývající s podkladem podobně jako námi studovaná hruštička *P. japonica* f. *subaphylla* (Girlanda *et al.* 2006; Zimmer *et al.* 2008; Cameron 2009; Obrázek 5). Lepší splynutí s prostředím na rozdíl od albinotických forem umožňuje eliminovat nadměrnou herbivorii, která je u albinotických forem pozorovaná (Roy *et al.* 2013). Zmíněné orchideje a hruštička s redukovanými listy se tedy zdají být postupnější, méně přímočařejší evoluční krok směrem k vzniku mykoheterotrofního druhu z mixotrofního než albinotické formy a takovýto „mezičlánek“ se zakrslými listy lze pozorovat i např. u skupiny *Pyrola picta*, kde jedinci *Pyrola aphylla* výjimečně produkují miniaturní zelené listy (Hynson *et* Bruns 2009).



Obrázek 5: Albinotické formy orchidejí (A-C); mixotrofní druhy orchidejí s redukovanými listy jako pravděpodobnější mezikroky k evoluci k mykoheterotrofnímu druhu (D-F) a nefotosyntetizující mykoheterotrofní druhy (G-H). *Cephalanthera damasonium*, albinotické a v pozadí zelená rostlina (A); *Epipactis purpurata* albinotická forma (B); *Cephalanthera rubra*, albinotická forma, ale pravděpodobně s částečně funkčním fotosyntetickým aparátem (C); mixotrofní, ale hnědě zbarvený druh *Corralorhiza trifida* rostoucí na zajímavé lokalitě – vysokohorské tundře se zakrslými druhy rodu *Salix* sp. (D); detail květenství *Corralorhiza trifida* (E); mixotrofní ale fialově zbarvený druh *Limodorum abortivum* (F); mykoheterotrofní druhy *Epipogium aphyllum* (G) a *Neottia nidus-avis* (H)

4.2.1.4 Generalizmus vs. specificita

Některé studie popisují druhy orchidejí jako specifické k houbovým symbiontům (Schiebold *et al.* 2017; Shefferson *et al.* 2019) a *vice versa* (Jacquemyn *et al.* 2015; Jacquemyn *et al.* 2016a; Jacquemyn *et al.* 2017; Waud *et al.* 2017). Otázka specificity je ale nejasná. Často jsou v kořenech nalézány houby, u kterých se nepředpokládá, že jsou symbiotické, a jsou považovány za endofyty. Takovéto houby ale mohou přispívat určitou mírou k prospěchu orchideje. Na druhou stranu některé druhy označované jako generalisté mohou být ve skutečnosti tzv. „zdánliví generalisté“, kteří asociují s jednou dominantní skupinou hub a ostatní jsou jenom endofyti nebo dokonce paraziti (Shefferson *et al.* 2019). Do této kategorie z naší studie zapadá *Neottia nidus-avis*, jednak *Platanthera chlorantha*. V případě orchidejí rodu kruštíky (*Epipactis*) se ale na různých lokalitách (Jacquemyn *et al.* 2021) i v rámci areálu houbové společnosti v kořenech liší (Xing *et al.* 2020) a žádná houba výrazně nedominuje (Jacquemyn *et al.* 2021). Kruštíky (a patrně i některé jiné mixotrofní rostliny) jsou tedy nejspíše

oportunisti, kteří si vybírají z lokálně dostupných hub a nejsou úzce specializováni jak bylo navrženo předtím (Schiebold *et al.* 2017), resp. takováto úzká specializace u orchidejí nenastává často (Jacquemyn *et al.* 2021).

5. Závěry

Cíle byly splněny a lze shrnout následující:

1. Většina testovaných druhů orchidejí je citlivá na nitrát v nízkých koncentracích. Síla inhibičního efektu odpovídá úživnosti stanoviště daného druhu, Ellenbergovým indikačním hodnotám a koncentraci nitrátu na lokalitě. Oligotrofní druhy jsou citlivější k nižším koncentracím nitrátu než ty rostoucí na více eutrofních lokalitách. Lze předpokládat, že nitrát je alespoň částečně odpovědný za recentní úbytek některých druhů orchidejí z přírody.
2. Citlivost orchidejí k nitrátu může záviset na identitě symbiotické houby. Přinejmenším jeden izolát rodu *Ceratobasidium* může umožnit klíčení na jinak inhibičních koncentracích.
3. U orchidejí tribu Neottiineae zásobují houboví symbionti především podzemní orgány, zatímco fotosyntéza nadzemní, včetně tvorby semen. Transport fotosyntátů do podzemních orgánů je minimální.
4. Albinotické formy mixotrofních rostlin mají velmi nízkou fitness. U orchidejí to může být způsobeno mimo jiné tím, že nadzemní části jsou živěny převážně fotosyntézou, která u albinotických forem chybí.
5. Formy se zakrslými listy se specializují na určitého houbového symbionta, pravděpodobně takového, který „poskytne více“ uhlíku. Takováto postupná specializace je pravděpodobnější evoluční cestou z mixotrofie k mykoheterotrofii než náhlý skok přes albinotické formy.
6. Obsah stabilních izotopů neodráží změny v houbovém společenstvu v kořeni orchideje. Předěšlé zjištění, že vysoký obsah ^{15}N je způsoben vysokým podílem Ascomycota, zejména *Tuber sp.*, se nepotvrdilo. Mixotrofní druhy kruštíků obsahují v kořenech větší diverzitu hub než autotrofní nebo mykoheterotrofní druhy, což nasvědčuje, že jsou generalisté.

6. Conclusions

The aims of this study were achieved and can be summarized as follows:

1. Most of the studied orchid species are sensitive to extremely low concentrations of nitrate. The strength of the inhibitory effect on germination correlates with the habitat nutrient level, the Ellenberg indicator values and the nitrate concentration at the site from which the seeds of studied plants have originated. Oligotrophic species are more sensitive to low nitrate concentrations than those growing on more eutrophic sites. It can be assumed that nitrate is at least partly responsible for the recent decline of some orchid species in the wild.
2. The sensitivity of orchids to nitrate may depend on the identity of the symbiotic fungus. At least one *Ceratobasidium* fungal isolate may allow germination at otherwise inhibitory concentrations.
3. In mixotrophic orchids of the Neottiineae tribe, underground parts mainly rely on carbon supplied by fungal symbionts as the plant photosynthates transfer to belowground organs is minimal. They are instead used for the growth and development of the aboveground parts, including seed production.
4. Albino variants of mixotrophic plants have very low fitness. The reason for this, at least in orchids, may lie in the aforementioned differences in nutrient acquisition between above- and belowground organs. Since the aboveground parts of green mixotrophic orchids rely on photosynthates for their growth, their albino variants suffer from insufficient nutrition.
5. The gradual reduction of leaves in mixotrophic species together with specialisation towards fungi which are more efficient in carbon supply to the plant is a more likely evolutionary pathway from mixotrophy to mycoheterotrophy than a sudden loss of photosynthesis, as observed in albino plants.
6. The stable isotope content does not reflect changes in the fungal community in the orchid root. The previous findings that the high ¹⁵N content is due to a high proportion of ascomycete fungi (Ascomycota), especially *Tuber sp.*, was not confirmed. Within the genus *Epipactis*, mixotrophic species that engage in broad interactions with mycorrhizal fungi unlike autotrophic or mycoheterotrophic, can be considered true generalist.

7. Literatura

- Abadie JC, Püttsepp Ü, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse MA. 2006.** *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: A comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Canadian Journal of Botany* **84**: 1462–1477.
- Ackerman J. 1986.** Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* **1**: 108–113.
- Alvarez JM, Vidal EA, Gutiérrez RA. 2012.** Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 185–191.
- Antonopoulos Z, Tsiftsis S. 2017.** *ATLAS of the Greek Orchids, Vol I*. Mediterraneo Editions.
- Arditti J. 1967.** Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. *The Botanical Review* **33**: 1–97.
- Arditti J, Ghani A. 2000.** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* **145**: 367–421.
- Barsberg ST, Lee Y-I, Rasmussen HN. 2018.** Development of C-lignin with G/S-lignin and lipids in orchid seed coats – an unexpected diversity exposed by ATR-FT-IR spectroscopy. *Seed Science Research*: 1–11.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett M, Sivasithamparam K. 2001.** Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytologist* **152**: 511–520.
- Beyrle H, Penningsfeld F, Hockf B. 1991.** The role of nitrogen concentration in determining the outcome of the interaction between *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó and *Rhizoctonia* sp. *New Phytologist* **117**: 665–672.
- Beyrle HF, Smith SE, Franco CMM, Peterson RL. 1995.** Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. *Canadian Journal of Botany* **73**: 1128–1140.
- Bidartondo MI, Bruns TD. 2001.** Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): Widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* **10**: 2285–2295.
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ. 2004.** Changing partners in the dark: Isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **271**: 1799–1806.
- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, et al. 2002.** Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **419**: 389–392.
- De Boer HJ, Ghorbani A, Manzanilla V, et al. 2017.** DNA metabarcoding of orchid-derived products reveals widespread illegal orchid trade. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**.
- Bolin JF, Tennakoon KU, Majid MBA, Cameron DD. 2017.** Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in *Burmannia coelestis* (Burmanniaceae). *Plant Species Biology* **32**: 74–80.
- Bowles M, Zettler L, Bell T, Kelsey P. 2005.** Relationships between Soil Characteristics, Distribution and Restoration Potential of the Federal Threatened Eastern Prairie Fringed

- Orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindl. *The American Midland Naturalist* **154**: 273–285.
- Bowman WD, Cleveland CC, Halada Ĺ, Hreško J, Baron JS. 2008.** Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. *Nature Geoscience* **1**: 767–770.
- Březina S, Jandová K, Pecháčková S, et al. 2019.** Nutrient patches are transient and unpredictable in an unproductive mountain grassland. *Plant Ecology* **220**: 111–123.
- Brundrett MC. 2009.** Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* **320**: 37–77.
- Bruns TD, Bidartondo MI, Taylor DL. 2002.** Host specificity in ectomycorrhizal communities: What do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* **42**: 352–359.
- Bulpitt CJ, Li Y, Bulpitt PF, Wang J. 2007.** The use of orchids in Chinese medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine* **100**: 558–563.
- Callesen I, Raulund-Rasmussen K, Gundersen P, Stryhn H. 1999.** Nitrate concentrations in soil solutions below Danish forests. *Forest Ecology and Management* **114**: 71–82.
- Cameron DD. 2009.** The chlorophyll-containing orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through photosynthesis. *New Phytologist* **183**: 358–364.
- Cameron DD, Bolin JF. 2010.** Isotopic evidence of partial mycoheterotrophy in the gentianaceae: *Bartonia virginica* and *Obolaria virginica* as case studies. *American Journal of Botany* **97**: 1272–1277.
- Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR. 2008.** Giving and receiving: Measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* **180**: 176–184.
- Ceulemans T, Van Geel M, Jacquemyn H, et al. 2019.** Arbuscular mycorrhizal fungi in European grasslands under nutrient pollution. *Global Ecology and Biogeography* **28**: 1796–1805.
- Chen L, Wang YC, Qin LY, et al. 2019.** Dynamics of fungal communities during *Gastrodia elata* growth. *BMC Microbiology* **19**: 1–11.
- Corrales A, Henkel TW, Smith ME. 2018.** Ectomycorrhizal associations in the tropics – biogeography, diversity patterns and ecosystem roles. *New Phytologist* **220**: 1076–1091.
- Courty PE, Walder F, Boller T, et al. 2011.** Carbon and nitrogen metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: A stable isotope analysis. *Plant Physiology* **156**: 952–961.
- Dafni A, Ivri Y, Brantjes BM. 1981.** Pollination of *Serapias vomeracea* Briq. (Orchidaceae) by Imitation of Holes for Sleeping Solitary Male Bees (Hymenoptera). *Acta Botanica Neerlandica* **30**: 69–73.
- Dearnaley J. 2006.** The fungal endophytes of *Erythrorchis cassythoides* - is this orchid saprophytic or parasitic? *Australasian Mycologist* **25**: 51–57.
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, et al. 2011.** From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1349–1359.

- Delforge P. 2006.** *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East, 3rd edition.* London: A&C Black Publishers Ltd.,.
- Diez JM. 2007.** Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology* **95**: 159–170.
- Dijk E, Eck N. 1995a.** Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species. *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne de Botanique* **1**: 1203–1211.
- Dijk E, Eck N. 1995b.** Axenic in vitro nitrogen and phosphorus responses of some Dutch marsh orchids. *New Phytologist* **131**: 353–359.
- Dijk E, Olf H. 1994.** Effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on field performance of *Dactylorhiza majalis*. *Acta Botanica Neerlandica* **43**: 383–392.
- Djordjević V, Tsiftsis Spyros, Lakušić D, Jovanović S, Stevanović V. 2016a.** Factors affecting the distribution and abundance of orchids in grasslands and herbaceous wetlands. *Systematics and Biodiversity* **14**: 355–370.
- Djordjević V, Tsiftsis S., Lakušić D, Stevanović V. 2016b.** Niche analysis of orchids of serpentine and non-serpentine areas: Implications for conservation. *Plant Biosystems* **150**: 710–719.
- Dressler R. 1981.** *The orchids: Natural history and classification.* Cambridge: Harvard University Press.
- Ellenberg H, Weber HE, Duli R, Wirth V, Werner W, Paulissen D. 1991.** Zeigewerte von Pflanzen in Mitteleuropa. *Scripta Geobot.* **18**: 1–248.
- Engardt M, Simpson D, Schwikowski M, Granat L. 2017.** Deposition of sulphur and nitrogen in Europe 1900–2050. Model calculations and comparison to historical observations. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology* **69**: 1328945.
- Epstein E. 1994.** The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 11–17.
- Ercole E, Rodda M, Giralanda M, Perotto S. 2015.** Establishment of a Symbiotic in vitro System between a Green Meadow Orchid and a Rhizoctonia-like Fungus. *BIO-PROTOCOL* **5**: e1482.
- Eriksson O, Kainulainen K. 2011.** The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **13**: 73–87.
- Erisman JW, Galloway JN, Seitzinger S, et al. 2013.** Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**.
- Erisman JW, Galloway J, Seitzinger S, Bleeker A, Butterbach-Bahl K. 2011.** Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **3**: 281–290.
- Falkengren-Grerup U, Månsson KF, Olsson MO. 2000.** Uptake capacity of amino acids by ten grasses and forbs in relation to soil acidity and nitrogen availability. *Environmental and Experimental Botany* **44**: 207–219.
- Feth JH. 1966.** Nitrogen Compounds in Natural Water-a Review. *Water Resources Research*

2: 41–58.

Fetter JC, Brown RN, Görres JH, Lee C, Amador JA. 2012. Nitrate and phosphate leaching under turfgrass fertilized with a squid-based organic fertilizer. *Water, Air, and Soil Pollution* **223**: 1531–1541.

Figura T, Tylová E, Jersáková J, Vohník M, Ponert J. 2021. Fungal symbionts may modulate nitrate inhibitory effect on orchid seed germination. *Mycorrhiza* **31**: 231–241.

Finzi AC, Berthrong ST. 2005. The uptake of amino acids by microbes and trees in three cold-temperate forests. *Ecology* **86**: 3345–3353.

Fochi V, Chitarra W, Kohler A, et al. 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.

Fowler D, Steadman CE, Stevenson D, et al. 2015. Effects of global change during the 21st century on the nitrogen cycle. *Atmospheric Chemistry and Physics* **15**: 13849–13893.

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.

Van Geel M, Jacquemyn H, Peeters G, van Acker K, Honnay O, Ceulemans T. 2020. Diversity and community structure of ericoid mycorrhizal fungi in European bogs and heathlands across a gradient of nitrogen deposition. *New Phytologist* **228**: 1640–1651.

Girlanda M, Selosse MA, Cafasso D, et al. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* **15**: 491–504.

Gloser V, Košvancová M, Gloser J. 2007. Regrowth dynamics of *Calamagrostis epigejos* after defoliation as affected by nitrogen availability. *Biologia plantarum* **51**: 501–506.

Gomes SIF, Aguirre-Gutiérrez J, Bidartondo MI, Merckx VSFT. 2017. Arbuscular mycorrhizal interactions of mycoheterotrophic *Thismia* are more specialized than in autotrophic plants. *New Phytologist* **213**: 1418–1427.

Gonneau C, Jersáková J, de Tredern E, et al. 2014. Photosynthesis in perennial mixotrophic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *Journal of Ecology* **102**: 1183–1194.

Hadley BG, Ong SH. 1978. Nutritional requirements of orchid endophytes. *New Phytologist* **81**: 561–569.

Halbwachs H, Dentinger BTM, Detheridge AP, Karasch P, Griffith GW. 2013. Hyphae of waxcap fungi colonise plant roots. *Fungal Ecology* **6**: 487–492.

Hashimoto Y, Fukukawa S, Kunishi A, et al. 2012. Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytologist* **195**: 620–630.

van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.

Hejcman M, Klaudivová M, Schellberg J, Honsová D. 2007. The Rengen Grassland Experiment: Plant species composition after 64 years of fertilizer application. *Agriculture,*

Ecosystems and Environment **122**: 259–266.

Hejcman M, Schellberg J, Pavlů V. 2010. *Dactylorhiza maculata*, *Platanthera bifolia* and *Listera ovata* survive N application under P limitation. *Acta Oecologica* **36**: 684–688.

Hornemann G, Michalski SG, Durka W. 2012. Short-term fitness and long-term population trends in the orchid *Anacamptis morio*. *Plant Ecology* **213**: 1583–1595.

Hynson NA, Bruns TD. 2009. Evidence of a myco-heterotroph in the plant family Ericaceae that lacks mycorrhizal specificity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**: 4053–4059.

Hynson NA, Madsen TP, Selosse M-A, et al. 2013. The Physiological Ecology of Mycoheterotrophy In: Merckx VSFT, ed. *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. New York: Springer New York, 297–342.

Jacquemyn H, Brys R, Waud M, Evans A, Figura T, Selosse MA. 2021. Mycorrhizal Communities and Isotope Signatures in Two Partially Mycoheterotrophic Orchids. *Frontiers in Plant Science* **12**: 1–9.

Jacquemyn H, Merckx VSFT. 2019. Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants. *Journal of Ecology* **107**: 1567–1581.

Jacquemyn H, Waud M, Brys R, et al. 2017. Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids: An ecological continuum between auto- and mixotrophy. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–12.

Jacquemyn H, Waud M, Brys R. 2018. Mycorrhizal divergence and selection against immigrant seeds in forest and dune populations of the partially mycoheterotrophic *Pyrola rotundifolia*. *Molecular Ecology* **27**: 5228–5237.

Jacquemyn H, Waud M, Lievens B, Brys R. 2016a. Differences in mycorrhizal communities between *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and its presumed sister species *E. neerlandica*. *Annals of Botany* **118**: 105–114.

Jacquemyn H, Waud M, Merckx VSFT, et al. 2016b. Habitat-driven variation in mycorrhizal communities in the terrestrial orchid genus *Dactylorhiza*. *Scientific Reports* **6**: 1–9.

Jacquemyn H, Waud M, Merckx VSFT, 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.

Janssens IA, Dieleman W, Luysaert S, et al. 2010. Reduction of forest soil respiration in response to nitrogen deposition. *Nature Geoscience* **3**: 315–322.

Jeřábková K. 2006. Ecological demands and optimal management of *Pseudorchis albida*. Master thesis [in Czech].

Jersáková J, Johnson SD, Kindlmann P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **81**: 219–235.

Jersáková J, Malinová T. 2004. Tomorrow ' s plant communities : different , but how? *New Phytologist* **176**: 235–237.

Jersáková J, Malinová T, Jeřábková K, Dötterl S. 2011. Biological Flora of the British Isles: *Pseudorchis albida* (L.) Á. & D. Löve. *Journal of Ecology* **99**: 1282–1298.

- Johansson VA, Bahram M, Tedersoo L, Kõljalg U, Eriksson O. 2017.** Specificity of fungal associations of Pyroleae and *Monotropa hypopitys* during germination and seedling development. *Molecular Ecology* **26**: 2591–2604.
- Johansson VA, Eriksson O. 2013.** Recruitment limitation, germination of dust seeds, and early development of underground seedlings in six Pyroleae species. *Botany* **91**: 17–24.
- Johansson VA, Mikusinska A, Ekblad A, Eriksson O. 2015.** Partial mycoheterotrophy in Pyroleae: nitrogen and carbon stable isotope signatures during development from seedling to adult. *Oecologia* **177**: 203–211.
- Johansson VA, Müller G, Eriksson O. 2014.** Dust seed production and dispersal in Swedish Pyroleae species. *Nordic Journal of Botany* **32**.
- Johnson SD, Peter CI, Ågren J. 2004.** The effects of nectar addition on pollen removal and geitonogamy in the non-rewarding orchid *Anacamptis morio*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **271**: 803–809.
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, Berveiller D, Damesin C, Selosse MA. 2005.** Mixotrophy in orchids: Insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist* **166**: 639–653.
- Kabala C, Karczewska A, Galka B, Cuske M, Sowiński J. 2017.** Seasonal dynamics of nitrate and ammonium ion concentrations in soil solutions collected using MacroRhizon suction cups. *Environmental Monitoring and Assessment* **189**: 304.
- Kaiser DR, Reinert DJ, Reichert JM, Streck CA, Pellegrini A. 2010.** Nitrate and ammonium in soil solution in tobacco management systems. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* **34**: 379–387.
- Kennedy AH, Taylor DL, Watson LE. 2011.** Mycorrhizal specificity in the fully mycoheterotrophic *Hexalectris* Raf. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Molecular Ecology* **20**: 1303–1316.
- Knudsen JT, Olesen JM. 1993.** Buzz-Pollination and Patterns in Sexual Traits in North European Pyrolaceae. *American Journal of Botany* **80**: 900–913.
- Knudson L. 1922.** Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette* **73**: 1–25.
- Kong A, Cifuentes J, Estrada-Torres A, Guzmán-Dávalos L, Garibay-Orijel R, Buyck B. 2015.** Russulaceae Associated with Mycoheterotroph *Monotropa uniflora* (Ericaceae) in Tlaxcala, Mexico: A Phylogenetic Approach. *Cryptogamie, Mycologie* **36**: 479–512.
- Krehan M. 2009.** Nährstoff ansprüche Winterblattbildern der Orchideenarten in Mittel- und Südeuropa. *Berichteaus den Arbeitskreisen Heimische Orchideen* **26**: 88–97.
- Kreitler CW, Jones DC. 1975.** Natural Soil Nitrate: The Cause of the Nitrate Contamination of Ground Water in Runnels County, Texas. *Groundwater* **13**: 53–62.
- Kulichová J, Škaloud P, Neustupa J. 2014.** Molecular diversity of green corticolous microalgae from two sub-Mediterranean European localities. *European Journal of Phycology* **49**: 345–355.
- Lallemand F, Figura T, Damesin C, et al. 2019.** Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs. *New Phytologist*.
- Lallemand F, Gaudeul M, Lambourdière J, Matsuda Y, Hashimoto Y, Selosse MA. 2016.**

- The elusive predisposition to mycoheterotrophy in Ericaceae. *New Phytologist* **212**: 314–319.
- Lallemand F, Puttsepp Ü, Lang M, et al. 2017.** Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age. *Annals of Botany* **120**: 361–371.
- Lark RM, Milne AE, Addiscott TM, Goulding KWT, Webster CP, O’Flaherty S. 2004.** Scale- and location-dependent correlation of nitrous oxide emissions with soil properties: An analysis using wavelets. *European Journal of Soil Science* **55**: 611–627.
- Leake J. 1994.** The biology of myco-heterotrophic (‘saprophytic’) plants. *New Phytologist* **127**: 171–216.
- Lilleskov EA, Kuyper TW, Bidartondo MI, Hobbie EA. 2019.** Atmospheric nitrogen deposition impacts on the structure and function of forest mycorrhizal communities: A review. *Environmental Pollution* **246**: 148–162.
- Van Der Linde S, Suz LM, Orme CDL, et al. 2018.** Environment and host as large-scale controls of ectomycorrhizal fungi. *Nature* **558**: 243–248.
- Liu ZW, Jolles DD, Zhou J, Peng H, Milne RI. 2014.** Multiple origins of circumboreal taxa in *Pyrola* (Ericaceae), a group with a Tertiary relict distribution. *Annals of Botany* **114**: 1701–1709.
- Liu T, Li CM, Han YL, Chiang TY, Chiang YC, Sung HM. 2015.** Highly diversified fungi are associated with the achlorophyllous orchid *Gastrodia flavilabella*. *BMC Genomics* **16**: 1–13.
- Marschner H. 2011.** *Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants 3rd Edition*. Academic Press.
- Martos F, Dulormne M, Paillet T, et al. 2009.** Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. *New Phytologist* **184**: 668–681.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gauffichon L, Suzuki A. 2010.** Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**: 1141–1157.
- Matsuda Y, Shimizu S, Mori M, Ito S-I, Selosse M-AM. 2012.** Seasonal and environmental changes of mycorrhizal associations and heterotrophy levels in mixotrophic *Pyrola japonica* (Ericaceae) growing under different light environments. *American journal of botany* **99**: 1177–1188.
- Matsuda Y, Yamaguchi Y, Matsuo N, et al. 2020.** Communities of mycorrhizal fungi in different trophic types of Asiatic *Pyrola japonica* sensu lato (Ericaceae). *Journal of Plant Research*.
- Mattila E, Kuitunen MT. 2000.** Nutrient versus pollination limitation in *Platanthera bifolia* and *Dactylorhiza incarnata* (Orchidaceae). *Oikos* **89**: 360–366.
- May M, Jąkałski M, Novotná A, et al. 2020.** Three-year pot culture of *Epipactis helleborine* reveals autotrophic survival, without mycorrhizal networks, in a mixotrophic species. *Mycorrhiza* **30**: 51–61.
- McCormick MK, Lee Taylor D, Juhaszova K, Burnett RK, Whigham DF, O’Neill JP. 2012.** Limitations on orchid recruitment: Not a simple picture. *Molecular Ecology* **21**: 1511–1523.

- McCormick MK, Taylor DL, Whigham DF, Burnett RK. 2016.** Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi (H Jacquemyn, Ed.). *Journal of Ecology* **104**: 744–754.
- McKendrick SL, Leake JR, Bidartondo M, Read DJ. 2001.** Symbiotic germination and development of the myco-heterotroph *Monotropa hypopitys* in nature and its requirement for locally distributed *Tricholoma* spp. *New Phytologist* **154**: 233–247.
- Merckx VSFTFT. 2013.** Mycoheterotrophy: The biology of plants living on fungi In: *Mycoheterotrophy*. 1–356.
- Merckx V, Bidartondo MI. 2008.** Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 1029–1035.
- Merckx VSFT, Janssens SB, Hynson NA, Specht CD, Bruns TD, Smets EF. 2012.** Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* **21**: 1524–1532.
- Merckx V, Stöckel M, Fleischmann A, Bruns TD, Gebauer G. 2010.** 15N and 13C natural abundance of two mycoheterotrophic and a putative partially mycoheterotrophic species associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **188**: 590–596.
- Miller AJ, Cramer MD. 2005.** Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* **274**: 1–36.
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM. 2007.** Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2297–2306.
- Mujica MI, Cisternas M, Claro A, Simunovic M, Pérez F. 2021.** Nutrients and fungal identity affect the outcome of symbiotic germination in *Bipinnula fimbriata* (Orchidaceae). *Symbiosis* **83**: 91–101.
- Mujica MI, Saez N, Cisternas M, Manzano M, Armesto JJ, Pérez F. 2016.** Relationship between soil nutrients and mycorrhizal associations of two *Bipinnula* species (Orchidaceae) from central Chile. *Annals of botany* **118**: 149–58.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Nadarajan J, Wood S, Marks T, Seaton P, Pritchard H. 2011.** Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science* **23**: 204–212.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U. 2009.** Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* **182**: 31–48.
- Evropská komise. Nitrátová směrnice. Dostupné zde:** https://ec.europa.eu/environment/water/water-nitrates/index_en.html (Přístup 22.6.2021).
- Nurfadilah S, Swarts ND, Dixon KW, Lambers H, Merritt DJ. 2013.** Variation in nutrient-acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot. *Annals of Botany* **111**: 1233–1241.
- Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Yukawa T. 2009.** Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: The orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**: 761–767.

- Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Xu H, et al. 2018.** The giant mycoheterotrophic orchid *Erythrorchis altissima* is associated mainly with a divergent set of wood-decaying fungi. *Molecular Ecology* **27**: 1324–1337.
- Okayama M, Yamato M, Yagame T, Iwase K. 2012.** Mycorrhizal diversity and specificity in *Lecanorchis* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* **22**: 545–553.
- Paladino O, Massabò M, Gandoglia E. 2020.** Assessment of nitrate hazards in umbria region (Italy) using field datasets: Good agriculture practices and farms sustainability. *Sustainability (Switzerland)* **12**: 1–26.
- Peakall R. 1989.** The unique pollination of *Leporella fimbriata* (Orchidaceae): Pollination by pseudocopulating male ants (*Myrmecia urens*, Formicidae). *Plant Systematics and Evolution* **167**: 137–148.
- Pedersen A, Petersen BM, Eriksen J, Hansen S, Jensen LS. 2007.** A model simulation analysis of soil nitrate concentrations—Does soil organic matter pool structure or catch crop growth parameters matter most? *Ecological Modelling* **205**: 209–220.
- Petrou N, M. P, Giannakoulis M. 2011.** *Orchids of Greece*. Athens: Koan Publishing House.
- 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.
- Procházka F, Potůček O, Pačlová L. 1999.** *Chamorchis alpina* (L.) L. C. Rich Vstaváčik alpínský Vstaváček alpínský In: Čeřovský J, Feráková V, Holub J, Maglocký Š, Procházka F, eds. *Červená kniha ohrožených a vzácných druhov rastlín a živočíchov ČR a SR V: Vyššie rastliny*. Bratislava: Príroda, 456.
- Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rasmussen HN, Dixon KW, Jersa J. 2015.** Germination and seedling establishment in orchids : a complex of requirements. : 391–402.
- Rasmussen HN, Pedersen HÆ. 2012.** *Cypripedium calceolus* germination in situ: seed longevity, and dormancy breakage by long incubation and cold winters. *European Journal of Environmental Sciences* **1**: 69–70.
- Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, et al. 2013.** Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecological Monographs* **83**: 95–117.
- Roy M, Yagame T, Yamato M, et al. 2009.** Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* but not its asexual propagules. *Annals of Botany* **104**: 595–610.
- Sahagian D. 2000.** Global physical effects of anthropogenic hydrological alterations: Sea level and water redistribution. *Global and Planetary Change* **25**: 39–48.
- Schiebold JMI, Bidartondo MI, Karasch P, Gravendeel B, Gebauer G. 2017.** You are what you get from your fungi: Nitrogen stable isotope patterns in *Epipactis* species. *Annals of Botany* **119**: 1085–1095.
- Schmidt S, Raven JA, Paungfoo-Lonhienne C. 2013.** The mixotrophic nature of photosynthetic plants. *Functional Plant Biology* **40**: 425–438.

- Scott H, Carey P. 2002.** The effects of water application on seed germination and infection in *Gymnadenia conopsea* under field conditions. In: Kindlmann P, Whigham D, Willems J, eds. *Trends and fluctuations, and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations*. Leiden: Bakkhuys Publishers, 155–165.
- Selosse MA. 2014.** The latest news from biological interactions in orchids: In love, head to toe. *New Phytologist* **202**: 337–340.
- Selosse M, Bocayuva MF, Kasuya MCM, Courty P. 2016.** Mixotrophy in mycorrhizal plants : extracting carbon from mycorrhizal networks In: Martin F, ed. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. John Wiley and Sons, 451–471.
- Selosse MA, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004.** Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* **47**: 416–426.
- Selosse MA, Martos F. 2014.** Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* **19**: 683–685.
- Selosse MA, Rousset F. 2011.** The plant-fungal marketplace. *Science* **333**: 828–829.
- Selosse MA, Roy M. 2009.** Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* **14**: 64–70.
- Selosse M-A, Tesitel J, Těšitelová T, Minasiewicz J. 2018.** Trends in Plant Science Mixotrophy in land plants : why to stay green ? *Trends in Plant Science*.
- Selosse MA, Weiß M, Jany J-L, Tillier A. 2002.** Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* **11**: 1831–1844.
- Sgarbi E, Grimaudo M, Del Prete C. 2009.** In vitro asymbiotic germination and seedling development of *Limodorum abortivum* (Orchidaceae). *Plant Biosystems* **143**: 114–119.
- Shefferson RP, Bunch W, Cowden CC, et al. 2019.** Does evolutionary history determine specificity in broad ecological interactions? *Journal of Ecology* **107**: 1582–1593.
- Shefferson RP, Roy M, Püttsepp Ü, Selosse MA. 2016.** Demographic shifts related to mycoheterotrophy and their fitness impacts in two cephalanthera species. *Ecology* **97**: 1452–1462.
- Shefferson RP, Taylor DL, Weiß M, et al. 2007.** The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady’s slipper orchids. *Evolution* **61**: 1380–1390.
- Silvertown J, Wells D, Gillman M, Dodd M, Robertson H, Lakhani KH. 1994.** Short-term effects and long-term after-effects of fertilizer application on the flowering population of green-winged orchid *Orchis morio*. *Biological Conservation* **69**: 191–197.
- Singh P, Carew G. 1990.** Inland spruce cone rust of black spruce: Effect on cone and seed yield, and seed quality. *European journal of forest pathology* **20**: 397–404.
- Slaviero A, Del Vecchio S, Pierce S, Fantinato E, Buffa G. 2016.** Plant community attributes affect dry grassland orchid establishment. *Plant Ecology* **217**: 1533–1543.
- Smil V. 2001.** *Enriching the Earth: Fitz Haber, Carl Bosh, and the transformation of world food production*. The MIT Press.

- Smith SE, Read D. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Stewart S, Kauth P, Dutra Elliott D, Johnson T, Kane M, Vendrame W. 2008.** Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination In: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*.375–391.
- Suetsugu K, Kawakita A, Kato M. 2012.** Evidence for specificity to Glomus group Ab in two Asian mycoheterotrophic Burmannia species. *Plant Species Biology* **29**: 57–64.
- Suetsugu K, Matsubayashi J, Ogawa NO, Murata S, Sato R, Tomimatsu H. 2020.** Isotopic evidence of arbuscular mycorrhizal cheating in a grassland gentian species. *Oecologia* **192**: 929–937.
- Suetsugu K, Matsuoka S, Shutoh K, et al. 2021.** Mycorrhizal communities of two closely related species, *Pyrola subaphylla* and *P. japonica*, with contrasting degrees of mycoheterotrophy in a sympatric habitat. *Mycorrhiza* **31**: 219–229.
- Suetsugu K, Ohta T, Tayasu I. 2018.** Partial mycoheterotrophy in the leafless orchid *Cymbidium macrorhizon*. *American Journal of Botany* **105**: 1595–1600.
- Suetsugu K, Yamato M, Matsubayashi J, Tayasu I. 2019.** Comparative study of nutritional mode and mycorrhizal fungi in green and albino variants of *Goodyera velutina*, an orchid mainly utilizing saprotrophic rhizoctonia. *Molecular Ecology* **28**: 4290–4299.
- Suetsugu K, Yamato M, Miura C, et al. 2017.** Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. *Molecular Ecology* **26**: 1652–1669.
- Swartz ND, Dixon KW. 2009.** Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* **104**: 543–556.
- Swartz N, Dixon KW. 2017.** *Conservation methods for terrestrial orchids*. J. Ross Publishing.
- Swift S, Munroe S, Im C, Tipton L, Hynson NA. 2019.** Remote tropical island colonization does not preclude symbiotic specialists: New evidence of mycorrhizal specificity across the geographic distribution of the Hawaiian endemic orchid *Anoetochilus sandvicensis*. *Annals of Botany* **123**: 657–666.
- Taiz L, Ziegler E. 1998.** *Plant Physiology 3rd ed*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Taylor DL, Bruns TD. 1997.** Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 4510–4515.
- Taylor D, Bruns T, Leake J, Read D. 2002.** Mycorrhizal specificity and function in mycoheterotrophic plants. *Ecological Studies* **157**: 375–413.
- Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse MA. 2007.** Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: Ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* **151**: 206–217.
- Těšitel J, Těšitelová T, Minasiewicz J, Selosse MA. 2018.** Mixotrophy in Land Plants: Why To Stay Green? *Trends in Plant Science* **23**: 656–659.
- Thixton HL, Esselman EJ, Corey LL, Zettler LW. 2020.** Further evidence of Ceratobasidium D.P. Rogers (Basidiomycota) serving as the ubiquitous fungal associate of *Platanthera*

leucophaea (Orchidaceae) in the North American tallgrass prairie. *Botanical Studies* **61**.

Treat WJ, Engler CR, Soltes EJ. 1989. Culture of photomixotrophic soybean and pine in a modified fermentor using a novel impeller. *Biotechnology and Bioengineering* **34**: 1191–1202.

Tsiftsis S, Tsiripidis I, Papaioannou A. 2012. Ecology of the orchid *Goodyera repens* in its southern distribution limits. *Plant Biosystems* **146**: 857–866.

Turnbull LA, Crawley MJ, Rees M. 2000. Are plant populations seed-limited? A review of seed sowing experiments. *Oikos* **88**: 225–238.

Vignolini S, Davey MP, Bateman RM, et al. 2012. The mirror crack'd: Both pigment and structure contribute to the glossy blue appearance of the mirror orchid, *Ophrys speculum*. *New Phytologist* **196**: 1038–1047.

Vincenot L, Tedersoo L, Richard F, Horcine H, Kõljalg U, Selosse MA. 2008. Fungal associates of *Pyrola rotundifolia*, a mixotrophic Ericaceae, from two Estonian boreal forests. *Mycorrhiza* **19**: 15–25.

Vogt-Schilb H, Těšitelová T, Kotlínek M, Sucháček P, Kohout P, Jersáková J. 2020. Altered rhizoctonia assemblages in grasslands on ex-arable land support germination of mycorrhizal generalist, not specialist orchids. *New Phytologist* **227**: 1200–1212.

Votrubová O. 2010. *Anatomie rostlin*. Praha.

Van Waes JM, Debergh PC, Waes V. 1986. *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum* **67**: 253–261.

Wang HH, Wonkka CL, Treglia ML, Grant WE, Smeins FE, Rogers WE. 2015. Species distribution modelling for conservation of an endangered endemic orchid. *AoB PLANTS* **7**: 1–12.

Waterman RJ, Bidartondo MI, Stofberg J, et al. 2011. The Effects of Above- and Belowground Mutualisms on Orchid Speciation and Coexistence. *The American Naturalist* **177**: E54–E68.

Waterman RJ, Klooster MR, Hentrich H, Bidartondo MI. 2013. Species Interactions of Mycoheterotrophic Plants: Specialization and its Potential Consequences In: Merckx VSFT, ed. *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*. Springer, .

Waud M, Brys R, Van Landuyt W, Lievens B, Jacquemyn H. 2017. Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species. *Molecular ecology* **26**: 1687–1701.

Weil RR, Brady NC. 2016. *The nature and properties of soils*. Pearson Education.

Weiss M, Selosse MA, Rexer KH, Urban A, Oberwinkler F. 2004. Sebacinales: A hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research* **108**: 1003–1010.

Whigham DF, O'Neill JP, Rasmussen HN, Caldwell BA, McCormick MK. 2006. Seed longevity in terrestrial orchids - Potential for persistent in situ seed banks. *Biological Conservation* **129**: 24–30.

Xing X, Gao Y, Zhao Z, et al. 2020. Similarity in mycorrhizal communities associating with two widespread terrestrial orchids decays with distance. *Journal of Biogeography* **47**: 421–433.

- Yamato M, Yagame T, Iwase K. 2011a.** Arbuscular mycorrhizal fungi in roots of non-photosynthetic plants, *Sciaphila japonica* and *Sciaphila tosaensis* (Triuridaceae). *Mycoscience* **52**: 217–223.
- Yamato M, Yagame T, Shimomura N, et al. 2011b.** Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakuraii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza* **21**: 631–639.
- Yamazaki J, Miyoshi K. 2006.** In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany* **98**: 1197–1206.
- Yeung EC. 2017.** A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies* **58**: 1–14.
- Zajac M, Ujházy K, Škodová I, et al. 2016.** Classification of semi-natural mesic grasslands in the Ukrainian Carpathians. *Phytocoenologia* **46**: 257–293.
- Zhang H, Forde BG. 1998.** An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *279*: 407–409.
- Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen MF, Read DJ. 2007.** Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyroloids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist* **175**: 166–175.
- Zimmer K, Meyer C, Gebauer G. 2008.** The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco-heterotroph. *New Phytologist* **178**: 395–400.

8. Přílohy

Přílohy nejsou součástí elektronicky odevzdané verze práce, protože obsahují publikované články, na které se vážou práva třetích stran a tedy je nelze zveřejnit, aniž by došlo k rozporu s autorskými právy.

Přílohy jsou následující publikace:

1. Figura et al. 2019: Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content
2. Figura et al. 2021: Fungal symbionts may modulate nitrate inhibitory effect on orchid seed germination
3. Lallemand et al. 2019: Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs
4. Jacquemyn et al. 2021: Mycorrhizal Communities and Isotope Signatures in Two Partially Mycoheterotrophic Orchids
5. Matsuda et al. 2020: Communities of mycorrhizal fungi in different trophic types of Asiatic *Pyrola japonica sensu lato* (Ericaceae)