

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Anatomie a fyziologie rostlin



Ing. Mgr. Tomáš Figura Ph.D.

Výzkum raných fází ontogeneze podčeledi hruštičkových za použití nového protokolu umožňujícího jejich kultivaci v podmínkách *in vitro*

Study of young developmental stages of subfamily Pyroloideae using new protocol allowing their cultivation *in vitro*

Rigorózní práce

Praha, 2021





Předchozí strana: detail chocholíku *Chimaphila umbellata*

## 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 9.11.2021

Ing. Mgr. Tomáš Figura Ph.D.

## Pod'akovanie

Ďakujem za pomoc pri písaní hlavne Hopovi a Ive Jadrnej. Za pomoc s prekladmi nemeckých textov svojej mame Alene Figurovej. Ďakujem Edite Tylovej za neprekonateľne dokonalé obrázky, Marc-André Selosse za pomoc s písaním textu publikácie a Honzovi Šochovi za pomoc s experimentmi. Ďakujem aj Honzovi Konečnému za pomoc pri formálnej úprave práce.

## Abstrakt

Lesní polokeře podčeledi hruštičkové (Pyroloideae) jsou důležitým modelem studia mixotrofie – strategie, při které je využíván jak uhlík z fotosyntézy, tak z houbového symbionta. Kvůli jejich iniciální mykoheterotrofii je dlouho nebylo možné vyklíčit mimo přirozené prostředí, a to jak pro studium jejich fyziologie, k medicínským účelům nebo pro účely jejich ochrany. Za pomoci nově popsaného kultivačního postupu, kterým bylo dosaženo velmi vysokých klíčivostí, bylo možné prozkoumat klíčení a rané fáze ontogeneze hruštičkových. Silnou dormanci semen je nutné narušit oxidačním činidlem v kombinaci s kyselinou a semena vysévat na komplexní média obohacená o rozpustné sacharidy. Chladová stratifikace není nutná, ale důležitá je kultivace ve tmě. Pozorovali jsme několik konvergencí s orchidejemi, zejména tzv. prachová semena s malým embryem, které při klíčení rostou do nediferencovaných struktur funkčně podobných protokormům orchidejí, ze kterých vyrůstá jen jeden meristém. Na rozdíl od orchidejí je první meristém kořenový a až mnohem později, adventivně, vznikají meristémy prýtů. Jak neschopnost růstu mladých rostlin na kultivačním médiu bez přidaného sacharidu, tak zvýšené množství stabilního izotopu  $^{13}\text{C}$  v pletivech dospělých hruštiček rostoucích *in situ* v porovnání s okolními autotrofními rostlinami, naznačují, že klíčící a mladé rostliny hruštiček jsou mykoheterotrofní a dospělé rostliny mixotrofní. Rozdíly mezi kořeny, oddenky a listy *P. minor* ale nebyly významně odlišné.

Klíčová slova: Pyroloideae, Ericaceae, klíčení semen, kultivace *in vitro*, protokorm, orchideje, konvergentní evoluce, dormance semen, mixotrofie, iniciální mykoheterotrofie,  $^{13}\text{C}$

## Abstract

Forest subshrubs Pyroloideae are important models to study mixotrophy – a strategy where both carbon from photosynthesis and fungal one is used. Due to their initial mycoheterotrophy it was impossible to germinate these plants outside natural habitats neither for study of their physiology, medicinal purposes nor for their conservation. Thanks to our novel cultivation method which yields high germination percentages, it was possible to study germination and post-germination ontogenesis of Pyroloideae. It is necessary to break strong dormancy of seeds by bleach and acid and to sow seeds on complex media amended by soluble carbohydrates. Cold stratification turned out to be unnecessary while cultivation in dark was crucial. Many convergencies with orchids were observed, mainly that dust seeds with tiny embryo arrested at globular stage germinate into undifferentiated structures functionally similar to orchid protocorms, from which only one meristem emerges. On the contrary to orchids, the first meristem formed is the root meristem and much later, adventitious shoots appeared. Inability of young plants to grow in the absence of soluble carbohydrates and elevated amount of  $^{13}\text{C}$  stable isotope in tissues of adult plants growing in natural habitats compared to surrounding autotrophic controls suggests, that germinating Pyroloid plants are mycoheterotrophic and adult plants are mixotrophic. Roots, rhizomes and leaves of *P. minor* were not significantly different in  $^{13}\text{C}$  content.

Keywords: Pyroloideae, Ericaceae, seed germination, *in vitro* culture, protocorm, orchids, convergent evolution, seed dormancy, mixotrophy, initial mycoheterotrophy,  $^{13}\text{C}$

# Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Kontinuum od autotrofie po mykoheterotrofii .....	1
1.2 Hruštičkové (Pyroloideae).....	2
1.3 Kultivace a ranné fáze ontogeneze hruštičkových .....	3
2. Cíle práce.....	6
3. Metodika.....	7
3.1 Sběr rostlinného materiálu pro analýzy obsahu stabilních izotopů .....	7
3.2 Efekt chladové stratifikace .....	7
3.3 Klíčení semen <i>in situ</i> .....	7
4. Výsledky.....	9
4.1 Efekt chladové stratifikace .....	9
4.2 Klíčení semen <i>ex vitro</i> .....	9
4.3 Obsah stabilních izotopů.....	9
5. Diskuze .....	11
6. Závěr.....	15
7. Literatura .....	16
8. Příloha .....	21



# 1. Úvod

## 1.1 Kontinuum od autotrofie po mykoheterotrofii

Většina rostlinných druhů (kolem 90 %) je mykorhizních a lze tedy říct, že nemykorhizní rostliny jsou v přírodě vzácnější (Smith *et al.* 2008; Cosme *et al.* 2018). Jedná se o komplexní vztah, obecně považovaný za mutualistický, kdy rostlina poskytuje houbě fotosyntáty a na oplátku houba poskytuje rostlině minerální látky a jejím 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 jsou zpravidla ruderalové, vodní rostliny nebo kulturní plodiny (zejména zástupci čeledi Brassicaceae a Chenopodiaceae) atp. (Cosme *et al.* 2018). Existují však i skupiny rostlin, které jsou na spojení s houbovým partnerem závislé a získávají uhlík od houby. Pokud získávají veškerý uhlík od hub po celý život, tak se označují jako mykoheterotrofní (Leake 1994). Tyto rostliny houbu „zneužívají“ - parazitují na ní. Mykoheterotrofie se nezávisle vyvinula u více čeledí (alespoň 40x) a nejčastěji se s tímto způsobem výživy setkáme v tropech (např. čeledi *Triuridaceae*, *Burmanniaceae*, *Petrosaviaceae* nebo některé *Orchidaceae*; Merckx 2013). Přestože mykoheterotrofie byla považována za velmi vzácný jev, bylo doposud popsáno přes 400 druhů mykoheterotrofních rostlin. V přírodě existují i různé mezistupně mezi autotrofními a obligátně mykoheterotrofními rostlinami. Typickým příkladem jsou orchideje (čeleď *Orchidaceae*; Gebauer *et al.* 2003) a hruštičkové rostliny (podčeleď *Pyroloideae*; Tedersoo *et al.* 2007; Zimmer *et al.* 2007), kde se setkáváme s tzv. mixotrofií (Selosse *et al.* 2009). Mixotrofní rostliny jsou obvykle celý život do určité míry závislé v přísunu uhlíku od houbového symbionta, zároveň jsou ale zelené a produkují fotosyntáty, jejichž část může houba dostávat. Například u orchidejí rodů *Cephalanthera*, *Cymbidium* a *Epipactis* bylo zjištěno, že fotosyntáty živí nadzemní části rostliny a mykorhiza podzemní (Roy *et al.* 2013; Gonneau *et al.* 2014; Suetsugu *et al.* 2018; Lallemand *et al.* 2019). Mixotrofní rostliny jsou sice na vlastním přežití na houbě do určité míry závislé, ale existuje kontinuum od autotrofie až po mykoheterotrofii (Selosse *et al.* 2009) a i mixotrofní rostlina (i když zjevně spíše taková, která je na houbě méně závislá) se může výjimečně za určitých lepších podmínek (např. světelných) stát na houbě nezávislou (May *et al.* 2020). Dnes víme, že mixotrofních druhů je výrazně více, než obligátně mykotrofních, ale přesný počet není známý (Merckx 2013).

Rostlina přitom nemusí být mykoheterotrofní celý život. Pro hruštičky, orchideje a podle recentních výzkumů i pro některé hořce (*Gentianaceae*, Yamato *et al.* 2021) je typická iniciální mykoheterotrofie. Je to závislost rostliny na přísunu uhlíku (a pravděpodobně i vody a dalších živin) z houby pouze v raných fázích ontogeneze, v období klíčení, a růstu mladé klíčící rostliny (Leake 1994; Merckx 2013; Lallemand *et al.* 2016). Závislost iniciálně mykoheterotrofních rostlin na houbovém uhlíku postupně klesá s transformací na dospělou rostlinu (Rasmussen *et al.* 2015).

Na základě doposud prozkoumaných skupin se zdá, že mykoheterotrofní, mixotrofní a iniciálně mykoheterotrofní rostliny obvykle sdílejí redukovanou stavbu semen – mají velmi malá tzv. prachová semena (z angl. dust seeds) a jejich embrya jsou nediferencovaná, obvykle bez endospermu nebo s redukováným endospermem. Osemení je mrtvé a může vytvářet i více vrstev osemení (Leake 1994; Selosse *et al.* 2016). Naopak typická autotrofní rostlina má v semeni základ radikuly i plumuly, děloh i endospermu (Votrubová 2010). Například orchideje mají ve zralých semenech embryogenezi zastavenou v globulárním stádiu vývoje embrya (Kull *et al.* 2002; Yeung 2017; Ziegler 1981).

Mykoheterotrofní, mixotrofní ale také iniciálně mykoheterotrofní rostliny se obecně těžce kultivují, a to komplikuje jejich výzkum. Vědomosti o tom, že přesazení mykoheterotrofních a mixotrofních rostlin z přírody je téměř nemožné, jsou známé již delší dobu (Sadovsky 1965) a i přes ojedinělé úspěchy (např. May *et al.* 2020) se jako nejvhodnější metoda umožňující výzkum těchto rostlin jeví kultivace *in vitro*. Zde funkci houby nahradíme komplexním kultivačním médiem s cukrem jako zdrojem uhlíku. Univerzální kultivační protokol *in vitro* pro všechny druhy orchidejí (ani pro ty co jsou v dospělosti autotrofní) ale neexistuje, protože se nároky jednotlivých druhů výrazně liší (Rasmussen 1995; Ponert *et al.* 2013). Orchideje jsou v současnosti jedinou kultivovatelnou skupinou iniciálně mykoheterotrofních rostlin. Je proto velmi žádoucí vytvořit kultivační protokol pro další mykoheterotrofní skupinu rostlin.

## 1.2 Hruštičkové (Pyroloideae)

Jak již bylo výše zmíněno, malé polokeře rostoucí zejména v chladných biotopech severní polokoule patřící do podčeledi hruštičkové (Pyroloideae) mají všechny zástupce iniciálně mykoheterotrofní. I když tato skupina rostlin zahrnuje jen kolem 40 druhů (orchidejí je kolem 27000; Takahashi 1993; Liu *et al.* 2010; Chase *et al.* 2015; APG IV 2016) můžeme v ní najít druhy, které jsou v dospělosti jak autotrofní, tak mixotrofní (Tedersoo *et al.* 2007; Lallemand *et al.* 2016, 2017), a existuje také jeden mykoheterotrofní nezelený druh (Hynson *et al.* 2009). Pestrost nutričních strategií mají tedy podobnou s orchidejemi. Analýzy nadzemních orgánů mixotrofních hruštičkových ukázaly, že se jedná o „statickou mixotrofii“, což znamená, že „míra“ závislosti na houbě se nemění s věkem ani světelnými podmínkami (Lallemand *et al.* 2017). Zmíněná práce Lallemand *et al.* (2017) ale nezkoumala podzemní orgány, a je tedy možné, že (podobně jako u mixotrofních orchidejí) bude právě tam vyšší podíl uhlíku přijatého od houby (Lallemand *et al.* 2019). Obsah uhlíku v podzemních orgánech by mohl fluktuovat v průběhu roku. S orchidejemi sdílí hruštičkové i extrémně malá tzv. prachová semena, iniciální mykoheterotrofii a preferenci extrémních stanovišť jako stinné lesy, horské louky apod. Tyto příklady naznačují konvergentní evoluci mezi hruštičkovými a orchidejemi (Tedersoo *et al.* 2007). Hruštičkové jsou v poslední době důležitým modelem pro studium mykoheterotrofie (Lallemand *et al.*

2017) a jejich využití v medicíně, zejména kvůli cytostatickým či antibiotickým vlastnostem, je v posledních letech věnována větší pozornost (Lee *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2013; Ma *et al.* 2014). Také mohou být významné pro tok uhlíku v ekosystémech. Hruštičkové jsou totiž stálezelené a v místech, kde se vyskytují ve velkých populacích (jako v boreálních lesích), mohou celoroční respirací odebrat velké množství uhlíku z okolních rostlinných a houbových symbiontů (Tedersoo *et al.* 2007). Velké porosty hruštičkových mohou také ovlivňovat fitness ostatních rostlin (Tedersoo *et al.* 2007). Také jsou hostitelem rzi *Chrysomya pirolata*, která snižuje klíčivost semen smrku (Singh *et al.* 1990). Zejména v boreálních lesích se tedy zdají být důležitým faktorem modelujícím celý biotop.

Hruštičkám příbuzné hniláky *Monotropae* jsou mykoheterotrofní (Wallace 1975) a vyskytují se v temperátních lesích severní polokoule (APG IV 2016). Taxonomicky patří do kládu Pterosporeae + Monotropae, který je sesterský k autotrofnímu Arbutoideae (Lallemand *et al.* 2016; Freudenstein *et al.* 2016) a oba dva jsou sesterské k hruštičkám (Lallemand *et al.* 2016; Freudenstein *et al.* 2016).

### 1.3 Kultivace a rané fáze ontogeneze hruštičkových

První pozorování semenáčů hruštičkových pocházejí již z 19. století. Autoři ale pozorovali jen větší větvičky se vyklíčené rostliny (Irmish 1855; Velenovský 1892, 1905; Fürth 1920). Krátce na to, začátkem 20. století se několik autorů pokusilo o kultivaci hruštičkových *in vitro* a to axenicky i symbioticky (Christoph 1921; Lück 1940, 1941; Lihnell 1942). Výsledky byly, jak již Lihnell (1942) poznamenal, „náhodné a nekonzistentní“, přesto již v té době vědci vypěstovali nejen několik milimetrů velké útvary (Christoph 1921) ale i větvičky se rostliny *P. rotundifolia* Lihnell (1942). Povedlo se vyklíčit i velmi malou rostlinu *Monotropa hypopitys* (Francke 1934). Tyto robustní práce obsahují množství zajímavých informací, nicméně kultivační média byla často založena na extraktech z brambor či kvasnic, nebo dokonce z humusu a půdy (Christoph 1921; Lück 1941; Lihnell 1942). Již z té doby je známo, že semena hruštičkových obsahují malé živé izodiametrické embryo obklopené mrtvým osemením (Fürth 1920; Christoph 1921; Lück 1941; Pyykkö 1968). Embryo je obklopeno tenkou vrstvou endospermu (Hofmeister 1858; Fürth 1920; Christoph 1921; Pyykkö 1968) a jako zásobní látky jsou zde přítomny lipidy a proteiny (Fürth 1920; Christoph 1921; Lück 1940). Podobnou stavbu semen má příbuzný mykoheterotrofní hnilák (*Hypopitys monotropa*). Hnilák má menší semena s menším počtem buněk (Goebel 1887; Olson 1993). Podobná jsou také semena ostatních mykotrofních rostlin, ale například orchidejím chybí endosperm (Arditti *et al.* Ghani 2000). Z embrya hruštičkových roste polárně „šiškovitá struktura“ s velkými epidermálními buňkami, která se nápadně podobá kořenu (Christoph 1921). Růst této struktury vede k protržení osemení. Z „šiškovité struktury“ posléze vzniká „rohlikovitý útvar“, kterému se prodlužují centrální buňky. V tomto stádiu se růst většinou zastavil (Lück 1941; Lihnell 1942). Výjimečně růst pokračoval dále, do tzv. „udicového útvaru“, kde se začala

formovat vodivá pletiva a kořenová čepička (Lihnell 1942). Semenáče pak tmavly, asi kvůli tvorbě taninů (Holm 1898; Christoph 1921; Lück 1940; Lihnell 1942). Lihnell (1942) u starších semenáčů pozoroval typickou strukturu kořenů a po vystavení světlu nepozoroval produkci chlorofylu. Nikomu se nepovedlo dopěstovat zelené rostliny ani rostlinu tvořící prýt. Klíčení obvykle nastalo až po 4-8 měsících po výsevu (Lück 1940, 1941; Lihnell 1942) a velkým problémem bylo zastavování růstu v „rohlíkovitém stádiu“ (Lück 1940; Lihnell 1942). Další problém byl v té době například udržet kultury dostatečně vlhké (Lihnell 1942). Otázkou také zůstává, jestli tyto experimenty byly opravdu axenické, protože například Christoph (1921) popisuje že příčinou neúspěchu byli červi a při použití humusového nebo půdního extraktu (Christoph 1921; Lück 1941; Lihnell 1942) je možnost kontaminace velmi vysoká. U symbiotických kultur, je naopak možné, že k navázání mykorrhizy nedošlo (chybí obrázky mykorrhizy), což potvrzuje i poznámka Lihnella (1942), že „houba rostla daleko od semenáče“. Přesto je z těchto prací možno čerpat množství informací. Například Christoph (1921) pozoroval nesmáčenlivost semen, a i když tomu nepřikládal důležitost, později Lihnell (1942) pozoroval nejlepší klíčivost po ošetření chlornanem vápenatým. Tato pozorování naznačují existenci fyzikální dormance semen v podobě nepropustného osemení. Lihnell (1942) a Lück (1941) navrhli, že „ve vodě rozpustné látky“ mají inhibiční efekt na klíčení a Harley (1959) navrhnul, že takovéto látky můžou být odstraněny louhováním ve vodě. U orchidejí je častá silná dormance semen, která může být narušena působením oxidačního činidla (např. chlornan vápenatý) a u některých druhů ještě v kombinaci s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Rasmussen 1995; Ponert *et al.* 2011). Je pravděpodobné, že podobná dormance semen může být přítomná i u hruštičkových. Vzhledem k mnoha podobnostem mezi hruštičkovými a orchidejemi by bylo zajímavé vyzkoušet kultivační postupy používané dnes u orchidejí ke kultivaci hruštiček.

Před prvními pokusy o *in vitro* kultivaci hruštičkových se několik výzkumníků pokusilo vykopat mladé semenáče v přírodě (Irmish 1855; Velenovský 1892, 1905; Fürth 1920). I když se jim nepodařilo najít nejmenší vývojová stádia, vykopali starší útvary – kořenům podobné struktury, které ještě neměly prýt (tyto útvary jsou velmi dobře zobrazeny na kresbách v pracích těchto autorů). Nebylo jasné, jestli se jedná o pravý kořen, nebo jaká struktura přesně klíčí ze semene. Dodnes tato otázka nebyla zodpovězena. Velenovský (1892, 1905) tvrdil, že to „není kořen ani stonek“ a strukturu nazval „prokaulom“. Christoph (1921) nazval tuto strukturu kořen, což potvrdili jak Lihnell (1942), tak i Copeland (1947) po pozorování diarchních (nebo triarchních) cévních svazků a endodermis. Lihnell (1942) také pozoroval větvení z pericyklu a velké izodiametrické buňky epidermis. Může se tedy zdát, že se identita těchto útvarů byla vyřešena a jedná se o kořen. Ale i recentní práce tíží nejistota. Ruský autor Bobrov (Bobrov 2004, 2009, 2014) navrhuje pro tyto útvary termín protozoma a nenazývá je kořeny. Díky tzv. „rámečkové metodě“ (Rasmussen et Whigham 1993), která umožňuje zakopat semena na lokalitu v nylonové síťce, se povedlo najít mnohem mladší semenáče. Práce (Hashimoto *et al.* 2012; Johansson *et al.* 2013; Johansson *et al.* 2017) tyto mladé semenáče nazývají „root-like structures“. Zdá se, že tyto „root-like structures“ mohou žít mykoheterotrofně v půdě i roky. Považuji za vhodné

zmínit, že i když diarámečková metoda studia klíčení *in situ* se rozšířila až po publikaci Rasmussenové a Whigham (1993), již v roce 1940 Renate Lück zakopávala semena hruštiček velice podobným způsobem: do 6-10 cm hloubky v sáčku z obvazu - „Beutel aus Müllergase“. Dosáhla vysokých klíčivostí s mnoha druhy a jak bylo již zmíněno výše nejenom *in situ* ale i *in vitro*.

Z výše uvedených důvodů je další výzkum hruštičkových velmi důležitý. Kultivace hruštičkových ze semen do dospělosti pro výzkumné, záchranné nebo medicínské využití není možná a orchideje tak zůstávají jedinou kultivovatelnou skupinou iníciačně mykoheterotrofních rostlin. Cíle práce jsou uvedeny v následující kapitole.

## 2. Cíle práce

- (1) najít optimální kultivační protokol pro hruštičkově, kterým bude možné dopěstovat dospělé zelené rostliny
- (2) popsat ranné fáze ontogeneze těchto rostlin a porovnat je s ontogenezí dobře prozkoumaných orchidejí
- (3) zjistit pomocí analýzy obsahu stabilních izotopů  $^{13}\text{C}$  jestli podzemní orgány hruštičkových nejsou obohaceny izotopy  $^{13}\text{C}$  víc než nadzemní části podobně jako u orchidejí

### 3. Metodika

Metodika je popsána v článku Figura *et al.* (2019), který je dostupný v příloze. Popisována je jen metodická část nad rámec tohoto článku.

#### 3.1 Sběr rostlinného materiálu pro analýzy obsahu stabilních izotopů

Rostliny druhu *P. minor* byly sbírány koncem prosince 2018 na lokalitě u obce Ludkovice-stará pískovna (GPS, WGS84: 49°8'33.337"s.š., 17°43'54.874"v.d.). Jako kontrolní druhy byly použity kolem rostoucí rostliny. Omyté kořeny, listy a oddenky byly separátně vloženy do čajových filtrů (Drogerie Markt, velikost 3, Německo) a sušeny při teplotě 45°C. Vzorky byly drceny kulovým mlýnkem s dvěma nerezovými kuličkami (Thermo Fisher) v 2 ml mikrozkuvkách (Eppendorf Safe-lock) a dále skladovány v silikagelu.

Vzorky byly analyzovány na obsah stabilních izotopů <sup>13</sup>C podle Lallemand *et al.* (2017). Přibližně 1.5 mg bylo naváženo do hliníkových nádobek a ty byly sbaleny tak, aby obsah nevypadnul. Tyto byly spáleny a plyn analyzován spektrofotometrem (NA 1500; Carlo Erba) s analýzou poměru izotopů oproti standardu (Delta S; Finnigan). Relativní obsah stabilních izotopů je označován jako δ hodnoty.

Relativní obsah δ <sup>13</sup> C byl počítán následovně = (R vzorek /R standard – 1) x 1000 (‰), kde R vzorek a R standard jsou poměry těžkého k lehkému izotopu vzorku a standardu - Vienna Pee Dee Belemnite (VPDP). Izotopové poměry byly kalibrovány pomocí interního standardu - alaninu (průměrné hodnoty dvou měření δ <sup>13</sup> C=-21.73 a -21.80).

#### 3.2 Efekt chladové stratifikace

Vyšetá semena byla umístěna nejprve po dobu 90 dní do 4°C, následně do 20°C a tmy. Kontrola byla po výsevu umístěna přímo do 20°C a tmy. Klíčivost byla počítána po 30, 60 a 90 dnech od umístění do 20°C.

#### 3.3 Klíčení semen *in situ*

Pro porovnání anatomického vývoje semenáčů v přírodě bylo na lokalitě *P. minor* nedaleko Vápenek u Javorníku nad Veličkou (GPS, WGS84: 49°8'33.337"s.š., 17°43'54.874"v.d.) zakopáno do

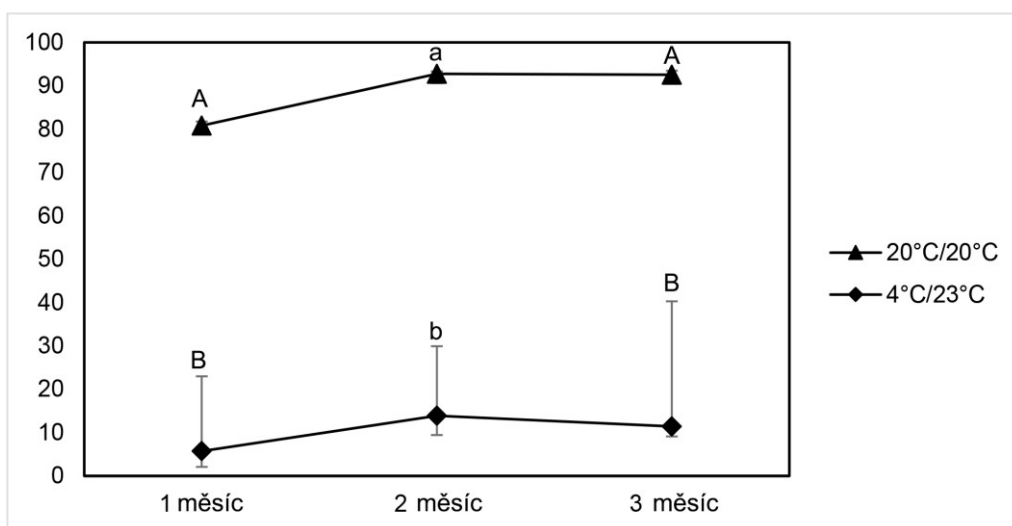
povrchových vrstev půdy několik (n=35) diarámečků naplněných zralými semeny dle Rasmussen a Whigham (1993). V každém z balíčku bylo umístěno 100-300 semen. Diarámečky byly sbírány postupně 6-24 měsíců po zakopání.

## 4. Výsledky

Výsledky jsou popsány v článku Figura *et al.* (2019), který je dostupný v příloze. Popisovány jsou jen výsledky nad rámec tohoto článku.

### 4.1 Efekt chladové stratifikace

Rostliny *P. minor* klíčily lépe bez periody chladové stratifikace ( $91,86\% \pm 2,2$  vs  $26,7 \pm 29,6\%$ ; aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka) a rozdíl byl signifikantní ( $\chi^2_{(1)} = 8,0769$ ,  $p = 0,0045$ ; obr. 1).



Obrázek 1: Efekt chladové stratifikace na klíčivost *P. minor* (v %), měřeno po 1, 2 resp. 3 měsících kultivace v 20°C. Zobrazeny jsou mediánové hodnoty s prvním a třetím kvantilem. Písmena označují výsledky párového testu.

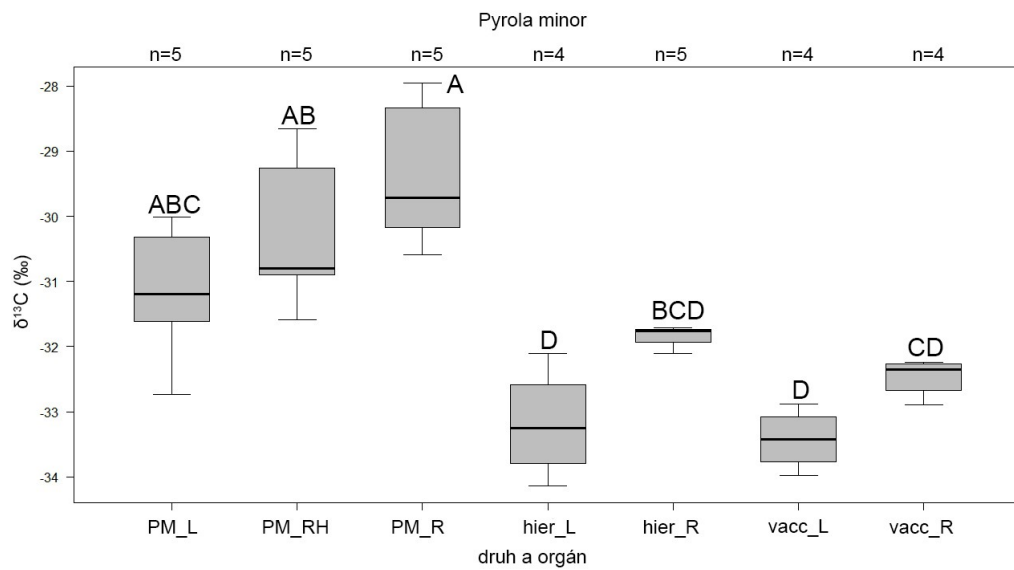
### 4.2 Klíčení semen *ex vitro*

Žádná semena v diarámečcích nevyklíčila.

### 4.3 Obsah stabilních izotopů

Všechna pletiva *P. minor* (listy, kořeny i oddenky) byla obohacena izotopy  $^{13}\text{C}$  více než kontrolní rostliny. Kořeny *P. minor* byly signifikantně více obohaceny než jakýkoli orgán kontrolních rostlin

( $F_{[6,23]}=12.37$ ;  $p=3.26 \times 10^{-5}$ ; obr. 2). Kořeny byly obohaceny isotopy  $^{13}\text{C}$  u všech rostlin více než listy, ale rozdíl nebyl nikdy signifikantní. Signifikantní nebyl ani rozdíl mezi obsahem isotopů  $^{13}\text{C}$  mezi kořeny kontrolních rostlin a listy *P. minor* (obr. 2).



Obrázek 2: Obsah stabilních isotopů  $^{13}\text{C}$  v: listech (L), kořenech (R) a oddencích (RH) u *Pyrola minor* (PM), *Hieracium murorum* (hier) a *Vaccinium myrtillus* (vacc). Znázorněny jsou mediánové hodnoty. Písmena značí výsledky párových testů TukeyC. Počet opakování je uveden nad grafem.

## 5. Diskuze

V článku popsaný protokol je modifikací protokolů používaných pro kultivaci obtížně kultivovatelných druhů terestrických orchidejí. Modifikace spočívá zejména ve větší intenzitě desinfekce semen  $H_2SO_4$  a  $Ca(OCl)_2$ . Důležité je také použití média s komplexním složením – např. BM-1, a kultivace klíčících stádií ve tmě. Naopak není nutná chladová stratifikace klíčících rostlin. Silná desinfekce semen je nutná u některých druhů orchidejí, stejně tak jako použití komplexních médií (např. Rasmussen 1995; Ponert *et al.* 2013). Terestrické orchideje dále obvykle vyžadují pro klíčení absenci světla, což brání vyklíčení na povrchu, kde nejsou přítomny mykorhizní houby (Arditti 1967, 2008; Rasmussen 1995) a ty druhy, jejichž semena dozrávají na podzim, obvykle vyžadují periodu chladové stratifikace na to, aby vyklíčily (Rasmussen 1992). U hruštičkových bylo překvapivě zjištěno, že chladová stratifikace není nutná (na lokalitách, ze kterých pocházela semena, dozrávají koncem srpna až v září – tedy před příchodem zimy). Klíčení semen proběhlo i na světle, jen s neprůkazně nižšími klíčivostmi než ve tmě, ale další růst nepokračoval. Semenačce zůstaly malé, dosahující několika milimetrů a byly červeně zbarvené.

Dormance semen u orchidejí je často velkou překážkou úspěšné kultivace (Ponert *et al.* 2013) a musí být narušena. To se nejčastěji provádí oxidačním činidlem jako je  $Ca(OCl)_2$  nebo  $Na(OCl)_2$  a u některých druhů se silnější dormanci se navíc využívá další ošetření  $H_2SO_4$ . U kládu Pyrola+Orthilia (Lallemand *et al.* 2016; Freudenstein *et al.* 2016) se nám povedlo dosáhnout klíčivosti až 100 % ale u kládu Moneses+Chimaphilla (Lallemand *et al.* 2016; Freudenstein *et al.* 2016) mnohem nižších, konkrétně kolem 4 % u *Chimaphilla umbelata* a 30 % u *Moneses uniflora* (semena všech druhů kromě *Chimaphilla umbellata* nebyla starší 6-ti měsíců). Pravděpodobnou příčinou neúspěchu je jiný, silnější mechanismus dormance, který ještě musí být objeven. Určitou roli ale zjevně hraje i stáří semen. Semena *Chimaphilla umbellata*, která jsme obdrželi z Botanické zahrady v Montréalu byla starší (vysévány 1,5 roku po sběru) a vykazovala nejnížší klíčivosti (kolem 4 % podobně jako *Hypopitys monotropa*). Později odebraná semena z Polska (Godawica, Malopolskie), která jsem vysel ihned (dny) po sběru, dosahovala i více než třínásobné klíčivosti (kolem 15%; nepublikovaná data) a jejich klíčivost se po dobu roku snižovala (i když pomaleji pokud byla skladována v chladu). I když se pořád jedná o nejnížší klíčivost z pěti testovaných druhů Pyroloideae, jednalo se o výrazně lepší výsledek. Podobně reagovala semena *P. minor*, *O. secunda* i *M. uniflora* používaná pro experimenty uvedené v publikaci. Starší semena klíčila vždy hůř. Příliš stará semena mohla být také příčinou nezdaru výsevu *in situ*, kde byla použita více než rok stará semena a byla dosažena nulová klíčivost. Z uvedeného vyplývá, že je u hruštičkových nevhodnější pracovat s čerstvými semeny. Pokud byla skladována v nízkých teplotách, měla by být použita maximálně jeden rok stará semena.

Hruštičkové mají podobně jako orchideje malá prachová semena s nediferencovaným embryem, které je obklopeno mrtvým osemením. U hruštičkových je embryo kromě toho obehnáno buněčným endospermem. Ve zralých semenech hruštičkových jsme pozorovali zásobní lipidy a proteiny, podobně jako předchozí studie (Fürth 1920; Christoph 1921; Lück 1940). Zároveň jsme v naší studii nepozorovali škrob v semenech. Podobně je tomu u orchidejí, kde dospělá semena obsahují lipidy a proteiny (Harrison 1977; Manning *et al.* 1987; Rasmussen 1990; Richardson *et al.* 1992; Yam *et al.* 2002; Li *et al.* 2016) a jen výjimečně u některých druhů škrob (Tian *et al.* 1985; Guo *et al.* 1990; Yeung *et al.* 1992). Během klíčení hruštičkových jsme pozorovali, že zásobní lipidy a proteiny byly využívány a v semenáčích se začal ukládat škrob. Stejná změna zásobních látek byl pozorována již dříve (Christoph 1921; Lück 1940; Lihnell 1942) a to dokonce nejen u hruštičkových ale také u orchidejí (Manning *et al.* 1987; Rasmussen 1990; Richardson *et al.* 1992). Mohlo by se tedy jednat o konvergentní evoluci u těchto dvou iniciálně mykoheterotrofních skupin.

Brzy po vyklíčení bylo zjevné, že po krátké „mezifázi“, kterou jsme pracovníčně nazvali jako přechodná zóna, se z ní vyvíjí kořen s typickou anatomickou strukturou kořene (kořenová čepička, radiální cévní svazky s exarchním xylémem s protoxylémem). Přechodnou zónu jsme pak navrhli nazývat termínem protokorm. Tento termín vyvolává v dnešní době odborné diskuze a zdá se, že existují různé názory na to, co tato struktura opravdu je. Termín protokorm (protocorme) byl poprvé použit Treubem (1890) pro klíčící gametofyt plavuní. Tento termín byl později převzat Noëlem Bernardem pro klíčící orchideje (1909). Protokorm orchidejí Bernard objevil náhodou, když v lese při Fontainebleau (nedaleko Paříže) našel nejspíš loňské zlomené soukvětí druhu *Neottia nidus-avis* zabořené do země (Bernard 1899). Jak již popisuje Treub a později Bernard, protokorm je útvar který předchází mladé rostlině s pravým tělem (Yeung 2017), což vyplývá i z názvu - z řeckého *protos*, *proti* začáteční, první, základní a *kormós*, což znamená „kmen stromu“ (tento termín se používá pro pojmenování těla cévnatých rostlin). Právě - „typické“ rostlinné tělo se ani přímo ze semene v tomto případě formovat nemůže, jelikož embryogeneze je v semeni u orchidejí a hruštiček pozastavena v globulárním stádiu a embryo nemá vyvinutou ani radikulu ani plumulu. Termín protokorm byl později použit i pro *Rafflesiaceae* (Nikolov *et al.* 2014; Nikolov *et al.* 2017) a již před více než 50 lety jej Harley (1959) navrhnul použít také pro *Franckem* pozorované semenáče hniláku (Francke 1934). Termín protokorm tedy není rezervován zdaleka jen pro orchideje. Jedná se o strukturu předcházející pravému rostlinnému tělu. I když pro blízce příbuzný hnilák (Lallemand *et al.* 2016; Freudenstein *et al.* 2016) bylo již dříve navrženo používat termín protokorm (Harley 1959), pro hruštičkovité termín protokorm použitý nebyl. Velenovský (1892, 1905) navrhoval pro rané fáze klíčících hruštiček termín „prokaulom“ a ani později nebylo zjevně zřejmé, jaký útvar vzniká po vyklíčení a zda-li se jedná o kořen nebo něco jiného. Nejspíš proto nazývali klíčící struktury hruštičkových různí autoři jako kořenům podobné struktury (z angl. root-like structures; Hashimoto *et al.* 2012; Johansson *et al.* 2013) nebo dokonce protozoma (Bobrov 2004, 2009, 2014). Na druhou stranu již Imhof a Sainge (2008) psali, že Velenovského prokaulom je

jen jiné pojmenování pro podobnou ne-li stejnou strukturu jakou je protokorm. Vzhledem k výše uvedenému se zdá, že termín protokorm je vhodný pro pojmenování „přechodné zóny“ u hruštiček, ze které vyrůstá první kořen, protože je funkčně podobná protokormům jiných rostlin. Vzniklé kořeny potom dlouho rostou, větví se a až za dlouhou dobu vyrůstá prýt. V podmínkách *in vitro* trvá vznik kořenu z protokormu dny až týdny a vznik prvního prýtu trvá řádově měsíce. V přírodě žije protokorm a mladá klíčící rostlinka bez prýtu mykoheterotrofně zjevně déle, a to až měsíce a možná i roky (Lihnell 1942; Hynson *et al.* 2013; Johansson *et al.* 2017). Prýtů může z jediného semene (a tedy jediného jedince) vzniknout hned několik.

Náš protokol umožňuje úspěšnou kultivaci od semen až po zelené rostliny, které je možné přesadit do podmínek *ex vitro* (viz obr. 3) a díky tomu zkoumat jejich fyziologii, využití v medicíně či dopěstovat rostliny pro záchranné účely. Autoři zkoumající hruštičkové v minulosti uspěli jen částečně s klíčením semen, výjimečně dosáhli větvicích se semenáčů (Christoph 1921; Lück 1940, 1941; Lihnell 1942). Nikdy nedosáhli zelených rostlin nebo dokonce přesazení *ex vitro*. Nejbliže se k větvicím se semenáčům dostal Lihnell (1942) a po dobu téměř 80-ti let se kultivací hruštiček nikdo nezabýval. Nám se povedlo dopěstovat zelené rostliny všech testovaných druhů, a v případě *Orthilia secunda* a *Pyrola minor* se nám povedl i převod *ex vitro*. Mladé rostliny *Orthilia secunda* sice po 4-6 měsících kultivace v květináči odumřely (n=10) kvůli napadení smutnicemi, ale jedna rostlina *P. minor* (z asi 2015) roste i po 43 měsících po převodu *ex vitro* (viz. obr. 3).



Obrázek 3: Mladá rostlina *P. minor* v květináči asi 43 měsíců po přesazení z podmínek *in vitro*. Foto: J. Ponert

Důvodem nízké úspěšnosti převodu do *ex vitro* může být jednak šok ze změny kultivačních podmínek (náhlé vystavení patogenům, a suchému vzduchu) nebo neschopnost přechodu z pravděpodobně mixotrofní výživy na autotrofní (nepřítomnost externího C, který byl v médiu ve formě sacharózy).

Zmíněno bylo několik konvergencí s orchidejemi. Již Tedersoo *et al.* (2007) pozorovali, že jak orchideje, tak hruštičkové jsou iniciálně mykoheterotrofní rostliny ale v dospělosti mohou být jak autotrofní, tak mixotrofní nebo vzácně mykoheterotrofní (Hynson *et* Bruns 2009). Velmi redukovaná prachová semena jsou další evoluční konvergencí, kterou nesdílí jen orchideje a hruštičky, ale množství dalších rostlin (Eriksson *et* Kainulainen 2011). Při klíčení procházejí hruštičky stadiem, které není pravým tělem ale jen jakýmsi předstádiem - protokormem, podobným orchidejovému protokormu. Při klíčení hruštičkových jsme pozorovali také další konvergence s orchidejemi. Jednak transformaci zásobních proteinů a lipidů během klíčení na škrob. Jednak schopnost utilizace trehalózy jako výhradního zdroje energie (pozorováno také u orchidejí; nepublikovaná data). Pravděpodobně sdílejí i mnoho dalších společných vlastností, protože sdílejí podobná stanoviště jako stinné lesy, horské louky či tundru.

Vyšší obsah stabilních izotopů  $^{13}\text{C}$  ve všech orgánech na rozdíl od autotrofních kontrol potvrzuje výsledky předešlých studií, které tvrdí, že rod *Pyrola* je mixotrofní (Tedersoo *et al.* 2007, Lallemand 2016). Obsah stabilních izotopů  $^{13}\text{C}$  se mezi orgány průkazně neliší. Je ale možné pozorovat jisté zvýšení obsahu izotopů  $^{13}\text{C}$  v kořeni oproti oddenkům a listům, nicméně velmi malé oproti pozorování u mixotrofních orchidejí (Lallemand *et al.* 2019). Odběr rostlinného materiálu probíhal v období vegetačního klidu a bylo by vhodné jej opakovat ve vegetačním období. Pozorovali jsme také neschopnost růstu na kultivačním médiu bez přidaného sacharidu a silnou preferenci ke komplexním kultivačním médiím. Klíčící hruštičkové zjevně navíc neobsahují chlorofyl (i když jsme obsah chlorofylu nekvantifikovali) a rostou v přírodě pod zemí (Velenovský 1892, 1905). Neschopnost růstu bez externího zdroje uhlíku a energie v *in vitro* kultuře, neexistence chlorofylu a růst v přírodě pod zemí bez přístupu světla jsou typické znaky naznačující mykoheterotrofii (May *et al.* 2020; Shutoh *et al.* 2020). Společně se zvýšeným obsahem stabilních izotopů  $^{13}\text{C}$  u rostlin je zjevné, že mladé hruštičky (protokormy) jsou mykoheterotrofní a dospělé zelené rostliny *P. minor* jsou mixotrofní – část uhlíku přijímají od houbového symbionta.

## 6. Závěr

1. Vytvořili jsme protokol umožňující kultivaci hruštičkových rostlin až do stádia zelených semenáčů. Modifikace spočívá zejména v síle desinfekce semen a použití komplexního média. Nutná je také absence světla. Chladová stratifikace však není potřebná. Hruštičkové mají silnou dormanci semen.
2. Záhy po vyklíčení se z nediferencovaného embrya vyvine přechodná zóna, která není ani kořenem ani prýtem, ale lze jí nazvat protokorm. Z něj vznikají později pravé kořeny. Adventivní prýty se objevují mnohem později v ontogenezi, z jediné rostliny se může vyvinout i několik prýtů.
3. Redukce embrya v semeni a tvorba protokormu po vyklíčení je konvergentní s orchidejemi. S tím souvisí i transformace zásobních lipidů a proteinů v semeni na škrob v klíčících rostlinách (protokormech) a schopnost utilizace trehalózy u obou skupin. Obě skupiny sdílejí i pestrost nutričních strategií. Všechny druhy jsou iniciálně mykoheterotrofní a můžou se vyvinout jak v autotrofní, mixotrofní nebo zůstat mykoheterotrofní.
4. Dospělé rostliny *Pyrola minor* jsou v přírodě do jisté míry mixotrofní. Podzemní orgány, hlavně kořeny jsou zásobovány houbovým uhlíkem nejvíc.

## 7. Literatura

- APG IV. 2016.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 1–20.
- Arditti J. 1967.** Factors Affecting the Germination of Orchid Seeds. *The Botanical Review* **33**: 1–97.
- Arditti J. 2008.** *Micropropagation of orchids. Volume 1, 2nd ed.* John Willey and Sons.
- Arditti J, Ghani A. 2000.** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* **145**: 367–421.
- Bobrov J. 2004.** On the early stages of ontogenesis of European Pyrolaceae species [In Russian]. *Botaniceskij Zhurnal* **89**: 1342–1351.
- Bobrov J. 2009.** Grushankovye Rossii [In Russian].
- Bobrov J. 2014.** Zhiznennaya forma *Moneses uniflora* (Pyroloideae, Ericaceae) [In Russian]. *Vektor nauki TGU* **29**: 21–29.
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein J V., et al. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 151–174.
- Christoph. 1921.** Untersuchungen über mykotrophen Verhältnisse der „Ericales“ und die Keimung von Pirolaceen [In German]. *Beihefte Botanisches Centralblatt* **38**: 115–157.
- Copeland HF. 1947.** Observations on the structure and classification of the Pyroleae. *Madroño* **9**: 65–102.
- Cosme M, Fernández I, Van der Heijden MGA, Pieterse CMJ. 2018.** Non-Mycorrhizal Plants: The Exceptions that Prove the Rule. *Trends in Plant Science* **23**: 577–587.
- Eriksson O, Kainulainen K. 2011.** The evolutionary ecology of dust seeds. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **13**: 73–87.
- Francke H-L. 1934.** Beiträge zur Kenntnis der Mykorrhiza von *Monotropa hypopitys* L [In German]. *Flora* **129**: 1–52.
- Freudenstein J V., Broe MB, Feldenkris ER. 2016.** Phylogenetic relationships at the base of Ericaceae: Implications for vegetative and mycorrhizal evolution. *Taxon* **65**: 794–804.
- Fürth P. 1920.** Zur Biologie und Mikrochemie einiger Pirola [In German]. *Sitz-ungsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-Nat. Kl.* **1**: 559–587.
- Gebauer G, Meyer M. 2003.** <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**: 209–223.
- Goebel K. 1887.** *Outlines of classification and special morphology of plants.* Oxford: Clarendon Press.
- Gonneau C, Jersáková J, de Tredern E, Till-Bottraud I, Saarinen K, Sauve M, Roy M, Hájek T, Selosse M-A. 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.
- Guo S, Xu J. 1990.** Studies on the changes of cell ultrastructure in the course of seed germination of *Bletilla striata* under fungus infection conditions. *Acta Botanica Sinica* **32**: 594–598.
- Harley JL. 1959.** The biology of mycorrhiza. *The biology of mycorrhiza.*: 234.

- Harrison CR. 1977.** Ultrastructural and Histochemical Changes during the Germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* **138**: 41–45.
- Hashimoto Y, Fukukawa S, Kunishi A, Suga H, Richard F, Sauve M, Selosse M-A. 2012.** Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytologist* **195**: 620–630.
- 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.
- Hofmeister W. 1858.** Neuere Beobachtungen über Embryobildung der Phanerogamen. *Jahrb. Wiss. Bot.* **1**: 82–188.
- Holm T. 1898.** *Pyrola aphylla*: A Morphological Study. *Botanical Gazette* **25**: 246–254.
- 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, Weiß M, Preiss K, Gebauer G, Treseder KK. 2013.** Fungal host specificity is not a bottleneck for the germination of Pyroleae species (Ericaceae) in a Bavarian forest. *Molecular Ecology* **22**: 1473–1481.
- Imhof S, Sainge MN. 2008.** Ontogeny of the mycoheterotrophic species *Afrothismia hydra* (Burmanniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **157**: 31–36.
- Irmish T. 1855.** Bemerkungen über einige Pflanzen der deutschen Flora [In German]. *Flora* **13**: 625–638.
- Johansson VA, Bahram M, Tedersoo L, Kõljalg U, Eriksson O. 2017.** Specificity of fungal associations of Pyroleae and *Monotropia 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.
- Kull T, Arditti J (Eds.). 2002.** *Orchid Biology: Reviews and Perspectives VIII*. Springer.
- Lallemand F, Figura T, Damesin C, Fresneau C, Griveau C, Fontaine N, Zeller B, Selosse M-A. 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, Luud A, Courty P-E, Palancade C, Selosse M-A. 2017.** Mixotrophy in Pyroleae (Ericaceae) from Estonian boreal forests does not vary with light or tissue age. *Annals of Botany* **120**: 361–371.
- Leake J. 1994.** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**: 171–216.
- Lee MH, Lee JM, Jun SH, Lee SH, Kim NW, Lee JH, Ko NY, Mun SH, Kim BK, Lim BO, Choi, DK, Choi WS. 2007.** The anti-inflammatory effects of Pyrolae herba extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. *Journal of Ethnopharmacology* **112**: 49–54.
- Li Y-Y, Chen X-M, Guo S-X, Lee Y-I. 2016.** Embryology of two mycoheterotrophic orchid species, *Gastrodia elata* and *Gastrodia nantoensis*: ovule and embryo development. *Botanical Studies* **57**: 1–10.
- Lihnell D. 1942.** Keimungsversuche mit Pyrolasamen [In German]. *Symbolae botanicae upsalienses* **6**: 1–37.

- Liu Z-W, Zhou J, Liu E-D, Peng H. 2010.** A molecular phylogeny and a new classification of Pyrola (Pyroleae, Ericaceae). *Taxon* **59**: 1690–1700.
- Lück R. 1940.** Zur Biologie der heimischen Pirola-arten [In German]. *Schr. phys.-ökon. Ges. Königs.* **71**: 300–334.
- Lück R. 1941.** Zur keimung der heimischen Pirola-Arten [In German]. *Flora* **135**: 1–5.
- Ma W-D, Zou Y-P, Wang P, Yao X-H, Sun Y, Duan M-H, Fu Y-J, Yu B. 2014.** Chimaphilin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. *Food and Chemical Toxicology* **70**: 1–8.
- Manning J, Van Staden J. 1987.** The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids. *Australian Journal of Botany* **35**: 343–353.
- May M, Jąkowski 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.
- Merckx VSFTFT. 2013.** Mycoheterotrophy: The biology of plants living on fungi In: *Mycoheterotrophy*. 1–356.
- Nikolov LA, Davis CC. 2017.** The big, the bad, and the beautiful: Biology of the world’s largest flowers. *Journal of Systematics and Evolution* **55**: 516–524.
- Nikolov LA, Staedler YM, Manickam S, Schönenberger J, Endress PK, Kramer EM, Davis CC. 2014.** Floral structure and development in Rafflesiaceae with emphasis on their exceptional gynoecea. *American journal of botany* **101**: 225–243.
- Olson AR. 1993.** Patterns of embryo and endosperm formation in *Monotropa hypopitys* (Monotropaceae) from North America and Western Sweden. *American Journal of Botany* **80**: 839–846.
- Ponert J, Figura T, Vosolobě S, Lipavská H, Vohník M, Jersáková J. 2013.** Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by Nitrates even at extremely low concentrations. *Canadian Journal of Botany* **91**: 662–670.
- Ponert J, Vosolobě S, Kmecová K, Lipavská H. 2011.** European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European journal of environmental sciences* **1**: 95–107.
- Pyykkö M. 1968.** Embryological and anatomical studies on Finnish species of the Pyrolaceae. *Annales Botanici Fennici* **5**: 153–165.
- Rasmussen HN. 1990.** Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*. *New Phytologist* **116**: 137–147.
- Rasmussen HN. 1992.** Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum* **86**: 161–167.
- Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rasmussen HN, Dixon KW, Jersáková J. 2015.** Germination and seedling establishment in orchids : a complex of requirements. : 391–402.
- Rasmussen HN, Whigham DF. 1993.** Seed ecology of dust seeds *in situ*: A new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany* **80**: 1374–1378.
- Richardson KA, Peterson RL, Currah RS. 1992.** Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* **70**: 291–300.

- Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, Berveiller D, Thomas J.-C, Damesin C, Selosse M.-A. 2013.** Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecological Monographs* **83**: 95–117.
- Sadovsky O. 1965.** *Orchideen im eigenen Garten*. Munich, Germany.
- Selosse M, Bocayuva MF, Kasuya MCM, Courty PE. 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, Roy M. 2009.** Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* **14**: 64–70.
- Shutoh K, Tajima Y, Matsubayashi J, Tayasu I, Kato S, Shiga T, Suetsugu K. 2020.** Evidence for newly discovered albino mutants in a pyroloid: implication for the nutritional mode in the genus *Pyrola*. *American Journal of Botany* **107**: 650–657.
- 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.
- Smith SE, Read D. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Suetsugu K, Ohta T, Tayasu I. 2018.** Partial mycoheterotrophy in the leafless orchid *Cymbidium macrorhizon*. *American Journal of Botany* **105**: 1595–1600.
- Takahashi H. 1993.** Seed Morphology and Its Systematic Implications in Pyroloideae (Ericaceae). *International Journal of Plant Sciences* **154**: 175–186.
- 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.
- Tian M, Wang F. 1985.** *In vitro* seed germination and developmental morphology of seedling in *Cymbidium ensifolium*. *Acta Botanica Sinica* **27**: 455–459.
- Velenovský J. 1892.** O biologii a morfologii rodu “*Monesis*” [In Czech]. *Rozpravy Královské české společnosti nauk, řada, matematicko-přírodovědná* **11**: 147–159.
- Velenovský J. 1905.** Über die Keimpflanzen der Pirolaceen [In German]. *Bull. intn. Acad. Sci. Boheme* **14**: 6–12.
- Votrubová O. 2010.** *Anatomie rostlin*. Praha.
- Wallace GD. 1975.** Studies of the Monotropeoideae (Ericaceae): Tax-onomy and distribution. *Wasmann. J. Biol.* **33**: 1–88.
- Yam TW, Yeung EC, Ye X-L, Zee S-Y, Arditti J. 2002.** Orchid Embryos In: Kull T, Arditti J, eds. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VIII*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 287–385.
- Yamato M, Suzuki T, Matsumoto M, Shiraishi T, Yukawa T. 2021.** Mycoheterotrophic seedling growth of *Gentiana zollingeri*, a photosynthetic Gentianaceae plant species, in symbioses with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Research* **134**: 921–931.
- Yeung EC. 2017.** A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies* **58**: 1–14.
- Yeung EC, Law SK. 1992.** Embryology of *Calypso bulbosa*. II. Embryo development. *Canadian Journal of Botany* **70**: 461–468.
- Zhang DY, Luo M, Wang W, et al. 2013.** Variation of active constituents and antioxidant activity in *pyrola* [*P. incarnata* Fisch.] from different sites in Northeast China. *Food Chemistry* **141**: 2213–2219.

**Ziegler H. 1981.** Mikromorphologie der Orchideensämen unter Berücksichtigung taxonomischer Aspekte – disertační práce, Ruprecht Karls Universität, Heidelberg – In: Rasmussen (1995)

**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 pyrolids and monotropids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytologist* **175**: 166–175.

## 8. Příloha

(publikace: Tomáš Figura, Edita Tylová, Jan Šoch, Marc-André Selse a Jan Ponert: In vitro axenic germination and cultivation of mixotrophic Pyroloideae (Ericaceae) and their post-germination ontogenetic development (2019), *Annals of Botany* 123,4: 625-639)