

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Anatomie a fyziologie rostlin



**Bc. Ondřej Borovec**

Ekofyziologický význam houbových symbióz kořenů  
středomořských trav

Ecophysiological significance of root-fungus symbioses in  
Mediterranean seagrasses

Diplomová práce

Praha, 2015

**Vedoucí diplomové práce:**

RNDr. Martin Vohník, Ph.D. (Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK, Oddělení mykorhizních symbióz BÚ AV ČR, v.v.i.)

**Konzultant diplomové práce:**

RNDr. Radka Sudová, Ph.D. (Oddělení mykorhizních symbióz BÚ AV ČR, v.v.i.)

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Ondřej Borovec

V Praze, 11. 5. 2012

## **Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat svému školiteli, RNDr. Martinu Vohníkovi, Ph.D., za nesmírnou ochotu a trpělivost, s jakou mě vedl v průběhu mé magisterské práce. Děkuji Mgr. Jiřímu Macháčovi (Optická laboratoř Botanického ústavu AV ČR, v. v. i.) za pomoc při pořizování a zpracování fotografií z optického i skenovacího elektronického mikroskopu. Dále děkuji Laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK za přípravu vzorků na transmisní elektronovou mikroskopie. Mé díky patří i Ing. Peteru Ergangovi, Ph.D. (Oddělení funkce epitelu, Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.), který mě uvedl do využívání metody laserové mikrodisekce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D. (Katedra botaniky PřF UK) za spolupráci při molekulárních metodách. V neposlední řadě děkuji kolegům z Oddělení mykorhizních symbióz AV ČR v. v. i., především RNDr. Ing. Liboru Mrnkovi, Ph.D., za ochotu kdykoli mi poradit a pomoci, a Marii Bulínové za pomoc se zpracováním fotografií. Závěrem děkuji své rodině za podporu a zázemí.

Tato diplomová práce byla financována z projektu Grantové agentury U. K. 68313/PrF/B-BIO: “Unikátní symbióza hub s kořeny středomořské endemické trávy *Posidonia oceanica*: výskyt, fenotypová a genetická variabilita a potenciální ekofyziologický význam” (Hl. řešitel Bc. Ondřej Borovec)

## Obsah

Prohlášení .....	2
Poděkování ... ..	3
Obsah .....	4
Abstrakt .....	5
Klíčová hesla .....	6
Abstract .....	7
Key words .....	8
1. Úvod .....	9
2. Přehled literatury .....	10
3. Materiály a metody ... ..	17
4. Výsledky .....	24
5. Diskuze .....	38
6. Seznam použité literatury .....	42
7. Přílohy .....	46

## Abstrakt

Mořské trávy, jediná skupina trvale ponořených cévnatých rostlin v mořském prostředí, tvoří důležitou složku ekosystému mořského dna. Hrají významnou roli v primární produkci, jsou schopny akumulace a následně i redistribuce uhlíku v prostředí, mění dynamiku proudění vody u mořského dna a symbioticky asociují s celou řadou organismů. Ačkoli bylo během posledních let vypracováno několik studií týkajících se symbióz mořských trav s různými organismy včetně endofytických hub a bakterií, naše znalosti v tomto poli jsou dosud velmi omezené.

Obecně se předpokládá, že kořenové systémy mořských trav na rozdíl od většiny terestrických rostlin neasociují s mutualistickými mykorhizními houbami a že houbové endofyty netvoří žádné specifické asociace se svými hostitelskými rostlinami. Nedávno jsme však v kořenech endemického druhu mořské trávy z oblasti Středozemního moře posidonie Neptunovy (*Posidonia oceanica* L. (Delile)) objevili endofytickou houbu, která svou morfologií připomínala dark septate endophytes (DSE). Provedli jsme odběr vzorků kořenů posidonii na mnoha lokalitách po celém Středomoří. S využitím mikroskopie, kultivace hub a jejich molekulární detekce jsme identifikovali oblast rozšíření a taxonomickou příslušnost endofytické houby.

Posidonie Neptunovy jsou v rozsáhlém areálu od jihovýchodního Španělska po Albánii kolonizovány pouze dvěma endofytickými houbami. Přes 90 % houbových symbiontů posidonie se řadí k dosud nepopsanému druhu z čeledi Aigialaceae, řádu Pleosporales. Tento houbový symbiont byl přítomný ve vzorcích z téměř všech námi prověřených lokalit. Jeho přítomnost se vyznačovala tvorbou charakteristických struktur – povrchových hyf, které někdy tvořily hyfový plášť, dále vnitrokořenových hyf rostoucích zpravidla v mezibuněčném prostoru, a nakonec vnitrobuněčných mikrosklerocií.

Všudypřítomnost endofytické kolonizace u dospělých rostlin ostře kontrastovala s její naprostou absencí u raných fází vývoje semenáčků. Juvenilní rostliny posidonie se vyznačovaly bohatou přítomností kořenového vlášení, tedy struktury, která byla dosud u posidonie Neptunovy považována za řídký jev. Zdá se, že v průběhu ontogeneze kořenové vlášení postupně mizí a naopak narůstá kolonizace houbovým endofytem. Míra kolonizace pleosporální houbou je závislá i na dalších faktorech. Růst hostitelských posidonii na neobvyklém jílovitém substrátu rozšíření hub limituje, naopak s rostoucí hloubkou dosahuje kolonizace vyšších hodnot.

Zatímco kořeny posidonie Neptunovy vykazovaly bohatou kolonizaci endofytickými houbami, kořeny druhé nejrozšířenější mořské trávy *Cymodocea nodosa*, která se na některých lokalitách vyskytuje nedaleko porostů posidonie, nebyly patrně námi objeveným houbovým endofytem kolonizovány vůbec. Specificita výskytu pleosporálního endofyta i fakt, že posidonie v jeho přítomnosti téměř neasociují s dalšími druhy hub, je unikátní a zaslouží si pozornost,

#### Klíčová hesla:

mořské trávy, posidonie Neptunova, endofyty, DSE, symbiotické houby

## Abstract

Seagrasses are the only group of submerged plants that are permanently growing in marine environment. They play an important role in the sea bottom ecosystem. Seagrasses are primary producers capable of accumulation and deposition of carbon. They influence water flow at the sea bottom and form symbioses with variety of organisms. Our knowledge of symbiotic interactions of seagrasses is still limited even though several studies of the topic have been carried out in recent years.

Unlike most of terrestrial plants, seagrasses are generally considered as plants that do not form any specific associations with mycorrhizal or endophytic fungi. Surprisingly, we have discovered a novel fungal endophytic association in roots of Mediterranean endemic seagrass species *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Morphology of this symbiotic fungi strongly resembles common symbiotic fungi of terrestrial plants, dark septate endophytes (DSE). We sampled roots of *P. oceanica* in large area of the Mediterranean from southeastern Spain to Albania and described range and taxonomical classification of the endophyte using microscopy, in vitro cultivation and molecular determination.

Roots of *P. oceanica* in whole area of study are colonized by mere two endophytic fungal species. Over 90 % of the fungal symbionts belong to a single so far undocumented species from family Aigialaceae, order Pleosporales. This fungal symbiont was present in vast majority of root samples from almost all sites. It formed distinctive structures such as superficial mantle-forming hyphae, intraradical intercellular hyphae and intracellular microsclerotia.

Unlike in established plants, fungal symbionts were completely absent in roots of early plantlets. However, juvenile *Posidonias* frequently formed root hairs – structures that were considered very rare or absent on most of the seagrass roots. It seems that the plant gradually loses root hair cover during ontogenesis. On the other hand, fungal colonization rate increases. Fungal symbiotic colonization of the roots is most likely influenced by other factors as well. Colonization rate of roots sampled at uncommon silty substrate was lower. On the contrary, fungal colonization increases with increasing depth.

Unlike *Posidonia oceanica*, roots of second most common seagrass species from the Mediterranean, *Cymodocea nodosa*, did not associate with the fungal symbiont even though sometimes both seagrasses co-occurred at the same site. Specificity of the pleosporalean

endophyte along with the fact that *Posidonias* almost do not associate with other fungal species may point at unique status of the newly discovered symbiosis.

**Key words:**

seagrasses, *Posidonia oceanica*, endophytes, DSE, symbiotic fungi



# 1. Úvod

Endofytické asociace hub s vyššími rostlinami jsou v terestrickém prostředí velmi rozšířené. Díky výzkumu probíhajícímu již od 19. století byly popsány různé typy interakcí houbových endofytů s rostlinami v široké škále od mutualismu po parazitismus. Podstatně méně prozkoumány jsou však symbiotické houby v kořenech vodních rostlin. Mykoflóra mořských trav pak byla zkoumána pouze v několika málo studiích.

Z důvodu rozsáhlé přítomnosti mořských trav v kombinaci s relativně snadnou dostupností jsme se zaměřili na oblast Středozemního moře. Nielsen a kol. (1999) se ve své práci zabývali možností endofytické a mykorhizní houbové kolonizace mořských trav v kořenech tropických druhů z indomalajské oblasti. Nebyli úspěšní, ale budoucím badatelům navrhovali, aby se zaměřili na druhy bez kořenového vlášení rostoucí v prostředí s limitovaným přísunem živin, jakými jsou například středomořské posidonie Neptunova a *Cymodocea nodosa*.

Nám se skutečně podařilo objevit endofytní houbovou kolonizaci v kořenech posidonie. Tato asociace je velmi specifická a rozšířená. Cílem mé práce bylo zjistit rozsah a formu endofytické houby, taxonomickou příslušnost endofyta a rozšíření v rámci populací posidonie ve Středozemním moři. Dále jsem měl porovnat kolonizaci posidonie Neptunovy s druhem *Cymodocea nodosa*.

Hypotéza: posidonie Neptunova je asociována s houbovým endofytem; tato asociace je specifická a rozšířená

Cíle: odhalit rozsah a formu přítomnosti endofytických hub v kořenech středomořských trav

kultivovat endofytické houby na médiu a získat jejich čisté kultury, následně je využít k identifikaci taxonomické příslušnosti endofyta

prověřit vliv hloubky, průměru kořenů, substrátu a ontogenetického stadia posidonie na její endofytickou kolonizaci

## 2. Přehled literatury

### 2.1 Vodní rostliny

Dominantním primárním producentem biomasy prakticky ve všech terestrických ekosystémech jsou vyšší rostliny, zejména krytosemenné. Ve vodním prostředí však roli nejvýznamnějších fotosyntetizujících organismů přebírají jedno- i mnohobuněčné řasy nebo mikroskopické autotrofní organismy z dalších skupin organismů. Zatímco ve sladkých vodách se vyvinula celá řada druhů vodních rostlin z různých vývojových linií, kolonizace mořského prostředí je patrně evolučně velmi obtížná. Na život v prostředí mořského dna se dokázala adaptovat pouze úzká skupina rostlin známá jako mořské trávy (angl. seagrasses).

### 2.2 Mořské trávy

Mořské trávy se řadí mezi jednoděložné rostliny z řádu šmelotvarých (Alismatales). Nejedná se o monofyletickou skupinu, hned v několika liniích šmelotvarých došlo ke konvergentní evoluci. Předchůdci současných mořských trav sekundárně osídlili ekosystémy mořského dna v období křídy (Les a kol., 1997). Mořské trávy jsou ekofyziologickou skupinou, jíž spojuje podobná životní strategie. Příslušníci této skupiny rostlin pocházejí ze čtyř čeledí, a to Posidoniaceae, Cymodoceaceae, Zosteraceae a Hydrocharitaceae. Zástupci prvních tří zmíněných čeledí jsou výlučně druhy rostoucí na mořském dně. K poslední jmenované čeledi se však neřadí výhradně mořské, ale i sladkovodní rostlinné druhy. V některé literatuře se k mořským travám řadí ještě rody z čeledí Ruppiaceae a Zannichelliaceae, ale v některé literatuře nejsou zařazeny mezi mořské trávy z důvodu četného výskytu i v brakických vodách. Všechny mořské trávy jsou schopné růst a rozmnožovat se v mořském prostředí, aniž by jej během kterékoli fáze svého životního cyklu musely opouštět. Mořské trávy jsou jedinou skupinou cévnatých rostlin trvale rostoucích ponořeně v mořských ekosystémech.

Přechod rostlin do mořského prostředí si vyžaduje celou řadu adaptací na nové prostředí. Výskyt vyšších rostlin ve vodním prostředí je limitován množstvím živin v substrátu. Většina druhů mořských trav je schopna získávat živiny z okolní vody prostřednictvím nadzemních orgánů, zejména listů (Pedersen a Borum, 1992; Khan a Belik, 1995). Vzhledem k neustálému pohybu vodního sloupce je pro vodní rostliny zásadní dostatečně silné zakořenění v substrátu. Mořské trávy proto tvoří rozsáhlé a bohatě větvené kořenové systémy. Podzemní biomasa mořských trav bývá stejně velká jako nadzemní a

nezřídka ji i přesahuje (Duarte a Chiscano, 1999). Rostliny rostoucí v moři se musejí vyrovnat s vysokou salinitou i jejím kolísáním (Touchette, 2007).

### 2.3 Distribuce mořských trav

Mořské trávy se hojně vyskytují v mořích tropického a mírného pásu celého světa. Centrem diverzity mořských trav je indomalajská oblast a pobřeží Austrálie. V rámci moří omývajících pobřeží Evropy je druhově nejbohatší oblastí Středomoří. Ve Středozemním moři roste 5 druhů mořských trav, kterými jsou *Zostera noltii*, *Zostera marina*, *Cymodocea nodosa* a *Halophila stipulacea*, příslušníci globálně rozšířených rodů *Zostera*, *Cymodocea* a *Halophila*, a dále *Posidonia oceanica*, jediný z devíti druhů monotypické čeledi Posidoniaceae, který se vyskytuje mimo areál u jihovýchodního, jižního a jihozápadního pobřeží Austrálie a již na přelomu druhohor a třetihor se oddělil od ostatních druhů a jeho vývoj probíhal nezávisle (Short et al., 2007; Aires et al., 2011).

Prostor Středozemního moře je z hlediska výskytu a rozšíření mořských trav velmi specifický. Středozemní moře je Gibraltarskou úžinou přímo spojeno s Atlantským oceánem, průlivy Bospor, Dardanely a Marmarským mořem pak s Černým mořem. Některé druhy mořských trav však nejsou rozšířené na obě strany úžin. Mořské trávy jsou rostliny, které pro svůj úspěšný růst vyžadují stálé podmínky a i malé fluktuace mohou jejich růst výrazně limitovat. Předpokládá se, že snížená salinita Černého moře je limitujícím faktorem, který zabraňuje rozšíření většiny Středomořských druhů mořských trav. Naopak umožňuje růst dalším druhům z brakických vod, které se již nepovažují za mořské trávy (Milchakova a kol., 1999). Stejně tak příčinou rozdílného spektra druhů mořských trav ve Středomoří oproti Atlanstkému oceánu je pravděpodobně vyšší salinita vnitřního moře v porovnání s otevřeným oceánem. Disperzi středomořských druhů trav do Atlantiku také brání převažující proudění vody v Gibraltarské úžině směrem k východu (Green a Short, 2003).

### 2.4 Posidonie Neptunova

Nejrozšířenějším druhem mořské trávy ve Středozemním moři je tamější endemit posidonie Neptunova (*Posidonia oceanica* (L.) Delile). Tento druh osidluje dna mělkých moří v hloubce od 0 do přibližně 45 metrů. Vytváří rozsáhlé mořské louky, které mohou pokrýt oblast větší než 10 km v průměru a dosáhnout stáří až desítek tisíc let (Arnaud-Haond a kol., 2012). V úrovni povrchu substrátu nebo pod ní je umístěn makromeristém posidonie, z něhož nad povrch vyrůstají listy a pod povrch rhizom s kořeny. Nadzemní část je tvořena zpravidla 30-50 cm dlouhými širokými listy. V porovnání s ostatními mořskými travami se jedná o velké

struktury, které umožňují fotosyntézu i v hloubkách přes 30 metrů a umožňují zisk živin z vody (Khan a Belik, 1995) V případě disturbancí spojených s pohyby vodního sloupce však velká listová plocha zvyšuje šanci poškození, nebo dokonce utržení listů (Infantes a kol., 2011). Posidonie Neptunova se vyznačuje rozsáhlým a bohatě větveným kořenovým systémem, který jí umožňuje zakotvit v substrátu. Kořeny zároveň slouží i k poskytování výživy (Belzunce et al., 2008). To umožňuje posidonii kombinovat způsob příjmu živin ze substrátu a z vody podle potřeby.

Mořské louky posidonie Neptunovy tvoří vysoce produktivní ekosystém mořského dna. Jsou velmi významným primárním zdrojem uhlíku a zároveň jsou schopny ve svých pletivech tento prvek akumulovat. Rozkládající se zbytky nadzemních částí spolu s exudáty kořenů a částčkami substrátu vytvářejí hmotu nazývanou matte. Substrát tvořený matte je velmi vyhledávaným zdrojem živin pro celou řadu živočišných druhů.

#### 2.4.1 Rozmnožování posidonie Neptunovy

Dominantním způsobem rozmnožování posidonie Neptunovy je produkce vegetativních výhonků, která umožňuje růst mořských luk. Ontogeneze mladé rostlinky v prostředí mořské louky poskytuje ochranu před disturbancemi způsobenými zvýšeným pohybem vodního sloupce. Míra přežití semenáčků vyprodukovaných tímto nepohlavním procesem je vyšší, než v případě těch sexuálně rozmnožených (Alagna a kol., 2013).

Posidonie Neptunova je schopna se rozšiřovat i disperzí fragmentů vegetativních rhizomů. Kvetení a produkce semen je u posidonie Neptunovy velmi vzácnou událostí. K produkci pohlavních orgánů dochází jen jednou za 8-10 let, a to v rozsáhlých oblastech při pobřeží. Příčina tohoto reprodukčního chování není dosud plně známa. Předpokládá se, že hlavní vliv na pohlavní proces posidonie mají teploty během sezóny.

Semena posidonie Neptunovy jsou umístěna v plodech schopných plování. Disperze po hladině se uskutečňuje zejména vlivem větru za přispění mořských proudů. Vlivem větru se plody hromadí v zátokách, kde po několika dnech od uvolnění z mateřské rostliny dochází k uvolnění semen. Již v průběhu dozrávání plodu začínají semena posidonie klíčit, takže jsou v případě dosažení vhodného substrátu schopná velmi rychle zakořenit. Nejvhodnějším substrátem pro usazování semenáčků je matte a písek. Naopak skalnatý a oblázkový substrát prakticky znemožňuje úspěšné zakořenění mladých posidonii.

Fáze ontogeneze po zakořenění je rovněž velmi rizikovou a procento přežití semenáčků relativně nízké. V raných fázích vývoje semenáčku jej semeno bohatě zásobuje živinami. Klíčem semenáčků k přežití je však schopnost ukotvení v substrátu prostřednictvím

kořenů. Ze zárodku rhizomu v semeni vyrůstá nejdříve primární kořen, který je následován několika adventivními kořeny. Primární i adventivní kořeny se bohatě větví a tvoří síť kořenů druhého a třetího řádu. Rozsáhlé kořenové systémy poskytují mladým posidoniím oporu. I přesto značný počet semenáčků podlehne disturbancím při zvýšeném příboji, popřípadě při bouřích. Následně dochází u dospívajících semenáčků k prodlužování rhizomů, tvorbě postranních výhonků a později k vegetativnímu rozmnožení a zakládání nových mořských luk (Belzunce a kol., 2005)

## 2.5 Funkce posidonie Neptunovy v ekosystému

V poslední době v mnoha oblastech západního i východního Středomoří dochází k úbytku a hromadnému hynutí posidonie Neptunovy. V jihovýchodní části Středozemního moře jsou posidonie vytlačovány invazní mořskou trávou *Halophila stipulacea*, která pronikla do Středomoří z Rudého moře po výstavbě Suezského průplavu. U pobřeží Francie je posidonie ohrožena invazí řasy *Caulerpa taxifolia*. K úbytku a degradaci porostů posidonie však dochází i v jiných oblastech. Je možné, že vliv má lidská činnost a znečišťování moře, příčiny však nejsou dosud plně zjištěny. Úbytek posidonie Neptunovy může mít zásadní vliv na fungování ekosystému, protože tato mořská tráva má nezastupitelnou roli jako element symbiózy s mnoha druhy organismů. Epifytické mechovky, hnědé a zelené řasy porůstají listy posidonií (Lepoint a kol., 1999; Kocak a kol., 2002). Povlaky řas jsou následně zdrojem výživy pro celou řadu epifytických bezobratlých, zejména amfipodů a kroužkoců. Tkáně posidonie jsou kolonizovány endofytickými bakteriemi a houbami (Borg a kol., 2006).

Vzhledem k nízké rychlosti vegetativního rozmnožování, nepravidelnosti tvorby semen a značným rizikem úhynu semenáčků před dosažením dospělosti je téměř nemožné přirozeným způsobem nahradit degradaci mořských luk. Za účelem bylo vyzkoušeno několik metod kultivace mladých rostlinek a jejich opětovné vysazení do volné přírody. Nejlépe se osvědčilo pěstování semenáčků v mělkých chráněných mořských zátokách. Naopak kultivace in vitro, popřípadě na různých substrátech v laboratořích, dosahovala nízké úspěšnosti (Balestri a kol., 1998).

## 2.6 *Cymodocea nodosa*

Druhým nejrozšířenějším druhem mořské trávy ve Středozemním moři je *Cymodocea nodosa* (Ucria). Tento druh se v mnohém liší od posidonie. Nevytváří souvislé mořské louky, ale porosty, kde jsou jedinci od sebe izolováni. Roste se zejména v mělkých vodách do hloubky 3-5 metrů, ovšem její výskyt byl zaznamenán i v hloubkách přes 30 metrů (Short a kol., 2007).

Dokáže se přizpůsobit různým podmínkám, a proto roste i na exponovaných lokalitách s výrazným vlivem vlnobití. Dosahuje mnohem nižšího vzrůstu než posidonie a její listová plocha je výrazně nižší. Převládající formou rozmnožování je i u tohoto druhu klonální šíření prostřednictvím výhonků. Ty mohou dosahovat až dvoumetrové vzdálenosti a během jediné sezóny vyprodukovat hned několik ramet (Caye a Meinesz, 1985). V důsledku tohoto jevu tvoří *Cymodocea nodosa* relativně řídké porosty.

## 2.7 Endofytické houbové asociace rostlin

Jedním z nejvýznamnějších typů symbiotických asociací v přírodě je interakce mezi kořeny rostlin a houbami. Fyziologický význam houbových asociací s vyššími rostlinami je velmi různorodý a pohybuje se v celé škále interakcí od mutualistické po parazitickou. Role jednoho druhu houby však nemusí být nutně stálá po celou dobu ontogeneze. Mnoho druhů hub je schopno během svého životního cyklu měnit svou životní strategii. Typ konkrétní interakce je definován podle převládajícího toku látek mezi hostitelem a mykobiontem – u parazitických hub proudí látky z rostliny do houby, kdežto u mutualistických interakcí probíhá tok živin do jisté míry oběma směry (Smith a Smith, 1990).

## 2.8 Mykorhizní houby

Většina rostlinných druhů interaguje s troficky specializovanou skupinou půdních hub, které spolu s kořeny rostlin tvoří mutualistickou mykorhizní symbiózu. Mykorhizní houby jsou charakteristické tvorbou rozsáhlého extraradikálního mycelia, na které kontinuálně navazují houbové struktury obklopující kořen (v případě ektomykorhiz) nebo pronikající do kořene a tvořící struktury interagující s rostlinnými buňkami. Mykorhizní houby dokážou díky své odlišné enzymatické produkci získat živiny i ze substrátů, které jsou pro rostliny jen málo využitelné. Prostřednictvím husté a bohatě větvené sítě hyf jsou schopné získat minerální látky z mnohem většího objemu půdy, než samotné rostlinné kořeny. Minerální látky a voda jsou transportovány do rostliny, která na oplátku poskytuje houbě uhlík ve formě organických sloučenin. Mykorhizní houby dále napomáhají ochraně rostlin před patogeny. Zvyšují toleranci rostliny vůči suchu a vlivům toxických látek v prostředí.

Tato asociace hrála významnou roli při kolonizaci souše rostlinami a rovněž se podílela na vzniku a formování kořenových soustav terestrických rostlin. Předpokládá se, že veškeré vyšší rostliny původně žily v symbióze s mykorhizními houbami ze skupiny Glomeromycota, se kterými tvořily arbuskulární symbiózu. Sekundárně se u některých skupin rostlin vyvinuly

další typy mykorhiz. (Brundrett, 2002). V současné době je více než 80 % rostlinných druhů mykorhizních (Wang a Qiu, 2006; Brundrett, 2009). U několika skupin rostlin však v průběhu evoluce došlo k zániku interakce s mykorhizními houbami. Nemykorhizní zpravidla bývají parazitické rostliny, masožravé rostliny a rostliny s výrazně vyvinutými kořeny s hustým kořenovým vlášením, které tvoří takzvané proteoidní kořeny známé rovněž pod anglickým termínem cluster roots. Mnoho nemykorhizních druhů rostlin se vyskytuje ve vodním prostředí, kde jsou živiny pro rostliny dostupné přímo z okolní vody.

## 2.9 Endofytické houby

Ještě rozšířenější skupinou v porovnání s mykorhizními houbami jsou endofytické houby, s nimiž asociují prakticky všechny rostliny (Rodriguez a kol., 2009). Podle obecné definice jsou endofyty houbami, které zpravidla s hostitelem neinteragují ve smyslu látkové výměny a trofismu. Přesto mohou pozitivně ovlivňovat životaschopnost hostitelské rostliny, protože některé z nich zvyšují toleranci rostliny vůči stresu. Rovněž mohou bránit patogenům v napadání rostlin, zejména tím, že svou přítomností znemožňují šíření parazitů do intraradikálních prostor. Jejich vliv na rostlinu však může být i negativní a endofyty pak v podstatě fungují jako parazité. V mnoha ekosystémech od polárních po tropické oblasti jsou velmi rozšířeným symbiontem rostlin houby s charakteristickým tmavým přehrádkovaným myceliem a vnitrobuněčnými mikrosklerocii, které se označují jako DSE (dark septate endophytes). Na rozdíl od ostatních endofytů jsou DSE charakteristické schopností tvorby extraradikálního mycelia, které se šíří po povrchu hostitelské rostliny a možná i dále do substrátu (Jumpponen a Trappe, 1998).

### 2.10.1 Houbové endofyty vodních rostlin

Ačkoli jsou mykorhizní a endofytické houby v kořenech suchozemských rostlin relativně dobře známy a popsány, naše poznatky o těchto houbách z vodního prostředí jsou podstatně menší. Prvním, kdo zaznamenal mykorhizní kolonizaci v kořenech ponořené vodní rostliny, byli Søndergaard a Laegaard (1977), kteří zjistili přítomnost arbuskulárně mykorhizních hub u isoetidů. Od té doby se podařilo objevit mykorhizu v dalších sladkovodních rostlinách (Šraj-Kržič a kol., 2006, Sudová et al. 2011) i v rostlinách ze salinních ekosystémů jako například mangrovů (Sengupta and Chaudhuri, 2002) nebo zasolených mokřadů (Hildebrandt et al., 2001). Dosud však nebyla objevena žádná mykorhizní asociace v kořenech mořských trav (Nielsen a kol., 1999; Mata a Cebrián, 2013; Panno a kol., 2013; Vohník a kol., 2015a).

### 2.10.2 Houbové endofyty mořských trav

Kořeny mořských trav jsou kolonizovány endofytními houbami. První zmínky o přítomnosti hub v těle posidonie pocházejí již z 19. Století. První systematickou studii však provedli až v roce 1985 Cuomo a kol. V listech, rhizomu i kořenech objevili celkem sedm druhů hub, převážně lignikolních saprofytů, ovšem pouze jediný druh, *Corollospora maritima*, se vyskytoval i v kořenech. V roce 2013 provedli Panno a kol. studii, ve které se zabývali houbovou kolonizací listů, rhizomů, kořenů i rozkládajícího se matte posidonie Neptunovy. Objevili celkem 88 různých kmenů hub, z toho 14 v kořenech. Naproti tomu Torta a kol. v roce 2014 detekovali jediný druh endofytické houby v kořenech posidonie, a to *Lulwoana* sp. z řádu Lulworthiales. Dosud nebyla provedena žádná studie týkající se endofytní houbové kolonizace mořské trávy *Cymodocea nodosa*.

Přítomnost DSE v kořenech vodních rostlin byla poprvé zjištěna ve vzorcích z kořenů rostlin z jihozápadní Číny (Kai a Zhiwei, 2006) a byla potvrzena dalšími nálezy (Šraj-Kržič a kol., 2006; Kohout a kol., 2012). První doklad o výskytu DSE v kořenech rostlin z mořského dna jsme poskytli v článku Vohník a kol. (2015a). O této symbióze pojednává i má diplomová práce. Naším cílem bylo zmapovat areál rozšíření specifické houbové symbiózy posidonie Neptunovy a DSE z jejích kořenů. Dále jsme chtěli odhalit druhovou příslušnost této houby a zjistit, zda se kolonizace touto houbou mění během ontogeneze, popř. s měnícími se podmínkami. Prozkoumali jsme kořeny mořské trávy *Cymodocea nodosa*, která se nezdá vyskytuje na stejné lokalitě jako posidonie Neptunova, a porovnali jsme houbovou endofytní kolonizaci obou druhů mořských trav.



## 3. Materiály a metody

### 3.1 Sběr vzorků

#### 3.1.1 Lokalizace porostů mořských trav

Sběr kořenů posidonie Neptunovy ve Středozemním moři proběhl podél pobřeží v oblasti od jihovýchodního Španělska přes Francii, Itálii a Chorvatsko po Černou Horu a Albánii. Další odběry jsme provedli v severním Maroku, na Korsice a v Izraeli. Seznam lokalit je uveden v Příloze 1. V případě, že se na lokalitě vyskytovala i *Cymodocea nodosa*, jsme provedli rovněž její odběr. Lokality výskytu mořských trav byly určeny podle odborné literatury. Dále jsme využili satelitních snímků mořského pobřeží dostupných na internetu. Přesné umístění porostů mořských trav bylo provedeno na jednotlivých lokalitách, kde jsme sledovali přítomnost částí rostlinného těla vnesených příbojem na pobřeží.

#### 3.1.2 Odběr a zpracování vzorků

Odběry vzorků byly provedeny s využitím přístrojového potápění v hloubkách od půl metru do cca. 31 metrů. Na několika mělčích lokalitách jsme k získání rostlinného materiálu využili freedivingu. Kořeny byly získány ručním odebráním kořenů ze substrátu, popřípadě s využitím potápěčského nože, se snahou o minimální poškození okolních jedinců. Na každé lokalitě jsme odebrali vzorky z alespoň 5 různých rostlin získaných z oddělených porostů posidonie. Sbírali jsme kořeny ze starších a již degradujících i z mladších jedinců.

Části kořenů jsme oddělili od rhizomů a vložili do 50ml epruvet naplněných mořskou vodou. Vzorky byly vneseny na břeh a mořská voda byla okamžitě nahrazena přibližně 30% ethanolem. Po převozu do laboratoře byly vzorky uloženy do chladničky při teplotě cca. 8 stupňů Celsia. V průběhu uskladnění byl ethanol pravidelně nejméně jednou za rok v vyměněn. Fragmenty kořenů z každé lokality byly kvůli prevenci degradace povrchově sterilizovány, vysušeny a zmrazeny.

### 3.2 Mikroskopie

#### 3.2.1 Optická mikroskopie

Vzorky pro optickou mikroskopii byly připraveny ručním řezáním žiletkou v bezové duši, popřípadě na ručním mikrotomu. Ze vzniklých polotenkých řezů byly vytvořeny dočasné mikroskopické preparáty. Některé vzorky byly obarveny trypanovou modří, pro vizualizaci houbových endofytů posidonie však nebylo třeba žádného barvení, proto byla většina vzorků ponechána bez barvení. Mikroskopická pozorování byla provedena na přístroji Olympus BX60 vybaveném Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem (DIC) při zvětšení 200× a 400×. Fotografická dokumentace byla pořízena fotoaparátem Olympus DP70.

### 3.2.2 Optická mikroskopie se vzorky z mikrotomu

Vzorky kořenů určených ke zpracování na mikrotomu byly zality do parafínu. Na rotačním mikrotomu byly připraveny příčné i podélné parafínové řezy o tloušťce 8-12 μm. Tyto řezy byly umístěny na připravená podložní skla potřená tenkou vrstvou glycerolu s příměsí vaječného bílku zalitá vrstvou vody. Preparáty byly zahřáty na teplotu 58 – 60 °C, čímž se zarovnalá povrchová struktura parafínu i řezů. Postupným odpařením vody preparáty přilnuly k vrstvě glycerol-bílku. Dále byly preparáty odparafínovány toluenovou řadou a obarveny. Jako barviva byla použita trypanová modř, Fast green FCF a postupné nabarvení oběma zmíněnými barvivy. Pro kontrolu byly některé preparáty ponechány neobarvené. Následně byly preparáty uzavřeny další toluenovou řadou, zality pryskyřicí a přikryty krycím sklíčkem. Vzniklé trvalé preparáty byly pozorovány s využitím optického mikroskopu Olympus BX60.

### 3.2.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Preparáty pro skenovací elektronovou mikroskopii byly připraveny s využitím ručního řezu v bezové duši, popřípadě ručního mikrotomu. Dále byly zpracovány, pokoveny a připraveny k mikroskopování v Mikroskopické laboratoři Oddělení mykorhizních symbióz Botanického ústavu AV ČR, v. v. i. Snímky ze skenové elektronové mikroskopie byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu FEI Quanta 200 v módu Olympus ESEM při nízkých teplotách (-12°C to -3°C).

### 3.2.4 Transmisní elektronová mikroskopie

Vzorky pro transmisní mikroskopii byly zpracovány Laboratoří elektronové mikroskopie PŘF UK. Preparáty pro transmisní elektronovou mikroskopii byly zafixovány 5% glutaraldehydem v roztoku 0.1 M fosfátového bufferu (pH 7.2) a dále 2% oxidem osmičelým v roztoku 0.1M fosfátového buffer. Vzorky byly následně dehydrovány v odvodňovací ethanolové řadě, do které bylo zahrnuto působení kontrastní látky, konkrétně 1 % octanu uranylu. Vzorky byly

zalaty pryskyřici Spurr, za účelem zvýšení infiltrace médiem bylo využito propylenoxidové řady. Následně byly připraveny ultratenké vzorky o tloušťce 70 nm. Jako kontrastní činidla byly použity octan uranylu a citrát olova. Snímky byly pořízeny na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL 1011 s využitím digitálního TEM fotoaparátu (Veleta, Olympus).

### 3.3 Pěstování semenáčků posidonie Neptunovy in vitro

Pro kultivační experiment byly připraveny Erlenmeyerovy baňky naplněné mořskou vodou, jejichž dno bylo pokryto písčito-oblázkovým substrátem získaným z mořského dna. Několik desítek semenáčků nalezených na lokalitě „Budva cliff“ v Černé Hoře bylo pečlivě vytaženo ze substrátu a vsazeno do přiravených baněk. Ty byly následně převezeny do laboratoře a umístěny v kultivační komoře.

K založení tkáňových kultur jsme použili makromeristémy z několika vybraných semenáčků z kultivačního experimentu. Právě u makromeristémů byla u této rostliny zaznamenána nejvyšší úspěšnost kultivace (Loquès et al., 1990). Všechny makromeristémy byly povrchově sterilizovány nejprve v 75% roztoku ethanolu ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) po dobu 10 minut, a poté ve výluhu hypochloridu vápenatého  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ , vytvořeném louhováním v poměru odpovídajícím 70 gramům hypochloridu na 1 litr vody po dobu 20 minut.

Pro pokus o kultivaci tkáňových *in vitro* kultur posidonie Neptunovy jsme použili LS médium (Linsmaie a Skoog 1965) obohacené o mořskou sůl. Složení média viz. příloha 1. Do každé Erlenmeyerovy baňky s tímto médiem jsem ve flowboxu vložil 1 vzorek a baňky poté sterilně přenesl do kultivační komory se stálou teplotou 25° Celsia při osvětlení 16 hodin denně.

### 3.4 Izolace endofytických hub na kultivačním médiu

Pro pokus o izolaci hub jsme si připravili agarové kultivační médium s bramborovým škrobem (PDA; HiMedia Pvt. Ltd., Indie). Na jeden litr vody jsme při přípravě použili 39g agarové PDA směsi. Z důvodu zachování osmotického potenciálu pro organismy z mořského prostředí jsme do média přimísili mořskou sůl v koncentraci 3,7 g na litr směsi. Do média jsme přidali malé množství (50 mg/l) antibiotika Novobiocinu.

K pokusu o izolaci hub z kořenů mořských trav jsme použili vzorky ze středního Chorvatska. Kořeny posidonie Neptunovy byly nasbírány na 9 lokalitách v okolí Pakoštane. Na dvou z těchto lokalit se kromě posidonie vyskytovala i *Cymodocea nodosa*. Vzorky kořenů byly uloženy do 50ml epruvet a přeneseny na břeh. V přenosném flowboxu byly kořeny nařezány

na cca. půlcentimetrové úseky, které byly následně povrchově sterilizovány 10% roztokem univerzálního dezinfekčního prostředku SAVO. Následně byly vzorky dvakrát opláchnuty demineralizovanou vodou, aby byly kompletně zbaveny SAVA. Vzorky pak byly umístěny do připravených Petriho misek dělených na čtvrtiny s námi připraveným médiem. Z každé lokality odběru posidonie jsme použili 10 Petriho misek, pouze z lokality Mali Ošljak jsme z důvodu nedostatku materiálu využili pouze 4 misky. Vzorky Cymodocey z obou lokalit byly umístěny do 5 Petriho misek dělených na čtvrtiny. Misky byly zajištěny proti kontaminaci s využitím parafínového filmu.

Po převezení do laboratoře byly Petriho misky se vzorky přeneseny do místnosti s nižším osvětlením a stálou pokojovou teplotou. Pravidelně byly kontrolovány a případné kontaminace byly neprodleně odstraněny. Vzhledem k pomalému nárůstu kultur hub jsme vyhodnotili morfotypy a jejich četnosti až po necelých 7 měsících od založení pokusu. Z každého morfotypu jsme izolovali DNA a provedli sekvenaci.

### 3.5.1 Sekvenace DNA

DNA jsme extrahovali s využitím extrakčního kitu, který je součástí produktu Extract-N-Amp Plant Kits (Sigma-Aldrich, Německo). Pro izolaci DNA z kultur získaných kultivací na agarovém médiu jsme amplifikovali DNA s využitím multi mixu ze stejného produktu. Amplifikovali jsme úsek ITS1-5.8S-ITS2 ribozomální DNA, s využitím primerového páru ITS1F + ITS4. Parametry PCR byly nastaveny následovně: 4 minuty denaturace při teplotě 94°C, dále 35 následujících cyklů: denaturace při 94°C po dobu 30 sekund, nasednutí DNA při 55°C po dobu 30 sekund a syntéza DNA při 72°C po dobu 70 sekund. Závěrečná fáze syntézy proběhla při 72°C po dobu 10 minut. Purifikace vzorků a sekvenace byla provedena firmou Macrogen Europe Laboratory (Macrogen Inc., Nizozemsko/Jižní Korea).

Pro identifikaci sekvencí jsme využili aplikaci BLAST v databázi GeneBank.

### 3.5.2 Sekvenace DNA z produktů mikrodisekce

S využitím optické mikroskopie byly vybrány kořeny bohatě kolonizované houbovým endofytem. Z těchto kořenů byly připraveny polotenkové příčné řezy, které byly následně umístěny na mikrodisekční membrány. Z vrstvy primární kůry byly s využitím laserového mikrodisekčního systému LMD6000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo) vyříznuty fragmenty o velikosti několika buněk, které obsahovaly houbové endofyty. Tyto fragmenty byly po provedení mikrodisekce shromážděny v eppendorfkách, ve kterých byly

převezeny do laboratoře. Následně byla provedena extrakce DNA. K amplifikaci rDNA z produktů mikrodisekce jsme využili extrakční kit popsany v odstavci 3.5. Při amplifikaci jsme však použili PPP Master Mix (Top-Bio, Česká republika). Následně jsme provedli nejen standardní PCR, jak je uvedeno výše, ale také nested PCR, přičemž prvním primerovým párem byly specifické primery pro pleosporální houbu, které pro nás připravil Mgr. Miroslav Kolařík, PhD. Druhá PCR proběhla s využitím primerového páru ITS1 a ITS4. U páru specifických primerů jsme upravili fázi nasedání DNA zvýšením teploty na 57,5°C. Ostatní parametry zůstaly zachovány.

### 3.6 Měření kolonizace v závislosti na hloubce a průměru kořenů

#### 3.6.1 Odběr vzorků

Vzorky pro zjišťování vztahu houbové kolonizace k hloubce a průměru kořenů byly získány v okolí Boraku v jižním Chorvatsku. Vzorky byly získány v souladu s povolením k odběru vydaným Ministerstvem ochrany přírody a životního prostředí Chorvatska (Klasa UP/I-612-07/13-48/48, Urbroj 517-07-1-1-1-13-2). Tato oblast byla pro náš výzkum vybrána, protože posidonie Neptunova zde vytváří kontinuální porost v hloubce od 7 do cca. 31 metrů. Odběry byly provedeny na třech lokalitách v hloubkách 7, 15 a 31 metrů. Tyto hloubky byly označeny jako mělká (shallow), střední (middle) a hluboká (deep). Vzorky ze všech tří lokalit byly rozděleny na 4 třídy podle přibližného průměru kořenů: “A” – nejtenčí kořeny, které v rámci kořenové soustavy tvořily 3. řád, “B” – tenčí kořeny 2. řádu, “C” – silnější kořeny 2. řádu a “D” – nejsilnější kořeny, které příslušely ke kořenům 1. řádu. Z každé lokality bylo náhodně vybráno 10 vzorků kořenů od každé třídy průměru, celkem tedy 120 fragmentů kořenů.

#### 3.6.2 Vyhodnocení kolonizace

Z těchto fragmentů jsme připravili podélné řezy, které byly využity k přípravě dočasných mikroskopických preparátů. S využitím optické mikroskopie jsme hodnotili kolonizaci kořenů třemi výše zmíněnými houbovými strukturami, tedy plášťovými hyfami, vnitrokořenovými hyfami a mikrosklerocii. Mikroskopická pozorování byla provedena na přístroji Olympus BX60 vybaveným DIC při zvětšení 200x a 400x.

Míru kolonizace kořenů jsme určili s využitím průsečkové metody (McGonigle et al., 1990) Získané procentuální hodnoty kolonizace byly transformovány podle pořadí (rank-transformation) za účelem zvýšení normality jejich rozdělení. Abychom určili závislost kolonizace na hloubce a třídě průměru kořenů, provedli jsme dvoufaktorovou analýzu

rozptylu s vnořeným faktorem, kterým byla lokalita odběru. Statistická analýza byla provedena při využití statistického softwaru R.

### 3.7. Kořenové vlášení, korelace s houbovou kolonizací

#### 3.7.1 Lokality odběru vzorků

Semenáčky posidonie Neptunovy byly nalezeny na dvou lokalitách v blízkosti města Budva v Černé Hoře. Mladší semenáčky nasbírané v roce 2012 rostly na útesu v hloubce od 0 do 2 metrů. Tato lokalita byla opět prozkoumána v roce 2014. V témže roce jsme zaznamenali výskyt semenáčků na nedaleké lokalitě Trsteno. Kořeny dospělých rostlin určené pro toto měření byly nasbírány na lokalitách Krimovica, Sveti Stefan, Petrovac a Bar-Sutomore, které se rovněž nacházejí v Černé Hoře nedaleko města Budva. Na lokalitě Sveti Stefan rostly posidonie na dvou různých substrátech. S ohledem na možnost vlivu substrátu na námi zkoumané faktory jsme kořeny z obou substrátů uložili a nadále zkoumali odděleně.

#### 3.7.2 Evaluace hustoty vlášení a houbové kolonizace

Kořenové systémy semenáčků i dospělců byly detailně prozkoumány s využitím stereomikroskopu Olympus SZX12. Fotografická dokumentace byla pořízena s využitím fotoaparátu Olympus DP70 za využití softwaru Quick PHOTO MICRO 2.3 (Promicra Ltd., Česká republika). Z kořenů ze všech lokalit jsme náhodně vybrali 20-30 fragmentů různé tloušťky. Zaznamenávali jsme přítomnost kořenového vlášení a vyhodnocovali jeho hustotu jako počet vlásků na 1 milimetr délky kořene. Dále jsme z kořenů se známou hustotou vlášení připravili tlusté příčné řezy, ze kterých jsme vytvořili dočasné mikroskopické preparáty. Měření kolonizace proběhlo s využitím optického mikroskopu Olympus BX 60 s DIC při čtyřsetnásobném zvětšení. Kolonizace pláštěvými hyfami byla určena jako podíl povrchu kořene kolonizovaného houbou. Vnitrokořenové hyfy a mikrosklerocia byla určena jako podíl buněk svrchní vrstvy primární kůry kolonizovaných zmíněnými houbovými strukturami. Celkovou houbovou kolonizaci jsme určili jako podíl povrchu kořene, popř buněk primární kůry kolonizovaný kterýmkoli typem houbové struktury. V podstatě se jednalo o využití průsečkové metody (McGonigle et al., 1990) modifikované na měření na příčných řezech.

Z naměřených hodnot hustoty kořenového vlášení a houbové kolonizace byly stanoveny průměrné hodnoty. Vztahy výsledné hodnoty hustoty kořenového vlášení a houbové kolonizace byly zjištěny s využitím Spearmanova koeficientu pořadové korelace. S využitím neparametrického Kruskal-Wallisova testu a post-hoc testu mnohonásobného

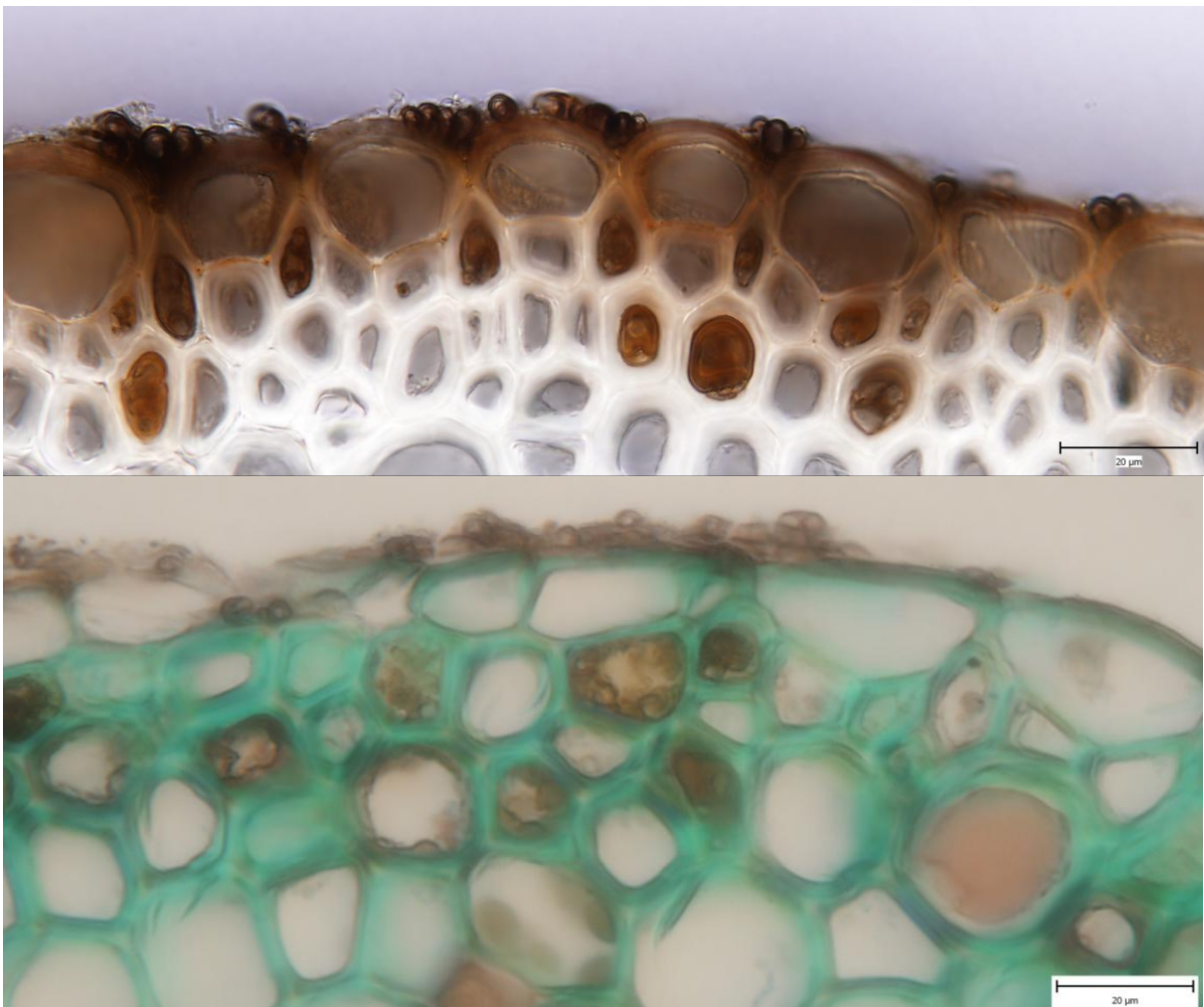
porovnávání pořadí průměrů jsme se pokusili zjistit případné signifikantní rozdíly v kolonizaci a hustotě kořenového vlášení mezi vzorky z různých hloubek a různých tříd průměru kořene. Pro analýzu dat jsme použili programy R a Statistica 12.

## 4. Výsledky

### 4.1 Charakteristika endofytické kolonizace posidonie Neptunovy a *Cymodocey nodosa*

V kořenech posidonie Neptunovy jsme pozorovali jedinou endofytní houbovou asociaci. Tato houba svou morfologií připomíná široce rozšířené endofytní symbionty vyšších rostlin známé jako dark septate endophytes (DSE). Houbové struktury byly nalezeny v kořenech posidonie Neptunovy na téměř všech lokalitách, na kterých jsme provedli odběr (Příloha 1). Naopak v kořenech druhu *Cymodocea nodosa* jsme nepozorovali žádné endofytické houby.

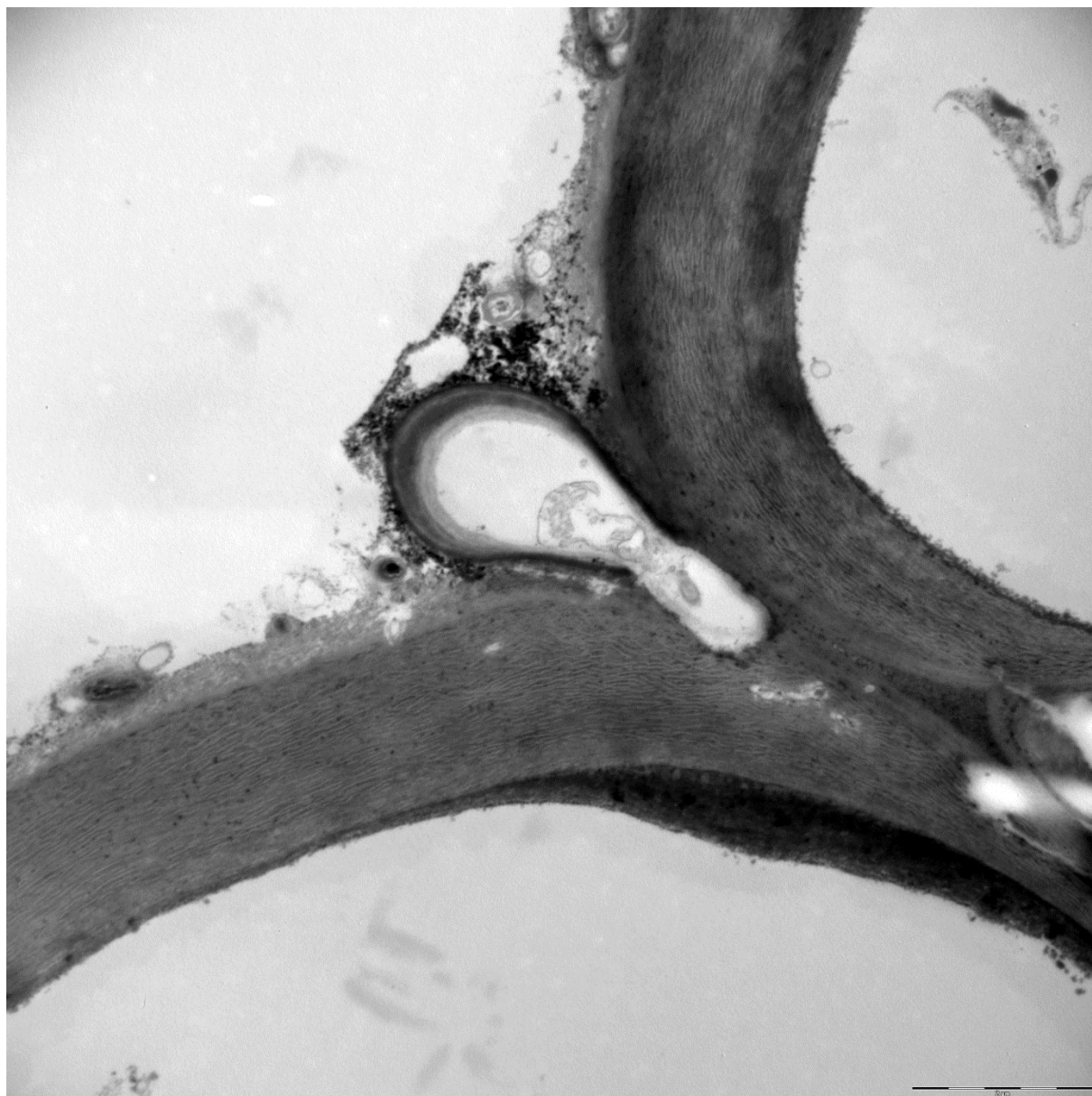
Houbový endofyt posidonie Neptunovy tvoří tři typy struktur. Povrch kořene je pokryt hyfami, které se místy sdružují a tvoří hyfový plášť.



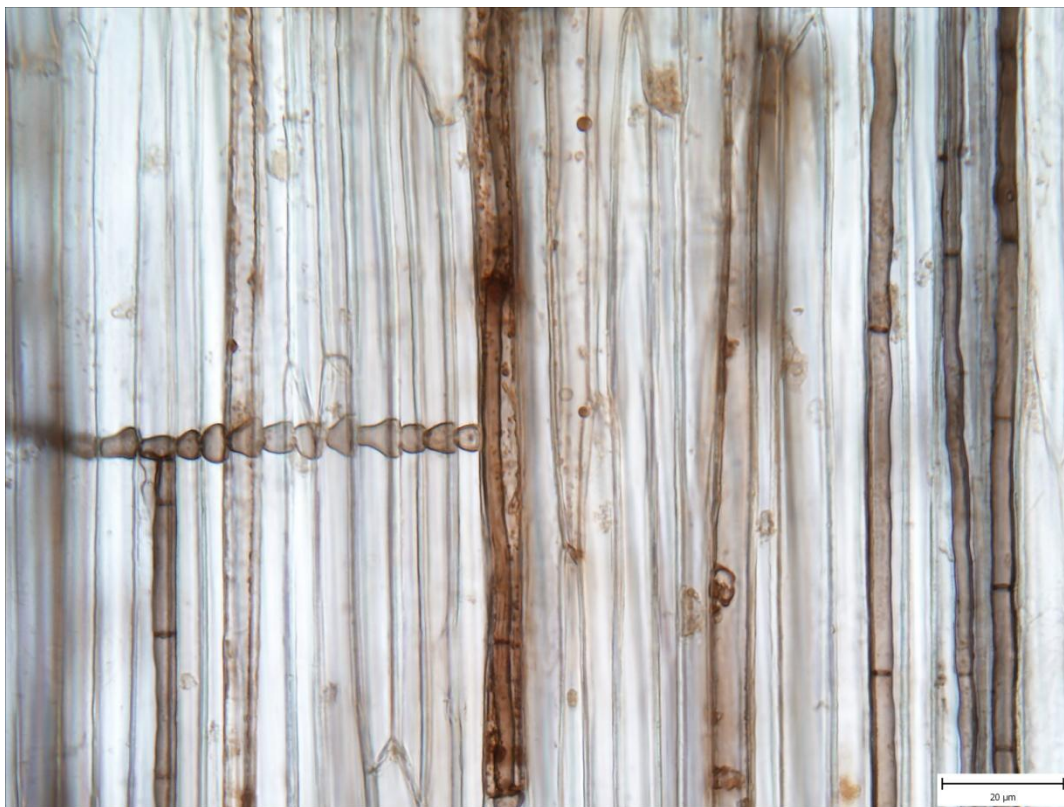
Obr. 1, 2: Povrchové hyfy tvořící plášť; vrchní fotografie je pořízena s využitím Nomarského DIC (autor M. Vohník); preparát na spodní fotografii je obarven trypanovou modří a FCF zelení (autor O. Borovec)



Buňky rhizodermis vůbec nebyly kolonizovány. Mezi jednotlivými buňkami pokožky hyfy pronikají do primární kůry.



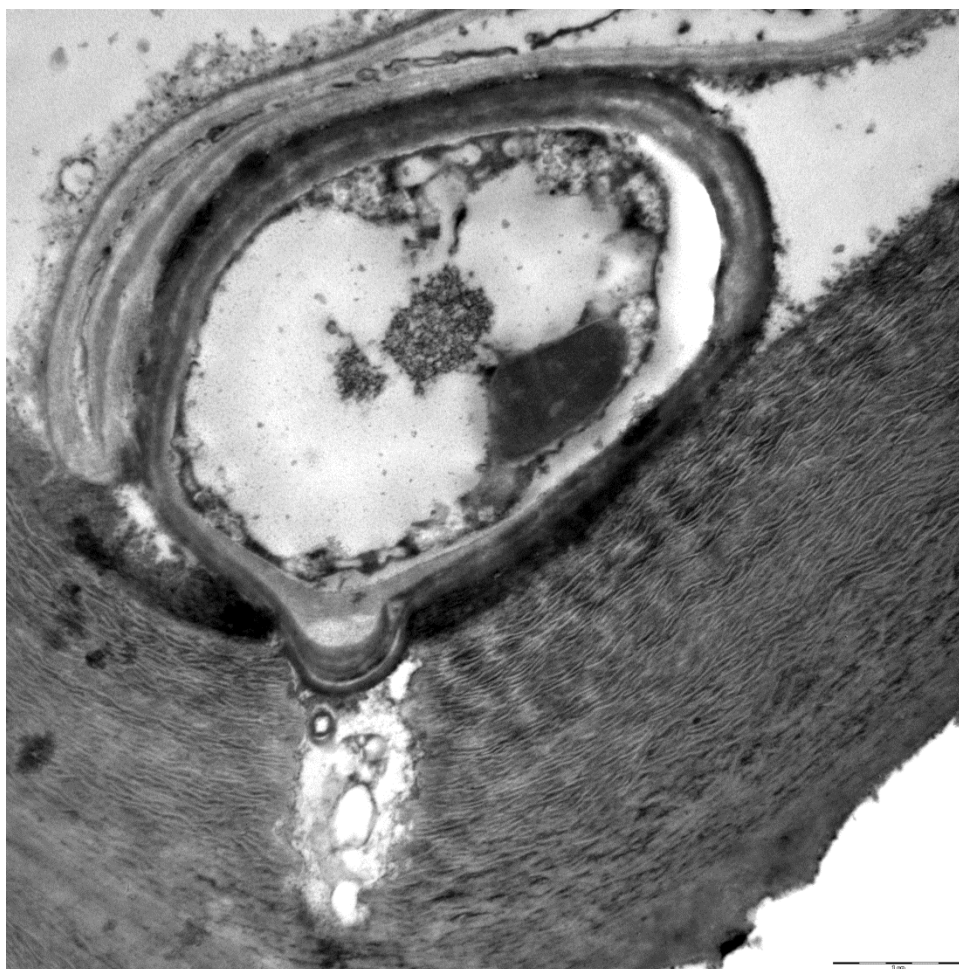
Obr. 3: Hyfa pronikající do primární kůry prostorem mezi dvěma buňkami rhizodermis (autor O. Borovec)



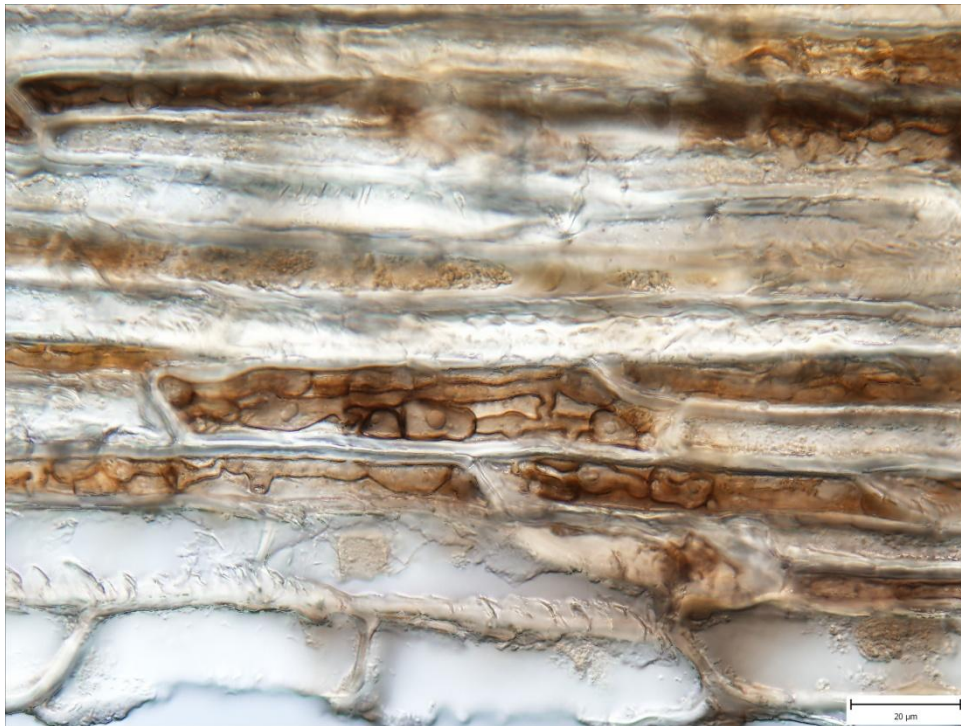
Obr. 4: U vstupu do buněk tvořily hyfy struktury připomínající aporesoria (autor M. Vohník)

Obr. 5: Lýza buněčné stěny způsobená vnitřní hyfou pleosporální houby (autor O.

Borovec)







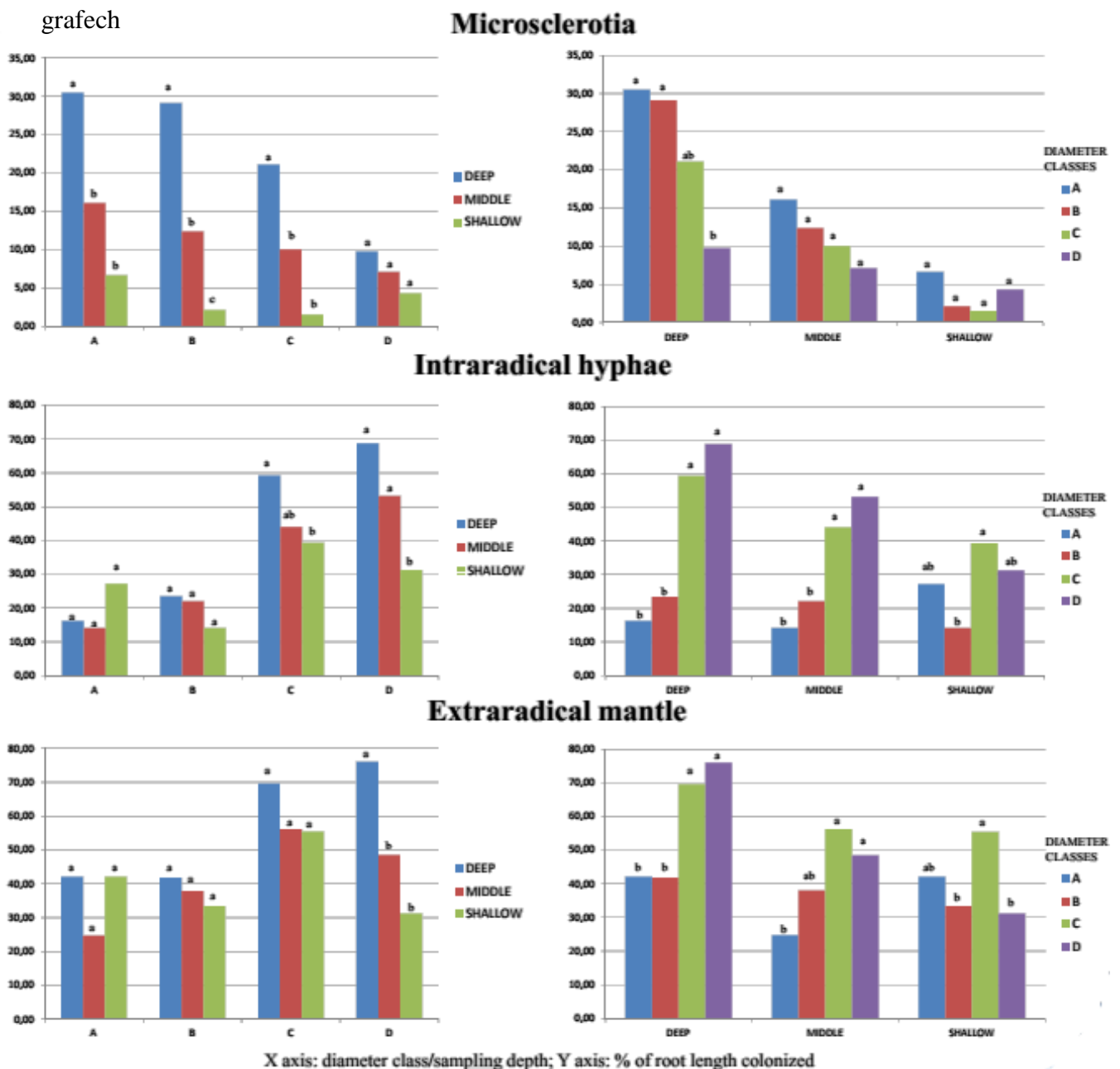
Obr. 6, 7: V buňkách primární kůry posidonie Neptunovy tvořila endofytická houba mikrosklerocia (autor O. Borovec).



## 4.2 Měření kolonizace v závislosti na hloubce a průměru kořenů

Houbová kolonizace byla přítomná ve vzorcích z každé hloubky i z kořenů všech tříd průměru. Celkově byly kořeny nejvíce kolonizovány plášťovými hyfami (46,59%), dále vnitrokořenovými hyfami (34,43%). Výskyt těchto dvou struktur spolu koreloval ( $p=0,0000$ ; korelační koeficient 0,74). Kolonizace mikrosklerocii dosahovala pouze 12,55%. Plášť a vnitrokořenové hyfy se vyskytovaly téměř ve všech vzorcích ze všech kombinací hloubky a třídy průměru kořene. Ve vzorcích z mělkého stanoviště téměř chybí kolonizace mikrosklerocii. Na kolonizaci kořenů všemi třemi typy houbových struktur mají signifikantní vliv jak hloubka, tak průměr kořenů (Příloha 2).

Výsledky hierarchické ANOVY a post-hoc Tukey testu jsou znázorněny v následujících grafech



### 4.3 Kořenové vlášení, vztah k endofytické kolonizaci

#### 4.3.1 Odběr vzorků kořenů

Semenáčky posidonie Neptunovy nasbírané v roce 2012 poblíž Budvy v Černé Hoře byly v rané fázi vývoje. Dosahovaly velikosti cca. 10-15 centimetrů. Jejich kořenová soustava byla tvořena jedním hlavním a několika adventivními kořeny, které byly jen velmi málo větvené. Kořeny druhého řádu byly dosud krátké a nevětvené. Hypokotylová oblast makromeristému byla výrazně opticky rozšířená oproti prýtu a rhizomu.

Při průzkumu lokality odběru na útesu poblíž Budvy ani v blízkém okolí v roce 2014 jsme nenalezli žádné rostliny posidonie. Podařilo se nám však objevit porost semenáčků na několik kilometrů vzdálené lokalitě u pláže Trsteno poblíž Krimovice. Zde nalezené semenáčky byly starší a vzrostlejší v porovnání se odběrem z roku 2012. Vzhledem ke vzrůstu a fázi vývoje lze předpokládat, že rostliny se zde usadily během téže disperzní události. Kořenová soustava nově objevených semenáčků byla výrazně rozsáhlejší v porovnání s rostlinami získanými při předchozím odběru. Kořeny druhého řádu byly velmi četné a vyskytly se i kořeny třetího řádu.

#### 4.3.2 Mikroskopická pozorování a hodnocení hustoty kořenového vlášení

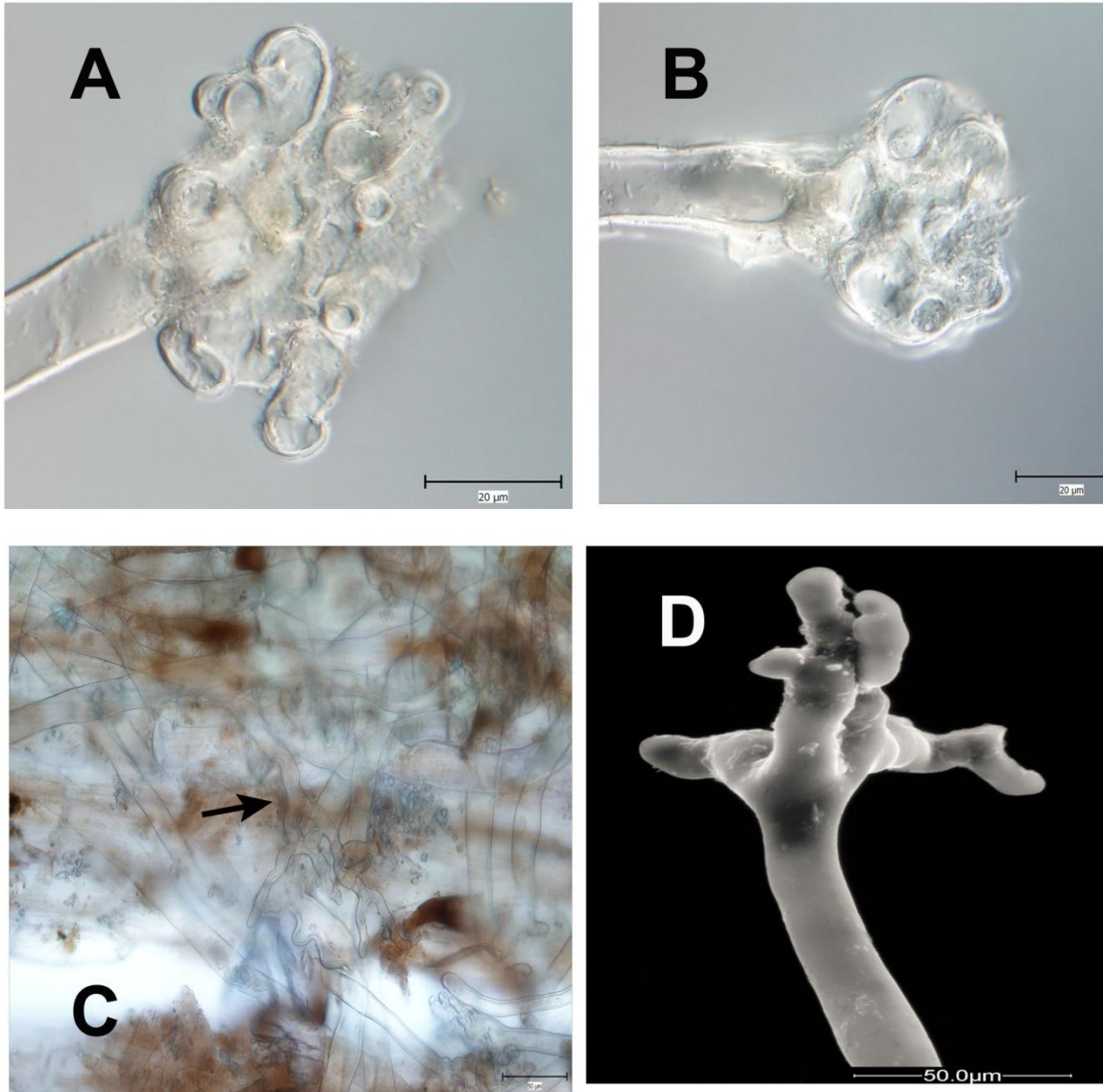
Pozorování kořenových soustav semenáčků na stereomikroskopu odhalilo rozsáhlou přítomnost kořenového vlášení. Kořenové vlášení bylo dosud u posidonie Neptunovy považováno za vzácný jev a v mnoha studiích zabývajících se kořeny posidonie vůbec nebylo pozorováno. Zjistili jsme, že u mladších semenáčků byla většina kořenů pokryta kořenovými vlásky; jen v 8 % vzorků se žádné vlášení nevyskytlo. V případě starších semenáčků byla zaznamenaný výskyt vlášení nižší. Starší kořeny, které produkovaly četné laterální kořeny, se vyznačovaly úbytkem kořenového vlášení. Průměrné hodnoty hustoty vlášení jsou uvedeny v tabulce 2. Hustota kořenového vlášení u mladších semenáčků dosahovala poměrně vysokých hodnot; v jednom případě u mladšího semenáčků jsme spočítali hodnotu 95 vlásků/milimetr. Kořeny s vlášením byly pokryty částčkami substrátu. Pozorováním kořenových vlásků při větším zvětšení a s využitím optického mikroskopu jsme zjistili, že v jejich apikální oblasti se tvoří dva typy dosud nepozorovaných struktur. Častější formou byly pohárkovité struktury, jejichž prostřednictvím ke kořenovým vláskům drobné částčky substrátu přilnuly (Obr. 8). Vazba mezi kořenem a substrátem je velmi pevná; experimentálním oddělováním tahem jsme zjistili, že se spíše oddělí vlasek na bázi u kořene, ale částčka substrátu zůstane přilnutá. Druhým zaznamenaným typem apikální struktury byly

rozvětvené prstovité útvary. Ty se však vyskytovaly méně často. V případě dospělých kořenů jsme výskyt kořenového vlášení pozorovali pouze na jedné lokalitě, a to Sveti Stefan. Ve vzorcích z písčitého substrátu bylo pozorováno jen velmi málo vlásků, výrazně vyšší výskyt byl zaznamenán na kořenech z jílovitého substrátu (Tab. 2).



Obr. 8: Kořen posidonie Neptunovy s kořenovým vlášením. Prostřednictvím apikálních pohárkovitých struktur kořenové vlášení přilnulo k částicám substrátu (autoři O. Borovec, M. Bulínová)





Obr. 9: Apikální struktury kořenového vlášení; A, B - pohárkovité struktury; C, D - rozvětvené prstovité útvary (autoři M. Vohník, M. Bulínová)

### 4.3.3 Mikroskopická pozorování a hodnocení kolonizace endofytické houby

Následně jsme určovali kolonizaci kořenů houbovými endofyty. Ve vzorcích z mladších semenáčků jsme nepozorovali přítomnost žádných hub. Kořeny dospělých rostlin i starších semenáčků však byly kolonizovány pro posidonii Neptunovu typickým houbovým endofytem. Některé kořeny získané ze starších semenáčků a dospělých rostlin z písčitého substrátu vykazovaly i vysokou kolonizaci přes 50 %. Výrazně méně houbových struktur se však vyskytovalo v kořenech z jílovitého substrátu – 63 % námi prověřených vzorků kořenů nebylo vůbec kolonizováno, zatímco v případě kořenů z písčitého substrátu postrádalo přítomnost endofytických hub pouze 11 % vzorků kořenů. Průměrnou kolonizaci kořenů jsme zaznamenali do tabulky 2.

### 4.3.4 Statistické analýzy

Analýzou získaných údajů jsme odhalili, že míra kolonizace houbovým symbiontem a hustota kořenového vlášení u jednotlivých kořenů jsou spolu signifikantně negativně korelovány. Při hodnotě  $p = 3,47 * 10^{-7}$  dosáhl Spearmanův korelační koeficient hodnoty - 0,3898698.

U hustoty kořenového vlášení a houbové kolonizace jsme testovali homogenitu rozptylu s využitím Levenova testu. Protože předpoklad homogenity rozptylu nebyl dodržen, provedli jsme neparametrický Kruskal-Wallisův s následným testem mnohonásobného porovnávání pořadí průměrů (Tab. 2).

vzorek	root hair density (počet/mm)	houbová kolonizace ± standardní chyba střední hodnoty			
		kolonizace (podíl 1)	plášť (podíl 1)	vnitrokořenové hyfy (podíl 1)	mikrosklerocia (podíl 1)
mladší semenáčky; n=20	31.4 ± 5.64 a	0.00 b	0.00 a	0.00 a	0.00 a
starší semenáčky; n=20	14.15 ± 3.775 a,b	0.29 ± 0.062 a	0.27 ± 0.054 b	0.06 ± 0.032 a	0.02 ± 0.013 a
dospělci z jílu; n=30	6.6 ± 2.617 b,c	0.10 ± 0.035 b	0.05 ± 0.019 a	0.05 ± 0.025 a	0.03 ± 0.023 a,b
dospělci z písku; n=90	0.93 ± 0.386 c	0.26 ± 0.024 b	0.22 ± 0.023 b	0.05 ± 0.008 b	0.04 ± 0.010 b

Tabulka 2: Průměr hustoty kořenového vlášení (počet/mm) a houbové kolonizace (podíl 1) kořenů z různých ontogenetických stadií vývoje posidonie Neptunovy; údaje z dospělých rostlin byly rozděleny podle typu substrátu



#### 4.4 Kultivace posidonii in vitro

Semenáčky posidonie Neptunovy v růstové komoře přežívaly několik týdnů (Obr. 10). Nejevily však známky růstu a postupně hynuly. Pokus o využití makromeristému semenáčků k založení in vitro kultur se nezdařil. Fragmenty posidonii usmístěné na kultivačním médiu nejevily žádné známky nárůstu axenických kultur, a to ani po více než měsíc trvající kultivaci.

Obr. 10: Semenáček posidonie Neptunovy v Erlenmeyerově baňce  
(autor M. Vohník)



#### 4.5 Izolace endofytických hub z kořenů mořských trav

Na kultivačním médiu se nám úspěšně podařilo vypěstovat kolonie houbových endofytů. Tyto endofyty rostli velmi pomalu. Po jednom měsíci kultivace kolonie teprve začínaly růst, po dvou měsících dosahovaly jejich rozměry pouze několika milimetrů a ani po více než roce nepřesáhly rozměry většiny z nich 2 centimetry.

Určili jsme celkem 10 různých morfotypů kolonií hub izolovaných z posidonie Neptunovy a další 4 morfotypy z izolátů získaných z *C. nodosa*. Kolonie získané z kořenů posidonie bylo možné rozdělit na 2 skupiny – černé struktury nádorovitěho vzhledu, někdy obklopené tmavými hyfami a v případě starších a vyvinutějších kultur také pokryté stříbřitými hyfami (Obr. 9), a poněkud rychleji rostoucí bělavé vláknité hyfální struktury s bílými kompaktními útvary ve starších částech kultury. Sekvenací jednotlivých vzorků ze všech morfotypů jsme zjistili, že s výjimkou několika kontaminací kožními parazitickými houbami veškeré izoláty příslušely ke dvěma druhům. Toto rozdělení odpovídalo dvěma barevně odlišeným skupinám izolátů. Všechny černé kultury náležely k dosud nepopsanému druhu vřeckovýtrusé houby z čeledi Aigialaceae, řádu Pleosporales.



Obr. 11: Kultury pleosporální houby na mateřském kořeni (autor M. Vohník)

S využitím funkce Blast v databázi GenBank jsme zjistili, že sekvence této houby odpovídají sekvencím získaným z houbových endofytů kořenů posidonie Neptunovy námi popsáných v článku Vohník a kol. (2015). V databázi GenBank jsou sekvence původně popsáných endofytů uloženy následovně (vybrané záznamy):

**Pleosporales sp. MV-2012** isolate P08 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

**Pleosporales sp. MV-2012** isolate P09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

**Pleosporales sp. MV-2012** isolate P10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

**Pleosporales sp. MV-2012** isolate P11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sekvence ze světlých kultur odpovídaly sekvencím druhu “Lulworthiales sp.” popsaným v téže publikaci. V databázi GenBank jsou sekvence této houby uloženy pod těmito označeními (vybrané záznamy):

**Lulworthiales sp. MV-2012** isolate P12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

**Lulworthiales sp. MV-2012** isolate P13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

**Lulworthiales sp. MV-2012** isolate P21 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Ve vzorcích z kořenů *Cymodocea nodosa* z lokality Gangaro se nám podařilo získat sekvence oomycety *Phytophthora polymorphica* (dříve *Halophytophthora polymorphica*). Tento “houbám podobný organismus” je mořským příbuzným známých parazitů rostlin z rodu *Phytophthora*.

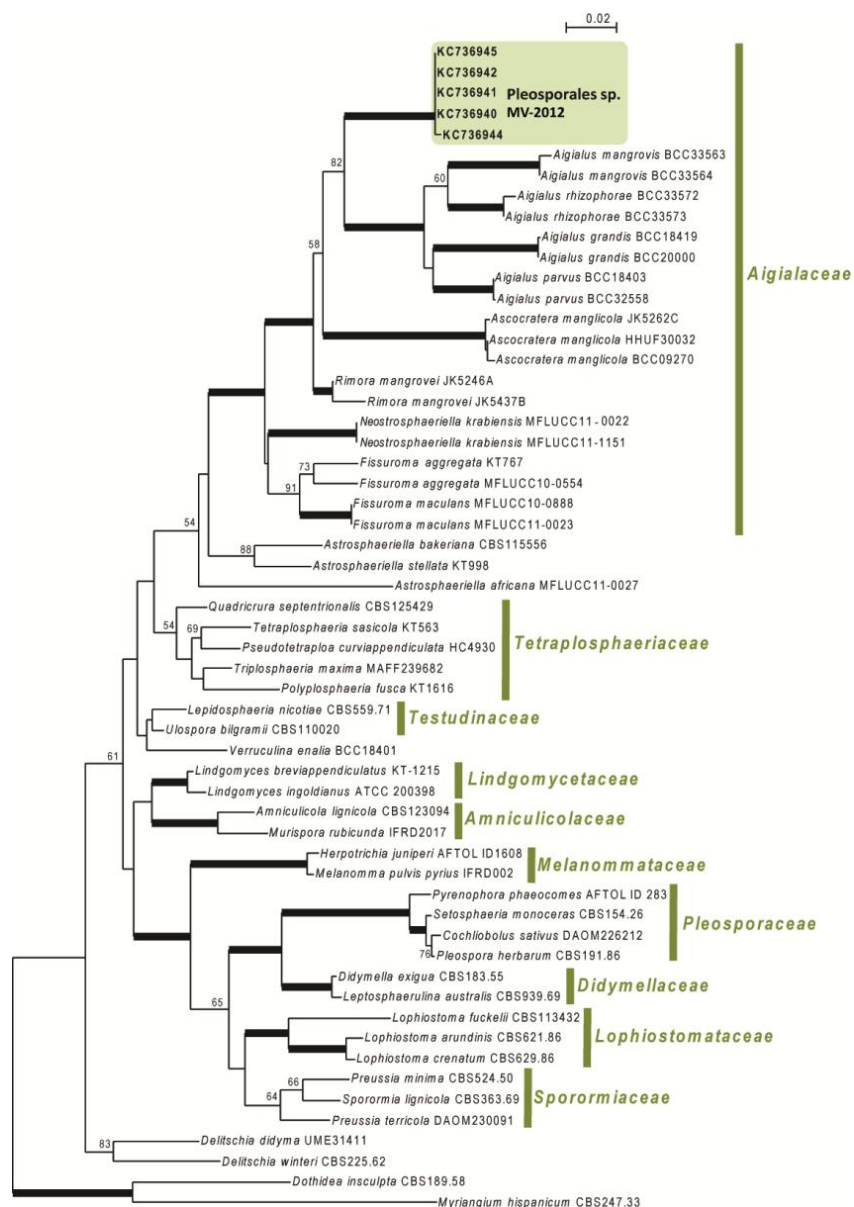
lokality	rod mořské trávy	počet izolátů	datum odběru
Gangaro	<i>Cymodocea</i>	7 světlých*	3/9/2012
Gangaro	posidonie	45 černých	3/9/2012
Gangaro střed	posidonie	32 černých + 5 světlých	7/9/2012
Košara	posidonie	56 černých + 4 světlých	5/9/2012
Košara Maják	posidonie	44 černých	6/9/2012
Kukuljari	posidonie	91 černých + 3 světlých	2/9/2012
Mali Ošljak	posidonie	5 černých + 4 světlých	2/9/2012
Veli Ošljak	<i>Cymodocea</i>	14 světlých	3/9/2012
Veli Ošljak	posidonie	49 černých	3/9/2012
Obun	posidonie	41 černých + 15 světlých	7/9/2012

Veli Babuljaši	posidonie	36 černých + 9 světlých	5/9/2012
----------------	-----------	-------------------------	----------

\* (*Halo*)*phytophthora polymorphica*

Při jiném izolačním experimentu jsme z kořene posidonie Neptunovy izolovali houbu *Fuscoporia torulosa*, ovšem v počtu jednoho jediného izolátu. Jiné houby jsme v kořenech posidonie Neptunovy nedetekovali. Popsaná pleosporální houba tvoří silně podporovanou vývojovou větev v rámci čeledi Aigialaceae (Obr). Na sestavování kladogramu jsem se nepodílel, přikládám jen pro doplnění informací. Metodu, která vedla k jeho vypracování, lze nalézt v článku Vohník a kol., 2015.

Obr. : Kladogram zkombinovaných sekvencí SSU (894 bp) a LSU (919 bp) rDNA pleosporální houby (*Pleosporales* sp. MV-2014, černý morfotyp) z kořenu posidonie Neptunovy (v rámečku). Silné čáry značí 100% bootstrapové hodnoty. Detaily v článku Vohník a kol., 2015b.



#### 4.6 Mikrodisekce

S využitím mikrodisekce jsme získali fragmenty příčného řezu kořene posidonie Neptunovy o rozměru několika buněk primární kůry, které obsahovaly endofytní houby. S takto získanými vzorky byla následně provedena extrakce DNA, amplifikace a sekvenace. Ve všech případech (několik desítek) příslušely pozorované struktury v primární kůře a na povrchu námi popisovanému druhu “*Pleosporales* sp.” z čeledi *Aigialaceae*, což jsme si posléze ověřili i použitím primeru specifického pro tuto houbu při amplifikaci vzorků z mikrodisekce.

## 5. Diskuze

Na většině lokalit jsme našli rozsáhlé porosty posidonie. S výjimkou lokalit v jižním Španělsku byly rostliny povětšinou zdravé a prosperující. Zdá se tedy, že posidonie nejsou vystaveny úbytku populace v celé oblasti Středomoří, což potvrzuje údaje z některých předchozích výzkumů (González-Correa a kol., 2007). V některých oblastech však k úbytku zcela jistě dochází; v Izraeli ani Maroku jsme nezaznamenali přítomnost posidoní, ačkoli se zde tyto mořské trávy dříve určitě vyskytovaly.

Kořeny mořské trávy posidonie Neptunovy hostí několik druhů endofytických hub. Co do četnosti a rozšíření jednoznačně dominuje jediný druh, dosud nepopsaná vřekovýtrusá houba z čeledi Aigialaceae. Do této čeledi se řadí rovněž několik lignikolních druhů mořských hub, takže se zjevně dokáží na mořské prostředí adaptovat. V rozsáhlé oblasti pobřeží Středozemního moře od jižního Španělska po Albánii tvoří posidonie s houbovým symbiontem specifickou asociaci s charakteristickými houbovými strukturami. Zatímco v kořenech posidonie dosahuje pleosporální endofyt poměrně vysokých hodnot kolonizace, v kořenech mořské trávy *Cymodocea nodosa* se vůbec nevyskytuje. Tato situace je v porovnání s terestrickými ekosystémy velmi neobvyklá; každá rostlina zde zpravidla asociuje s několika druhy až několika desítkami druhů hub. Právě tak i endofytické druhy hub většinou nekolonizují jen jediný druh rostliny, pokud se v okolí vyskytují příbuzné druhy (Rodriguez a kol., 2009).

Námi objevený druh houby tvoří tři hlavní druhy struktur. Pláštěvé i vnitřkořenné hyfy kolonizovaly některé kořeny velmi hustě, až po stoprocentní míru kolonizace. Přesto nebyly takové kořeny nijak zjevně oslabeny v porovnání s kořeny jedinců s nižší houbovou kolonizací. Houbový endofyt vstupoval do kořenů posidoní mezibuněčnými prostory, nenarušoval povrch rhizodermis. Uvnitř kořene pak endofyty nepronikaly do buněk primární kůry hostitelské rostliny ve velkých počtech, ale zpravidla jen jednou či dvěma hyfami. Spolu s vysokou specificitou houbového endofyta tato fakta vedou k přesvědčení, že se nejedná o parazitickou houbu, alespoň v běžné interakci ne.

S rostoucí hloubkou se výrazně snižuje biomasa posidonie Neptunovy (Olesen a kol., 2002). Předpokládali jsme, že v případě mutualistické asociace mezi houbou a hostitelem bude s poklesem biomasy hostitele klesat i nabídka živin pro houbu, tudíž bude s rostoucí hloubkou klesat kolonizace. Tyto předpoklady se však nenaplnily - podle našich dat se s přibývajícím hloubkou zvyšuje míra kolonizace posidonie. V rámci symbiózy jsme

nepozorovali typické struktury, kde u mykorhiz dochází k interakci mezi mykobiontem a hostitelem, jako jsou arbuskuly nebo Hartigova síť (Gryndler, 2004). Lze předpokládat, že se v tomto případě jedná o endofytickou houbu sensu stricto, tj. interagující s hostitelem převážně neutralisticky. Tomuto předpokladu patrně odpovídá i náš poznatek, že s rostoucím průměrem kořene, tedy zpravidla s rostoucím stářím, ubývají hyfy a naopak přibývají mikrosklerocia. Právě hyfy mohou potenciálně vytvářet interagující struktury, naopak mikrosklerocium je klidové a zásobní stadium, které obvykle přímo neinteraguje s hostitelem (Vohník a Albrechtová, 2011)

Cuomo a kol. (1985) i Torta a kol. (2014) detekovali v kořenech posidonie Neptunovy vždy jen po jednom druhu endofytické houby. Druh zjištěný Cuomem a kol., *Corollospora maritima*, v našich vzorcích přítomen nebyl. *Lulwoana* objevená Tortou a kol. měla velmi podobnou sekvenci jako námi objevený druh *Lulworthiales* sp. I Cuomovi se podařilo detekovat houbu z řádu *Lulworthiales*, a to druhu *Lulworthia* sp. Vyskytovala se však ve zbytcích listů, nikoli v kořenech,

Sekvence druhu *Fuscoporia torulosa*, zjištěná jednou jedinkrát, je nejspíše kontaminací, protože rod *Fuscoporia* se řadí mezi choroše.

Náš objev je v rozporu s výsledky Panna a kol. (2013), kteří detekovali přítomnost endofytních hub v různých tkáních posidonie. V kořenech objevili 14 druhů endofytních hub. Ve velké většině se však jednalo o ubikvitní anamorfy vřeckovýtusých hub, například *Penicillium*, *Cladosporium* nebo *Acremonium*. Pouze v jednom případě zjistili přítomnost pleosporální houby, ovšem odlišné od námi objeveného DS endofytu. Takto výrazné rozdíly mohl zapříčinit odlišný způsob sterilizace vzorků – zatímco my jsme vzorky důkladně povrchově sterilizovali sterilizačním přípravkem, Pannův tým je pouze několikrát promýval sterilní vodou. Zdá se tedy pravděpodobné, že jimi detekované houby ve skutečnosti nemusí být endofytické, ale epifytické.

Kořeny vodních rostlin mají zásadní funkci při upevňování rostliny v substrátu. Vzhledem k častému a velmi výraznému pohybu v rámci vodního sloupce v příbojové zóně je přilnutí kořenů k substrátu velmi důležité zejména pro druhy rostoucí v infralitorálu (Kiswara a kol., 2009). Většina druhů mořských trav produkuje kořenové vlášení, které výrazně zvětšuje oblast kontaktu mezi substrátem a kořeny. Semena druhu *Thalassia hemprichii* tvoří vláknité struktury podobné kořenovému vlášení, které v ontogenetické fázi před růstem kořenů umožňují lepší uchycení v substrátu. Postupně jsou během vývoje produkovány kořeny a funkce kotvícího aparátu přechází na pravé kořenové vlášení (Soong a kol., 2013).

Mladé semenáčky posidonie Neptunovy nemají dosud vyvinut dostatečně rozsáhlý kořenový systém, který by je udržel v substrátu i na velmi exponovaných lokalitách (Piazzini a kol., 1999). Navíc jsou v porovnání se semenáčky dalších druhů mořských trav více náchylné k vlivu vlnobití a zesíleného proudění vody vzhledem k větší ploše listů. Semenáčky posidonie často nebývají na rozdíl od druhu *Cymodocea nodosa* schopné odolat náporu vln v nejmělkých vodách (Infantes a kol., 2011). Právě snížená schopnost přežití juvenilních posidonií je příčinou námi pozorovaného jevu, kdy na jedné lokalitě roste blíže břehu *Cymodocea nodosa* a ve vzdálenosti od několika metrů do desítek metrů rostou v hlubších vodách posidonie Neptunovy.

Protože podle dosavadních studií byla posidonie Neptunova známá jako rostlina, která kořenové vlášení vůbec netvoří (Nielsen a kol., 1999; Haznedaroğlu a Akarsu, 2009), nebo tvoří jen občas a velmi řídké (Kuo a McComb, 1998; Torta a kol., 2014), neuvažovalo se o možnosti vlivu vlášení na přilnutí těchto rostlin k podkladu. Naše výzkumy spolu s poznatky Badalamentiho a kol. (2015) však poukazují na existenci bohatého kořenového vlášení s unikátními apikálními pohárkovitými strukturami, které jsou schopné přilnout k zrnkům písku, popřípadě k dalším částicím substrátu, a poskytnout účinnější ukotvení. Funkce druhé námi objevené struktury, rozvětvených apikálních částí kořenového vlášení, není dosud známa. Lze však předpokládat, že poskytuje další možnost upevnění rostlin v sedimentu.

I přes existenci kořenového vlášení s adhezivními strukturami je však přežití semenáčků na exponovaných místech typu útes, kde jsme nasbírali první vzorky juvenilních rostlin, velmi nejisté a úspěšné vyklíčení a zakořenění ještě zdaleka neznamená, že se semenáčky dožijí dospělosti (Balestri a kol., 1998; Piazzini a kol., 1999; Balestri a Lardicci, 2008). Typ substrátu je klíčovým faktorem, který ovlivňuje schopnost přežití a zdárného růstu semenáčků (Soong a kol., 2013). Na námi zmíněné lokalitě se velmi pravděpodobně vyskytla silná disturbanční událost, která zapříčinila zánik dané subpopulace.

Dospělé posidonie již nerostou jednotlivě, ale v rámci hustě porostlých mořských luk. Kořeny mateřských rostlin zvyšují stabilitu substrátu a zabraňují výrazným pohybům vodního sloupce u dna. V zapojeném porostu již není třeba výrazně zvýšené adheze k substrátu, nutnost ukotvovací funkce vlášení tedy mizí. Úbytek kořenového vlášení a jeho nepřítomnost u naprosté většiny dospělých posidonií může nastávat právě z tohoto důvodu. Vegetativně vyprodukované juvenilní rostliny mají v rámci mořské louky ideální podmínky k růstu a vývoji. Matte je jedním z nejvhodnějších typů substrátu pro zakořenění a přežití vyvíjejících se posidonií.



Kořenové vlášení u většiny terestrických rostlin napomáhá při příjmu živin ze substrátu. Některé druhy mořských trav rovněž využívají kořenové vlášení ke své výživě. U tropické mořské trávy *Halophila ovalis* byly prováděny experimenty s příjmem dusíku. Při nedostatku tohoto esenciálního prvku byl zaznamenán zesílený růst a elongace kořenových vlásků. Naopak v prostředí s přebytkem dusíku byl růst kořenového vlášení do značné míry inhibován (Wilson a Bennett, 2007). Potenciální využití kořenových vlásků při výživě semenáčků posidonie Neptunovy však v raných fázích vývoje není příliš pravděpodobné. V případě pohlavního rozmnožování se posidonie šíří velkými semeny s vysokým obsahem živin, zejména škrobu. Semeno může vyvíjejícímu se semenáčku poskytovat značnou část výživy po dobu bezmála jednoho roku. (Belzunce a kol., 2008). Roli hlavního způsobu výživy postupně přebírají kořeny, ale během ontogeneze se nejdůležitějším orgánem pro výživu posidonií stávají listy (Khan a Belik, 1995). I přesto, že semenáčky, které jsme se pokoušeli pěstovat v rámci našeho experimentu, byly zjevně velmi mladé a mohly čerpat ze zbytků zásob ze semene a přesto, že nebyly vystaveny disturbancím, uhynuly. Zatímco Balestri a kol. (1998) zaznamenali více než 50% úspěšnost přežití semenáčků v podmínkách *in vitro*, nám se nepodařilo zachránit ani jeden.

## 6. Seznam použité literatury

- Alagna, A., Fernández, T.V., Terlizzi, A., Badalamenti, F., 2013. Influence of microhabitat on seedling survival and growth of the mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Estuar Coast Shelf S* 119, 119-125.
- Andersen, F.Ø., Andersen, T., 2006. Effects of arbuscular mycorrhizae on biomass and nutrients in the aquatic plant *Littorella uniflora*. *Freshwater Biol.* 51, 1623-1633.
- Apostolaki, E.T., Holmer, M., Marbà, N., Karakassis, I., 2010. Degrading seagrass (*Posidonia oceanica*) ecosystems: A source of dissolved matter in the Mediterranean. *Hydrobiologia* 649(1), 13-23.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C.M., Diaz-Almela, E., Marbà, N., Sintes, T., Serrão, E.A., 2012. Implications of Extreme Life Span in Clonal Organisms: Millenary Clones in Meadows of the Threatened Seagrass *Posidonia oceanica*. *PLoS ONE* 7(2): e30454. doi:10.1371/journal.pone.0030454.
- Badalamenti, F., Alagna, A., Fici, S., 2015. Evidences of adaptive traits to rocky substrates undermine paradigm of habitat preference of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Scientific reports* 5.
- Balestri, E., Piazzini, L., Cinelli, F., 1998. Survival and growth of transplanted and natural seedlings of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in a damaged coastal area. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 228, 209-225.
- Balestri, E., Lardicci, C., 2008. First evidence of a massive recruitment event in *Posidonia oceanica*: Spatial variation in first-year seedling abundance on a heterogeneous substrate. *Estuar. Coast. Shelf. S.* 76, 634-641.
- Beck-Nielsen, D., Madsen, T.V., 2001. Occurrence of vesicular–arbuscular mycorrhiza in aquatic macrophytes from lakes and streams. *Aquat. Bot.* 71, 141-148.
- Belzunce, M., Navarro, R.M., Rapoport, H.F., 2008. *Posidonia oceanica* seedling root structure and development. *Aquat. Bot.* 88, 203-210.
- Borg, J.A., Rowden, A.A., Attrill, M.J., Schembri, P.J., Jones, M.B., 2006. Wanted dead or alive: High diversity of macroinvertebrates associated with living and 'dead' *Posidonia oceanica* matte. *Mar. Biol.* 149, 667-677.
- Bristow, J.M., Whitcombe, M., 1971. The role of roots in the nutrition of aquatic vascular plants. *Am. J. Bot.* 58(1), 8-13.
- Brown, L.K., George, T.S., Barrett, G.E., Hubbard, S.F., White, P.J., 2013. Interactions between root hair length and arbuscular mycorrhizal colonisation in phosphorus deficient barley (*Hordeum vulgare*). *Plant soil* 372(1-2), 195-205.
- Brundrett, M., 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 Soil* 320, 37-77.
- Cuomo, V., Vanzanella, F., Fresi, E., Cinelli, F., Mazzella, L., 1985. Fungal flora of *Posidonia oceanica* and its ecological significance. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84(1), 35-40.
- Czarnota, M.A., Paul, R.N., Weston, L.A., Duke, S.O., 2003. Anatomy of sorgoleone-secreting root hairs of sorghum species. *J. Plant. Sci.* 164, 861-866.
- Ditengou, F.A., Béguiristain, T., Lapeyrie, F., 2000. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Planta* 211(5), 722-728.

- Duarte, C.M., Chiscano, C.L., 1999. Seagrass biomass and production: a reassessment. *Aquat. Bot.* 65(1), 159-174.
- García-Martínez, M., Kuo, J., Kilminster, K., Walker, D., Rosselló-Mora, R., Duarte, C.M., 2005. Microbial colonization in the seagrass *Posidonia* spp. roots. *Mar. Biol. Res.* 1, 388-395.
- Garcias-Bonet, N., Arrieta, J.M., de Santana, C.N., Duarte, C.M., Marbà, N., 2012. Endophytic bacterial community of a Mediterranean marine angiosperm (*Posidonia oceanica*). *Front. Microbiol.* 3: 342.
- Gilroy, S., Jones, D.L., 2000. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci.* 5(2), 56-60.
- Green, E.P., Short, F.T., 2003. World atlas of seagrasses. Univ of California Press.
- Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J. a Vosátka M., 2004. Mykorhizní symbióza. O soužití hub s kořeny rostlin. Academia, Praha.
- Haznedaroğlu, M.Z., Akarsu, F., 2009. Anatomical features of *Posidonia oceanica* (L.) Delile growing in Turkey. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 29(1), 37-43
- Infantes, E., Orfila, A., Bouma, T.J., Simarro, G., Terrados, J., 2011. *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* seedling tolerance to wave exposure. *Limnol. Oceanogr.* 56(6), 2223-2232.
- Khan, A.G., Belik, M., 1995. Occurrence and ecological significance of mycorrhizal symbiosis in aquatic plants. In: Verma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer, Heidelberg, pp 627–666.
- Kiswara, W., Behnke, N., van Avesaath, P., Huiskes, A.H.L., Erfteimeijer, P.L.A., Bouma, T.J., 2009. Root architecture of six tropical seagrass species, growing in three contrasting habitats in Indonesian waters. *Aquat. Bot.* 90, 235-245.
- Kocak, F., Balduzzi, A., Benli, H.A., 2002. Epiphytic bryozoan community of *Posidonia oceanica* (L.) Delile meadow in the northern Cyprus (Eastern Mediterranean). *Indian J. Mar. Sci.* 31, 235-238.
- Kuo, J., McComb, A.J., 1998. Posidoniaceae. In *Flowering Plants: Monocotyledons* (pp. 404-408). Springer Berlin Heidelberg.
- Lepoint, G., Gobert, S., Bouquegneau, J.-M., 1999. Fauna vs flora contribution to the leaf epiphytes biomass in a *Posidonia oceanica* seagrass bed (Revellata Bay, Corsica). *Hydrobiologia* 394, 63-67.
- Lepoint, G., Millet, S., Dauby, P., Gobert, S., Bouquegneau, J.M., 2002. Annual nitrogen budget of the seagrass *Posidonia oceanica* as determined by in situ uptake experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 237, 87-96.
- Lepoint, G., Vangeluwe, D., Eisinger, M., Paster, M., van Treeck, P., Bouquegneau, J.M., Gobert, S., 2004. Nitrogen dynamics in *Posidonia oceanica* cuttings: implications for transplantation experiments. *Mar Pollut Bull.* 48(5), 465-470.
- Linderman, R.G., 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78(3), 366-371.
- Madsen, T.V., Cedergreen, N., 2002. Sources of nutrients to rooted submerged macrophytes growing in a nutrient-rich stream. *Freshwater Biol.* 47, 283–291.
- Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C., Lapeyrie, F., 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytol.* 151(1), 145-154.

- Mata, J., Cebrián, J., 2013. Fungal endophytes of the seagrasses *Halodule wrightii* and *Thalassia testudinum* in the north-central Gulf of Mexico. *Botanica marina* 56, 541-545.
- Nielsen, S.L., Thingstrup, I., Wigand, C., 1999: Apparent lack of vesicular–arbuscular mycorrhiza (VAM) in the seagrasses *Zostera marina* L. and *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Aquat. Bot.* 63, 261–266.
- Olesen, B., Enríquez, S., Duarte, C.M., Sand-Jensen, K., 2002. Depth-acclimation of photosynthesis, morphology and demography of *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* in the Spanish Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 236, 89-97.
- Panno, L., Bruno, M., Voyron, S., Anastasi, A., Gnani, G., Miserere, L., Varese, G.C., 2013. Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. *N. Biotechnol.* 30, 685-694.
- Pedersen, M.F., Borum, J., 1992. Nitrogen dynamics of eelgrass *Zostera marina* during low nutrient availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 80, 65-73.
- Peterson, R.L., Farquhar, M.L., 1996. Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. *Bot. Rev.* 62, 1–40.
- Piazzini, L., Acunto, S., Cinelli, F., 1999. In situ survival and development of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seedlings. *Aquat. Bot.* 63(2), 103-112.
- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M.M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J.B., Mercado-Blanco, J., 2011. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial Ecol.* 62(2), 435-445.
- Raven, J.A., 1981. Nutritional Strategies of Submerged Benthic Plants: The Acquisition of C, N and P by Rhizophytes and Haptophytes. *New Phytol.* 88(1), 1-30.
- Schutten, J., Dainty, J., Davy, A.J., 2005. Root anchorage and its significance for submerged plants in shallow lakes. *J. Ecol.* 93, 556-571.
- Shannon, E.L., 1953. The production of root hairs by aquatic plants. *Am. Midl. Nat.* 50, 474-479.
- Somaschini, A., Gravina, M.F., Ardizzone, G.D., 1994. Polychaete depth distribution in a *Posidonia oceanica* bed (rhizome and mat strata) and neighbouring soft and hard bottoms. *Mar Ecol*, 15(2), 133-151.
- Soong, K., Chiu, S.-T., Chen, C.-N.N., 2013. Novel Seed Adaptations of a Monocotyledon Seagrass in the Wavy Sea. *PLoS ONE* 8: e74143. doi:10.1371/journal.pone.0074143.
- Stapel, J., Aarts, T.L., van Duynhoven, B.H.M., de Groot, J.D., van den Hoogen, P.H.W., Hemminga, M.A., 1996. Nutrient uptake by leaves and roots of the seagrass *Thalassia hemprichii* in the Spermonde Archipelago, Indonesia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 134, 195-206.
- Sudová, R., Rydlová, J., Čtvrtlíková, M., Havránek, P., Adamec, L., 2011. The incidence of arbuscular mycorrhiza in two submerged *Isoetes* species. *Aquat. Bot.* 94, 183-187.
- Szmeja, J., Galka, A., 2008 Phenotypic responses to water flow and wave exposure in aquatic plants. *Acta Soc. Bot. Pol.* 77, 59-65.
- Šraj-Kržič N., Pongrac P., Klemenc M., Kladnik A., Regvar M., Gaberščik A., 2006: Mycorrhizal colonisation in plants from intermittent aquatic habitats. *Aquat. Bot.* 85, 331-336.
- Torta, L., Lo Piccolo, S., Piazza, G., Burruano, S., Colombo, P., Ottonello, D., Perrone, R., Di Maida, G., Pirrotta, M., Tomasello, A., Calvo, S., 2014. *Lulwoana* sp., a dark septate endophyte in roots of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seagrass. *Plant Biol.* 1981, 1-7, doi: 10.1111/plb.12246.

- Vance, C.P., 2008. Plants without arbuscular mycorrhizae. In *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions* (pp. 117-142). Springer Netherlands.
- Vohník, M., Borovec, O., Kolařík, M., 2015a. Communities of Cultivable Root Mycobionts of the Seagrass *Posidonia oceanica* in the Northwest Mediterranean Sea Are Dominated by a Hitherto Undescribed Pleosporalean Dark Septate Endophyte. *Microbial Ecol.*, 1-10.
- Vohník, M., Borovec, O., Župan, I., Vondrášek, D., Petrtyl, M., Sudová, R., 2015b. Anatomically and morphologically unique dark septate endophytic association in the roots of the Mediterranean endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Mycorrhiza*, DOI 10.1007/s00572-015-0642-7.
- Wais, R.J., Keating, D.H., Long, S.R., 2002. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 129(1), 211-224.
- Wilson, J., Bennett, I., 2007. Nutrient requirements of in vitro cultured *Halophila ovalis* and *Posidonia coriacea*: nitrogen source. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92, 155–163.
- Zangaro, W., Alves, R.A., Lescano, L.E., Ansanelo, A.P., Nogueira, M.A., 2012. Investment in fine roots and arbuscular mycorrhizal fungi decrease during succession in three Brazilian ecosystems. *Biotropica*, 44(2), 141-150.

## 7. Přílohy:

země	lokalita	Kolonizace kořenů	souřadnice GPS	Přítomnost <i>C. nodosa</i>
Řecko	Kalami	ano	N39.74227, E19.93443	
Řecko	Kassiopi Bay, Kerkira	ano	N39.78941, E19.91542	
Albánie	Orikum, Vlore	ano	N40.34226, E19.40898	
Albánie	Orikum, Vlore	ano	N40.35723, E19.40926	
Černá Hora	Sutomore	ano	N42.13595, E19.01549	
Černá Hora	Petrovac	ano	N42.19762, E18.93726	
Černá Hora	Sveti Stefan	ano	N42.25022, E18.89463	
Černá Hora	Krimovica	ano	N42.27985, E18.78738	
Chorvatsko	Borak, Potomje	ano	N42.92236, E17.34685	
Chorvatsko	Zlatni Rat, Bol, Brač	ano	N43.25838, E16.63897	
Chorvatsko	Rudula, Šolta	ano	N43.39362, E16.18257	
Chorvatsko	Kukuljar	ano	N43.75960, E15.63410	
Chorvatsko	Obun	ano	N43.85000, E15.45534	
Chorvatsko	Gangaro	ano	N43.86387, E15.43405	ano
Chorvatsko	Veli Babuljaš	ano	N43.87412, E15.35275	
Chorvatsko	Veli Ošljak	ano	N43.87555, E15.43755	ano
Chorvatsko	Mali Ošljak	ano	N43.87678, E15.44671	
Chorvatsko	Košara	ano	N43.88379, E15.39937	
Chorvatsko	Nevidane, Pašman	ano	N43.98368, E15.33831	
Chorvatsko	Dobropoljana, Pašman	ano	N43.98713, E15.33295	
Chorvatsko	Žman, Dugi Otok	ano	N44.00308, E15.05930	
Itálie	Bari	ano	N41.11831, E16.91180	
Itálie	Torre Santa Sabina	ano	N40.76457, E17.68552	
Itálie	Otranto	ano	N40.16812, E18.48382	
Itálie	Mirante	ano	N40.30683, E17.62017	
Itálie	Capocolonna	ano	N39.03166, E17.20267	
Itálie	Cucco-riviere	ano	N39.70369, E15.81132	
Itálie	San Felice Circeo	ano	N41.23337, E13.09573	
Itálie	Civitavecchia	ano	N42.09118, E11.79648	
Itálie	Quercianella	ano	N43.45936, E10.36818	
Itálie	Cogoleto	ano	N44.38016, E8.63467	
Itálie	Finale Ligure	ano	N44.17337, E8.36765	ano

Francie	Antibes	ano	N43.55726, E7.12209	
Francie	Cap Roux, Saint-Raphaël	ano	N43.45026, E6.91951	
Francie	Cabasson	ano	N43.09926, E6.32504	ano
Francie	Sanary-sur-Mer	ano	N43.12054, E5.77545	
Francie	Les Arnettes, Carro	ano	N43.32922, E5.03849	
Francie	Port-Vendres	ne	N42.52187, E3.12004	
Francie	Anse de Paulilles, Port-Vendres	ano	N42.50236, E3.12456	
Španělsko	L'Escala	ano	N42.10744, E3.16892	
Španělsko	Tamariu, Palafrugell	ano	N41.91756, E3.20761	
Španělsko	Llafranc	ano	N41.89343, E3.19391	
Španělsko	Platja dels Muntanyans, Torredembarra	ano	N41.14475, E1.41552	
Španělsko	Platja de Capicorb, Cap i Corb	ano	N40.20711, E0.25956	
Španělsko	Calp, Cala el Racó	ano	N38.63556, E0.07124	
Španělsko	Cabo de Palos	ano	N37.63355, W0.68996	
Španělsko	Cope, Calabardina	ano	N37.43672, W1.48422	ano
Španělsko	Villaricos	ano	N37.26676, W1.75151	ano
Španělsko	Cabo de Gata	ano	N36.72595, W2.19537	ano
Španělsko	Estepona	ano	N36.42749, W5.12923	
Korsika	Marina di Pevani	ano	N42.02594, E8.70131	
Korsika	Caspiu	ano	N42.30207, E8.66183	
Korsika	Tizzano	ano	N41.53635, E8.85544	
Korsika	Pavellone	ano	N41.60185, E9.33006	
Korsika	Santa-Lucia-di-Moriani	ano	N42.39671, E9.53528	
Korsika	Marine de Sisco	ano	N42.80921, E9.48944	

Příloha 1: Přehled lokalit odběru; v kolonce “Kolonizace kořenů” jsou uvedeny případy, kdy jsme zjistili viditelnou kolonizaci pod mikroskopem. Žádný ze vzorků *Cymodocey nodosa* nebyl viditelně kolonizován endofytickou houbou.

Mikrosklerocia	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměr čtverců	F -hodnota	p - hodnota
Hloubka	21806,62	2	10903,31	44,3193	0,000000
Třída průměru	5740,72	3	1913,57	7,7782	0,000050
Hloubka * Třída průměru	4178,96	6	696,49	2,8311	0,010627
Lokalita (Hloubka * Třída průměru)	28931,20	24	1205,47	4,8999	0,000000
Reziduální	79709,60	324	246,02		
Celkem	56700,90	1	56700,90	230,4753	0,000000

Vnitrokořenové hyfy	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměr čtverců	F -hodnota	p - hodnota
Hloubka	11863,9	2	5931,9	8,0818	0,000376
Třída průměru	80569,2	3	26856,4	36,5896	0,000000
Hloubka * Třída průměru	20406,9	6	3401,2	4,6338	0,000155
Lokalita (Hloubka * Třída průměru)	72659,1	24	3027,5	4,1247	0,000000
Reziduální	237813,0	324	734,0		
Celkem	426697,9	1	426697,9	581,3396	0,000000

Plášťové hyfy	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměr čtverců	F -hodnota	p - hodnota
Hloubka	21096,6	2	10548,3	11,4400	0,000016
Třída průměru	36277,8	3	12092,6	13,1149	0,000000
Hloubka * Třída průměru	20464,0	6	3410,7	3,6990	0,001431
Lokalita (Hloubka * Třída průměru)	48047,2	24	2002,0	2,1712	0,001446
Reziduální	298745,3	324	922,1		
Celkem	781482,0	1	781482,0	847,5453	0,000000

Příloha 2: Dvoufaktorová analýza rozptylu – závislost endofytické kolonizace posidonie Neptunovy na hloubce a třídě průměru kořene