

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Štěpán Vavřina

Rod *Neotinea* Rchb.f. v Evropě
The genus *Neotinea* Rchb.f. in Europe

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Chumová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ing. Pavel Trávníček, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

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.

V Praze, dne 22. 04. 2024

Štěpán Vavřina

Poděkování:

Děkuji vedoucí práce Zuzaně Chumové a konzultantovi Pavlu Trávníčkovi za podnětné rady při tvorbě textu a velice oceňuji jejich rychlé a ochotné reakce na všelijaké mé dotazy. Janu Ponertovi pak děkuji za poskytnutí fotografií.



Abstrakt

Práce se zabývá rodem *Neotinea* z fylogenetického, molekulárního a ekologického pohledu. Většina jeho zástupců byla dlouhodobě řazena do rodu *Orchis* a k vyčlenění došlo až s využitím molekulárních metod. V rámci Orchidoideae je *Neotinea* sesterská ke skupině rodů *Anacamptis*, *Serapias*, *Ophrys* a *Himantoglossum*. Platně popsáno je 6 druhů. Současná situace pod vlivem nových poznatků vyžaduje revizi zejména u *N. tridentata*, která obsahuje několik dobře odlišených linií a stála u zrodu tetraploidní *N. commutata*. Není též dořešený vztah mezi *N. lactea* a *N. conica*.

Velikost genomu v rámci rodu se pohybuje v rozmezí 6,48 pg u *N. maculata* do 31,14 pg u *N. lactea*. Všechny taxony kromě *N. commutata*, jejíž tetraploidní původ je diskutován, jsou diploidní ($2n = 42$). V rodě se uplatňuje parciální endoreplikace. Rozsah endoreplikované DNA je úzký nehledě na rozdíly ve velikosti genomu. Druhy preferují otevřená mírně bazická stanoviště. V mykorrhizních interakcích se jeví generalistické s preferencí pro Ceratobasidiaceae. Na úrovni reprodukčních strategií rod *Neotinea* upřednostňuje generativní množení. *N. maculata* je autogamická, ostatní druhy jsou cizospašné, potravně šálivé, s pravděpodobným podílem sexuální deceptce u *N. ustulata*.

Klíčová slova: endoreplikace, fylogeneze, mykorrhiza, *Neotinea*, opylovači, Orchidaceae, taxonomie

Abstract

The thesis deals with the genus *Neotinea* from the phylogenetic, molecular and ecologic points of view. Most of its species have been classified in the genus *Orchis* until the use of molecular methods. Within the Orchidoideae, *Neotinea* forms a sister clade to the genera *Anacamptis*, *Serapias*, *Ophrys* and *Himantoglossum*. Six species are accepted now. The current taxonomic circumscription calls for a revision under the influence of new knowledge. Especially in *N. tridentata*, which contains several well-differentiated lineages and is the ancestor of the tetraploid *N. commutata*. Also the relationship between *N. lactea* and *N. conica* remains unresolved. The genome size within the genus ranges from 6.48 pg in *N. maculata* to 31.14 pg in *N. lactea*. All species except *N. commutata*, whose tetraploid origin is debated, are diploid ($2n = 42$). Partial endoreplication is present in the genus. The range of endoreplicated DNA is relatively narrow regardless of differences in genome size. Species prefer open, slightly basic habitats. In mycorrhizal interactions they appear generalistic with a preference for Ceratobasidiaceae. At the level of reproductive strategies, the genus *Neotinea* prefers the generative mode over the vegetative one. *N. maculata* is autogamous, the other species are allogamous, food deceptive, with some degree of a sexual deception in *N. ustulata*.

Keywords: endoreplication, mycorrhiza, *Neotinea*, Orchidaceae, phylogeny, pollinators, taxonomy

Obsah

Úvod.....	1
Cíle práce	1
1 Fylogenetické postavení rodu <i>Neotinea</i> a představení jeho zástupců	2
1.1 Fylogenetické postavení rodu <i>Neotinea</i> v rámci čeledi Orchidaceae	2
1.2 Fylogeneze a taxonomie rodu <i>Neotinea</i>	3
1.2.1 <i>Neotinea maculata</i>	5
1.2.2 <i>Neotinea ustulata</i>	6
1.2.3 <i>Neotinea tridentata</i>	8
1.2.4 <i>Neotinea commutata</i>	9
1.2.5 <i>Neotinea lactea</i>	10
1.2.6 <i>Neotinea conica</i>	11
1.2.7 Hybridní taxony	12
2 Genetická informace	13
2.1 Velikost genomu, chromozomové počty a vznik tetraploidní <i>N. commutata</i>	13
2.2 Endopolyploidie	15
3 Ekologie.....	17
3.1 Ekologické nároky	17
3.2 Mykorhizní interakce	18
3.3 Reprodukční strategie	21
Závěr	24
Seznam použité literatury	26

Úvod

Hlavním centrem diverzity orchidejí (čeleď Orchidaceae) v Evropě je Středomoří. Významně sem zasahují dvě třetiny evropských rodů, kdy pro některé je Středomoří zároveň centrem druhové diverzity. Mnoho rodů však není rozšířením vázáno jen na blízké okolí Středozevního moře, ale vstupuje i dále do vnitrozemí. Jedním takovým rodem je i *Neotinea* Rchb.f., jejíž areál se rozprostírá od Madeiry na západě, přes Maroko na jihu a Ural na východě až do severního Estonska (Kühn *et al.* 2019).

Jméno *Neotinea* je složeninou řeckého výrazu „neo“, „nový“, a příjmení italského botanika Vicenza Tinea (1791–1836). Rod se do roku 1852 jmenoval pouze *Tinea*, tehdy si však H. G. Reichenbach, autor nového jména, uvědomil problém stejného latinského názvu u zástupce živočišného řádu Lepidoptera. Před příjmením botanika přidal předponu, čímž bylo jméno změněno a pocta vědci zachována (Reichenbach 1852).

Společnými morfologickými znaky rodu jsou podzemní kulovitá hlíza, přízemní růžice protáhlých listů a lodyha zakončená protáhlým klasem velmi nahloučených květů. Květy jsou resupinované (přetočené o 180°), jak je v čeledi Orchidaceae typické (Ames 1938). Skládají se z přílby (utvořené sbíháním tepalů) a na tři díly členěného pysku, který může mít střední úkrojek dále mírně členěný. Velmi častá je i skvrnitost pysku. Uprostřed květu se nachází sloupek nesoucí bliznu a brylky.

Rod byl sice popsán již v první polovině devatenáctého století, ovšem teprve na přelomu druhého tisíciletí došlo díky molekulární analýze k začlenění dalších (většiny) druhů (Bateman *et al.* 1997; Pridgeon *et al.* 1997). Nicméně i v současné době přetrvávají nejasnosti v pozici a úrovni některých taxonů.

Ačkoli *Neotinea* nepatří k velkým orchidejovým rodům, je zde přítomna značná mezidruhová variabilita a nejasné taxonomické vymezení jednotlivých morfotypů. V rodě došlo i k polyploidizační události. Tyto skutečnosti činí z jeho zástupců zajímavé modely umožňující srovnání různých strategií v rámci evolučně blízké skupiny.

Cíle práce

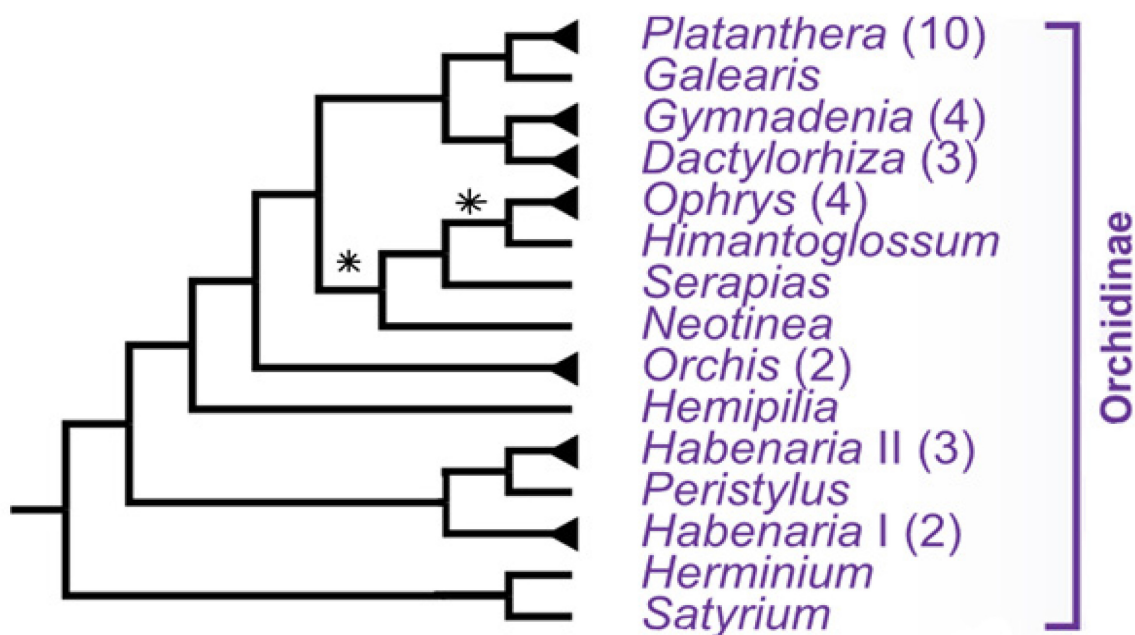
Předložená práce si klade za cíl poskytnout komplexní náhled na rod *Neotinea* s důrazem na evropský areál. Prostřednictvím rešerše literatury tak budou shrnuty současné poznatky z oblastí fylogeneze a taxonomie, molekulárních specifik i biotických interakcí s dalšími organismy. Práce též upozorní na konflikty v prezentovaných studiích i na zatím nevyjasněné oblasti poznání týkající se rodu *Neotinea*.

1 **Fylogenetické postavení rodu *Neotinea* a představení jeho zástupců**

1.1 **Fylogenetické postavení rodu *Neotinea* v rámci čeledi Orchidaceae**

Čeď Orchidaceae Juss. obsahuje celkem více než 30 087 taxonů na úrovni druhu a její druhové bohatství je rozprostřeno mezi 705 v současnosti uznaných rodů (POWO 2023). V rámci čeledi Orchidaceae je rozeznáno 5 podčeledí – bazální Apostasioideae Horan., postupně se oddělující Vanilloideae (Lindley) Szlachetko, Cypripedoideae Kostel. a korunové Orchidoideae Eaton a Epidendroideae Kostel. Poslední dvě podčeledi, zvláště pak Epidendroideae, zahrnují většinu druhů čeledi a v současnosti diverzifikují nejrychleji (Pérez-Escobar *et al.* 2024). Rod *Neotinea* je součástí podčeledi Orchidoideae a v rámci ní patří do druhově nejpočetnějšího subtribu Orchidinae (Pridgeon *et al.* 1997). Postavení v rámci subtribu je ovšem nejasné. Prvotní studie založená na analýze sekvencí ITS (Internal Transcribed Spacer) umístila rod *Neotinea* do pozice sesterské skupiny *Anacamptis-Serapias-Ophrys-Himantoglossum* (ASOH). Jako celé skupině sesterský pak byl označen rod *Orchis* s.s. Vznikla tak monofyletická skupina zahrnující všechny druhy s kulovitou nebo mírně oválnou hlízou. Pozice rodu *Orchis* ovšem měla nízkou podporu (Pridgeon *et al.* 1997). Byly publikovány i jiné topologie. Opět na základě ITS byl rod *Neotinea* označen jako sesterský rodu *Platanthera* v rámci skupiny s povětšinou větvenými hlízami, kam dále spadaly i rody *Dactylorhiza* a *Gymnadenia*. Celé skupině byl sesterský rod *Orchis*, a byla tak vytvořena monofyletická skupina druhů s chromozomovými počty 40 a 42 (oproti též monofyletické skupině ASOH s 36 chromozomy). Nicméně bez podpory, či se slabou podporou, bylo jak oddělení od rodu *Orchis*, tak samotné dvojice *Platanthera-Neotinea* (Aceto *et al.* 1999; Cozzolino *et al.* 2001). Podobné topologie dvou monofyletických skupin sdílejících chromozomová čísla bylo dosaženo již v prvotní studii, kdy byl ovšem rod *Neotinea* v sesterské pozici ke zmíněným dvěma skupinám. Topologie ale též vykazovala slabou podporu (Pridgeon *et al.* 1997). Bateman *et al.* (2003) umístil rod *Neotinea* do sesterské pozice ke skupině ASOH. K této větvi pak bylo sesterské monofylum s hlavními rody *Orchis-Platanthera-Dactylorhiza-Gymnadenia-Galearis*. Topologie s *Neotinea* v sesterské pozici k ASOH byla také podpořena (silně) i v analýze zahrnující vedle ITS ještě plastidový a mitochondriální marker (rpl16, cox1; Inda *et al.* 2012). Naprosto odlišné rozložení ale přinesly integrované výsledky rozboru dvou jaderných (ITS, Xdh) a pěti plastidových markerů (matK, psaB, psbA-trnH, rbcL a trnL-F). Rod *Neotinea* byl umístěn jako sesterský celé skupině druhů s prstovitou hlízou (hlavní rody *Platanthera*, *Gymnadenia*, *Dactylorhiza*). Umístění do této pozice ale nebylo v analýze dostatečně podpořeno (Jin *et al.* 2017). Robustní analýza pro celou čeď Orchidaceae zahrnující 1450 vybraných jaderných genů našla silnou podporu monofyla skupiny druhů s 36 chromozomy a *Neotinea* jako sesterským rodem (**Obrázek 1**). Tomu sesterské bylo uskupení druhů s prstovitou hlízou. Rod *Orchis* byl pak

určen jako sesterský zmíněné dvojici skupin (Zhang *et al.* 2023). Vzhledem k tomu, že hlavním cílem zmíněné studie nebylo řešení vztahů na úrovni subtribu Orchidinae, obsahovala práce málo zástupců z jednotlivých rodů a některé významné rody chyběly úplně (např. *Anacamptis*). Nicméně vzhledem k velkému množství analyzovaných genů i shodným zjištěním dřívějších podrobných studií subtribu Orchidinae (co se otázky postavení rodu *Neotinea* týče; Bateman *et al.* 2003; Inda *et al.* 2012), lze považovat výsledky za relevantní.



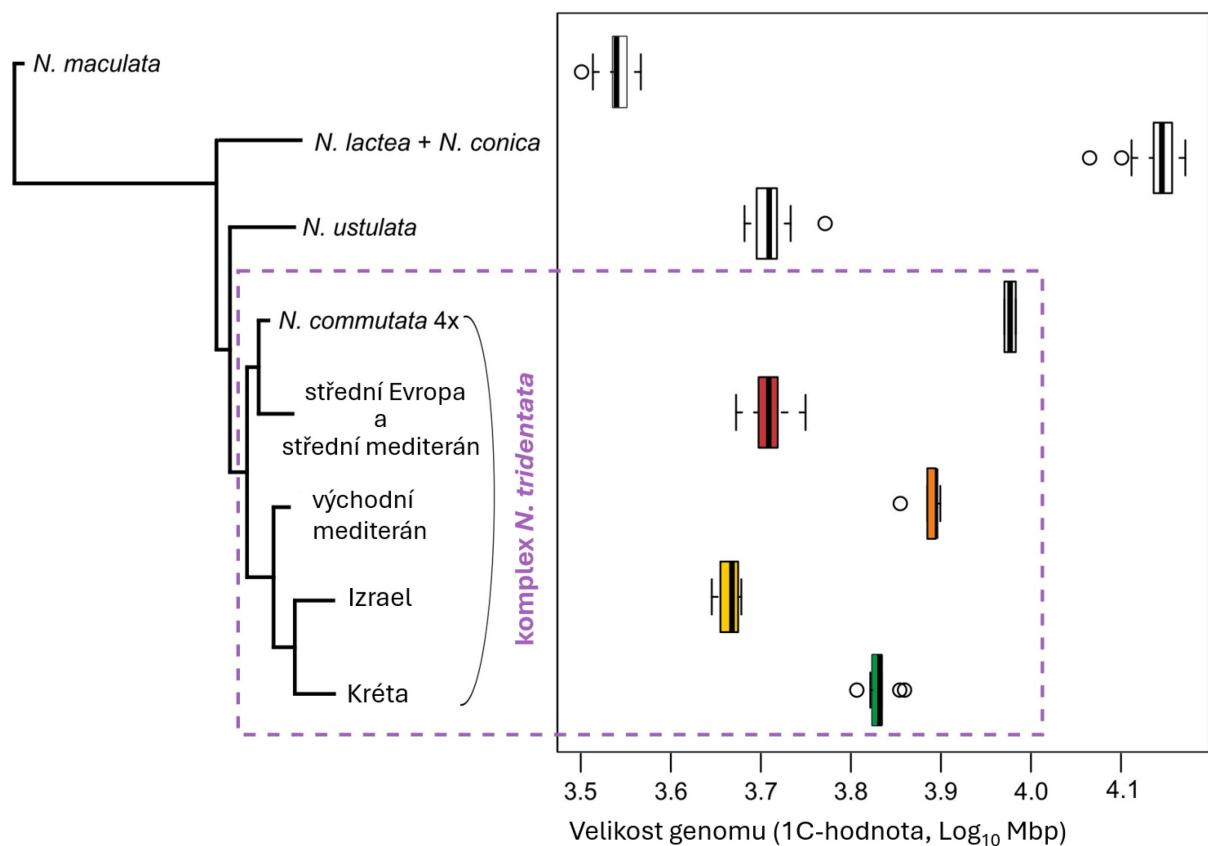
Obrázek 1: Mezirodové vztahy v subtribu Orchidinae založené na výsledcích analýzy jaderných genů. Hodnoty multi-locus bootstrap support jsou 100 (neznačené větve), nebo větší než 90 (*) ve všech získaných stromech. Hodnoty v závorce jsou počty analyzovaných druhů. Převzato ze Zhang *et al.* (2023), upraveno pro potřeby práce. Z velkých rodů chybějící *Anacamptis* se nejčastěji jeví jako sesterský rodu *Serapias* (př. Bateman *et al.* 2003; Jin *et al.* 2017).

1.2 Fylogeneze a taxonomie rodu *Neotinea*

Rod *Neotinea* Rchb.f. byl platně popsán roku 1852. Až do přelomu tisíciletí byl pokládán za monotypický s jediným druhem *Neotinea maculata* (Desaf.) Stearn (dříve *N. intacta* (Link) Rchb.f.). Další druhy přibýly až s nástupem molekulárních metod. Rod *Orchis* v tradičním pojetí (Dressler 1993) se ukázal jako polyfyletický a někteří zástupci byli přeřazeni do blízkých rodů *Anacamptis* a *Neotinea* (Pridgeon *et al.* 1997; Bateman *et al.* 1997). Dále ještě došlo ke změnám úrovně taxonů v rodě *Neotinea* (př.: Bateman *et al.* 2003). Nyní tak rod zahrnuje 6 uznaných druhů (**Tabulka 1**; POWO 2023). Současný pohled na fylogenetické vztahy uvnitř rodu zachycuje **Obrázek 2**.

Tabuka 1: Tabulka shrnující homotypická synonyma, rozšíření, počet chromozomů (pro $2n$; CC), množství DNA (hodnota pro $2C$ v pg; Velikost genomu), podíl endoreplikované složky genomu (pro $2C$ v %; PE) a detekované ploidní úrovně (P) v rámci jednotlivých taxonů rodu *Neotinea*. Data získána z POWO (2023), Trávníček *et al.* (2021) a Kühn *et al.* (2019).

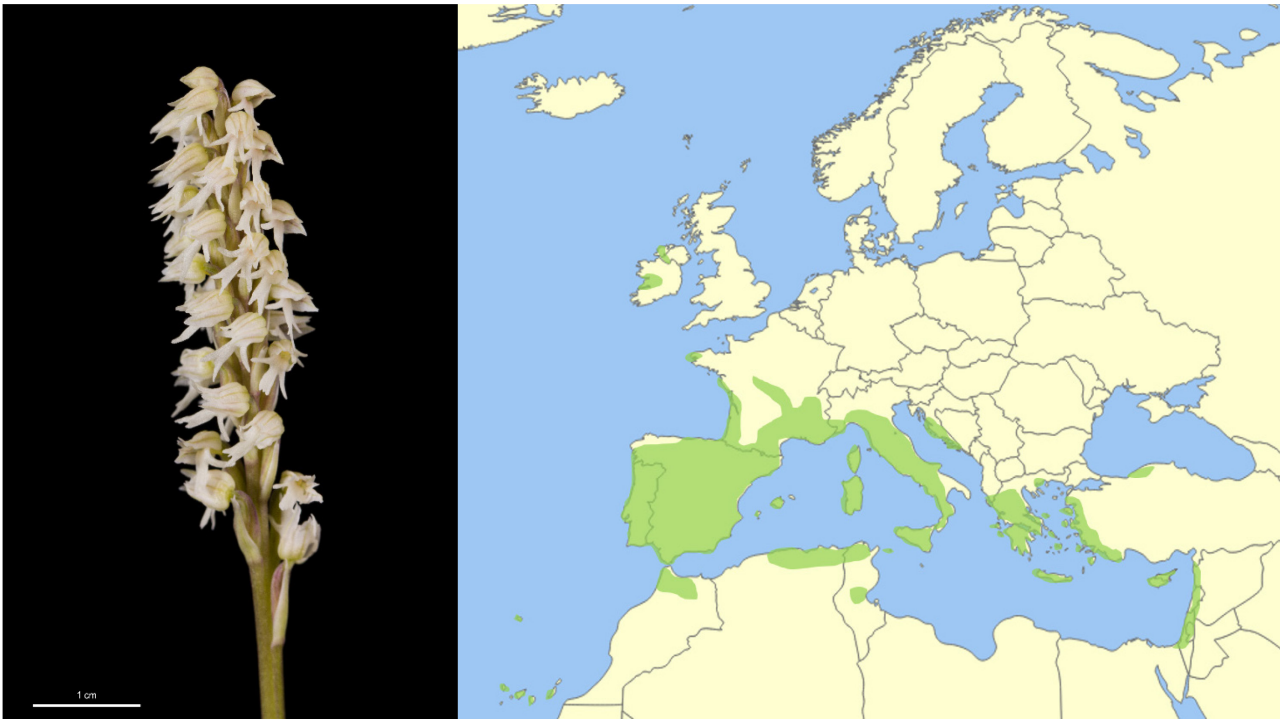
Druh	Homotypická synonyma	Rozšíření	CC	Velikost genomu (pg)	PE (%)	P
<i>Neotinea commutata</i> (Tod.) R.M.Bateman	<i>Neotinea tridentata</i> var. <i>commutata</i> (Tod.) Kreuz <i>Neotinea tridentata</i> subsp. <i>commutata</i> (Tod.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase <i>Odontorchis commutata</i> (Tod.) Devillers-Tersch. & Devillers <i>Orchis commutata</i> Tod. <i>Orchis tridentata</i> subsp. <i>commutata</i> (Tod.) Nyman <i>Orchis tridentata</i> var. <i>commutata</i> (Tod.) Rchb.f.	Sicílie	84	19,46 ± 0,39	36,3	4×
<i>Neotinea conica</i> (Willd.) R.M.Bateman	<i>Neotinea lactea</i> subsp. <i>conica</i> (Willd.) J.Ponert, P.Trávn. & Chumová <i>Neotinea tridentata</i> subsp. <i>conica</i> (Willd.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase <i>Odontorchis conica</i> (Willd.) D.Tyteca & E.Klein <i>Orchis conica</i> Willd. <i>Orchis lactea</i> subsp. <i>conica</i> (Willd.) Kreuz <i>Orchis lactea</i> var. <i>conica</i> (Willd.) H.Baumann & R.Lorenz <i>Orchis tridentata</i> subsp. <i>conica</i> (Willd.) O.Bolòs & Vigo	západní mediterán	42	28,14 ± 0,58	12,9	2×
<i>Neotinea lactea</i> (Poir.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase	<i>Odontorchis lactea</i> (Poir.) D.Tyteca & E.Klein <i>Orchis lactea</i> Poir. <i>Orchis tridentata</i> subsp. <i>lactea</i> (Poir.) K.Richt. <i>Orchis tridentata</i> var. <i>lactea</i> (Poir.) Rchb.f.	střední mediterán, východní mediterán	42	28,65 ± 1,43	12,5	2×
<i>Neotinea maculata</i> (Desf.) Stearn	<i>Aceras maculatum</i> (Desf.) Gren. <i>Orchis maculata</i> (Desf.) Batt. <i>Satyrium maculatum</i> Desf. <i>Tinea cylindrica</i> Biv. <i>Tinea maculata</i> (Desf.) Vis.	mediterán, západní Francie, západní Irsko	42	7,12 ± 0,22	40,6	2×
<i>Neotinea tridentata</i> (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase	<i>Odontorchis tridentata</i> (Scop.) D.Tyteca & E.Klein <i>Orchis tephrosanthos</i> Vill. <i>Orchis tridentata</i> Scop.	1. střední Evropa a střední mediterán 2. východní Evropa 3. Kréta 4. Izrael	42	10,49 ± 0,38 15,70 ± 0,54 13,92 ± 0,52 9,46 ± 0,30	33,8 22,6 26,5 34,6	2×; 3× 2× 2× 2×
<i>Neotinea ustulata</i> (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase	<i>Odontorchis ustulata</i> (L.) D.Tyteca & E.Klein <i>Orchis ustulata</i> L.	Evropa až západní Sibiř	42	10,48 ± 0,36	33,6	2×



Obrázek 2: Schéma fylogenetických vztahů uvnitř rodu *Neotinea* a přehled velikostí genomu u různých linií. Zdroj Trávníček *et al.* (2021), upraveno pro potřeby práce.

1.2.1 *Neotinea maculata*

Neotinea maculata (Desaf.) Stearn je drobnokvětý autogamický druh (Claessens & Kleynen 2018) široce rozšířený ve Středomoří (**Obrázek 3**). Podél západního pobřeží Francie ale ostrůvkovitě pokračuje až do západního Irsku a jedinci se vyskytují i na Kanárských ostrovech a Madeiře (Kühn *et al.* 2019). Druhově charakteristické jsou drobné květy zbarvené od bílé k purpurové. Také fialové skvrny na listech jsou unikátní a u jiného druhu v rodě se nevyskytují. Nicméně skvrny mohou u některých jedinců zcela chybět (Kühn *et al.* 2019). Jedná se o bazální linii rodu a druh sesterský všem ostatním zástupcům (Bateman *et al.* 2003; Trávníček *et al.* 2021). Od ostatních druhů se výrazně liší i v rozměrech semen, která jsou největší z rodu (Gamarra *et al.* 2007).



Obrázek 3: Foto a mapa rozšíření *N. maculata*. Autorem fotek je Jan Ponert, není-li uvedeno jinak. Data převzata z GBIF (2024) a Kühn *et al.* (2019). Graficky zpracováno a upraveno pro účely práce.

1.2.2 *Neotinea ustulata*

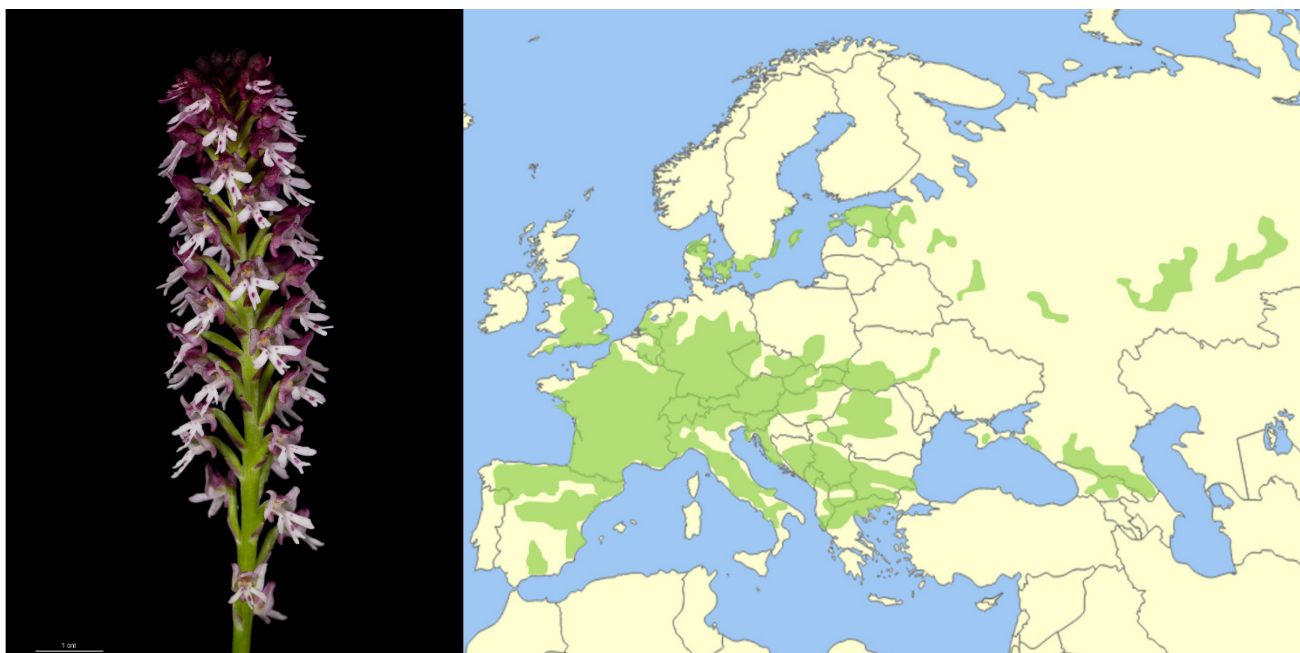
Neotinea ustulata (L.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase je zároveň nejrozšířenější i nejseverněji se vyskytující druh. Areál pokrývá takřka celou Evropu (ČR nevyjímaje), dále pokračuje na Ural a Kavkaz (Kühn *et al.* 2019). Mezi ostatními zástupci rodu ho jednoznačně identifikuje tmavě nachové zbarvení poupat v kombinaci s bílým pyskem, způsobující kontrastně tmavé zbarvení vrcholu květenství (od toho český druhový název vstavač osmahlý, **Obrázek 4**).

Druh má uznané dvě variety: var. *aestivalis* (Kümpel) Tali, M.F.Fay & R.M.Bateman a var. *ustulata*. Variety se odlišují především fenologicky. Populace označované jako var. *ustulata* (dále rané) nakvétají o přibližně měsíc až dva dříve než var. *aestivalis* (dále pozdní). Začátek i délka kvetení jsou na jednotlivých lokalitách proměnlivé (Tali *et al.* 2004), ale stabilní při přesazení jedince (Tali & Kull 2001). Doby kvetení variet ale na sebe svými krajními termíny navazují (Haraštová-Sobotková *et al.* 2005), či se dokonce překrývají (Reineke & Rietdorf 1991). Na morfologické úrovni bylo určeno vícero rozdílů od výšky rostliny přes špičatost květenství po tvar bočních tepalů (Kümpel & Mrkvicka 1980). Morfometrická analýza jedinců obou variet z České a Slovenské republiky určila jako hlavní rozlišovací znaky výšku rostliny, počet listů v růžici a jejich délku a pozici prvního listu na lodyze (Haraštová-Sobotková *et al.* 2005). Kromě počtu listů v růžici nabývají znaky vyšších hodnot u pozdní variety. Vyšší vzrůst pozdní variety je značně adaptivní vzhledem k vyšší výšce vegetace v době květu (Tali & Kull 2001; Haraštová-Sobotková *et al.* 2005). Nicméně morfologické oddělení není dokonalé a jsou přítomni jedinci s intermediálními znaky (Haraštová-Sobotková *et al.* 2005; Trávníček *et al.* 2021). U přírodních populací byla také popsána

značná meziroční variabilita ve vzrůstu konkrétních jedinců (až 20 cm). I přesto byli raní jedinci v průměru každý rok o 3,3 cm nižší, kdy na lokalitách se srovnatelnými podmínkami vystoupil rozdíl na 10,3 cm (Tali & Kull 2001). Existují též záznamy, že raná varieta má větší květy ve srovnání s pozdní (Schiestl & Cozzolino 2008; Martel *et al.* 2021).

Další pohled poskytly molekulární metody. Při analýze technikou náhodně zmnožené polymorfni DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) česko-slovenských populací byly odhaleny markery specifické pro jednotlivé variety určující rozdělení na zmíněné dvě skupiny (Haraštová-Sobotková *et al.* 2005). Analýza ale také ukázala značný vliv geografického rozložení populací. Tali *et al.* (2004) považují vliv geografie za neoddelitelný a výsledky zpochybňují. V jejich vlastní studii s využitím analýzy polymorfismu délek zmnožených fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) u vzorků z Anglie a Estonska se oddělení variet na úrovni DNA nepotvrdilo ani v rámci jednotlivých států (Tali *et al.* 2006). Stejný závěr, slabé genetické odlišení, poskytuje i technika sekvenování DNA štěpené restrikcí enzymem (či enzymy, Restriction-site Associated DNA sequencing, RADseq; Trávníček *et al.* 2021). Výsledky jsou v souladu s prvotním konstatování rozdílnosti jednotlivých populací v rámci pozdní variety (Reineke & Rietdorf 1991).

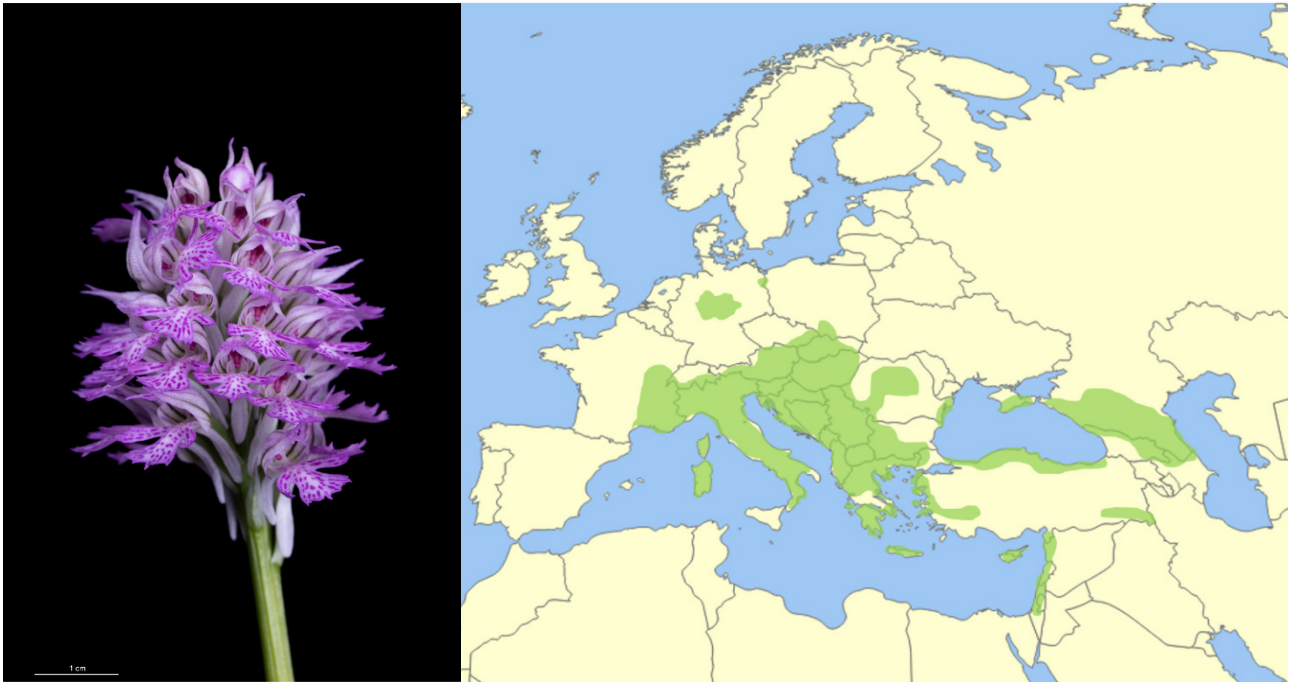
Za původní varietu je považována var. *ustulata*, kdy pozdní variety vznikly vícekrát nezávisle na sobě (Tali *et al.* 2006). Příklad několikanásobného odštěpení odlišných linií je u orchidejí již znám v rodě *Epipactis* (Squirrell *et al.* 2002). Význam při odlišení mohla mít disruptivní selekce upřednostňující krajní doby kvetení v závislosti na dlouhodobém využíváním luk k pastvě nebo senoseči (Haraštová-Sobotková *et al.* 2005). Selekcční tlaky zapříčinivší fenologické odlišení vyžadují ovšem další výzkum.



Obrázek 4: Foto a mapa rozšíření *N. ustulata*. Data převzata z GBIF (2024) a Kühn *et al.* (2019). Graficky přepracováno a upraveno pro účely práce.

1.2.3 *Neotinea tridentata*

Neotinea tridentata (Scop.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase je druhým druhem zasahujícím na území České republiky. Areál výskytu se táhne od Francie po Izrael a Kavkaz s nejsevernějšími záznamy z dvou areálů v Německu (Kühn *et al.* 2019). Jedná se o druh s většími růžovobílými květy s fialovou ornamentací v podobě teček na pysku a tmavých linií na tepalech (**Obrázek 5**). Charakteristické je poněkud staženější květenství až kulovitěho tvaru (Kühn *et al.* 2019). Morfologicky se ale jedná o variabilní druh, což vyústilo v popsání libanonské variety s odstálými tepaly jako var. *libanotica* (Addam *et al.* 2014) a menší jasněji zbarvené var. *angelica* (A.Alibertis) P.Delforge. V současné době nejsou zatím žádné podřazené taxony uznány (POWO 2023). Situace by se ovšem mohla změnit, neboť podrobná studie rodu (Trávníček *et al.* 2021) odhalila přítomnost dobře definovaných linií v rámci diskutovaného druhu. První skupinu tvoří populace ze střední Evropy a středního mediteránu (sesterská s *Neotinea commutata*, viz níže). Druhou pak rostliny východního mediteránu (Balkán a Turecko) s vnitřními sesterskými skupinami rostlin z Kréty a Izraele. Autoři studie poukazují na odlišnosti linií. Východomediteránní rostliny vykazují větší velikost genomu oproti populaci střední Evropy a středního mediteránu, přičemž jsou také diploidní. Rostliny z Izraele mají jasněji zbarvené větší květy, kvetou dříve a mají nejmenší velikost genomu ze všech linií *N. tridentata*. Krétská populace označovaná jako var. *angelica* má též unikátní velikost genomu přibližně v polovině mezi střeoevropskou/středomediteránní a východomediteránní linií. Rostliny z areálu var. *libanotica* nebyly ve studii zařazeny, stejně jako odlišné časně kvetoucí populace z oblasti Levantu a Kypru. Sami autoři upozorňují, že pro vyvození taxonomických závěrů bude potřeba podrobnější analýza s větším zastoupením vzorků především z pevninského Řecka (pro opodstatnění var. *angelica*) i z oblasti Levantu (var. *libanotica* a místní časně kvetoucí populace; Trávníček *et al.* 2021).



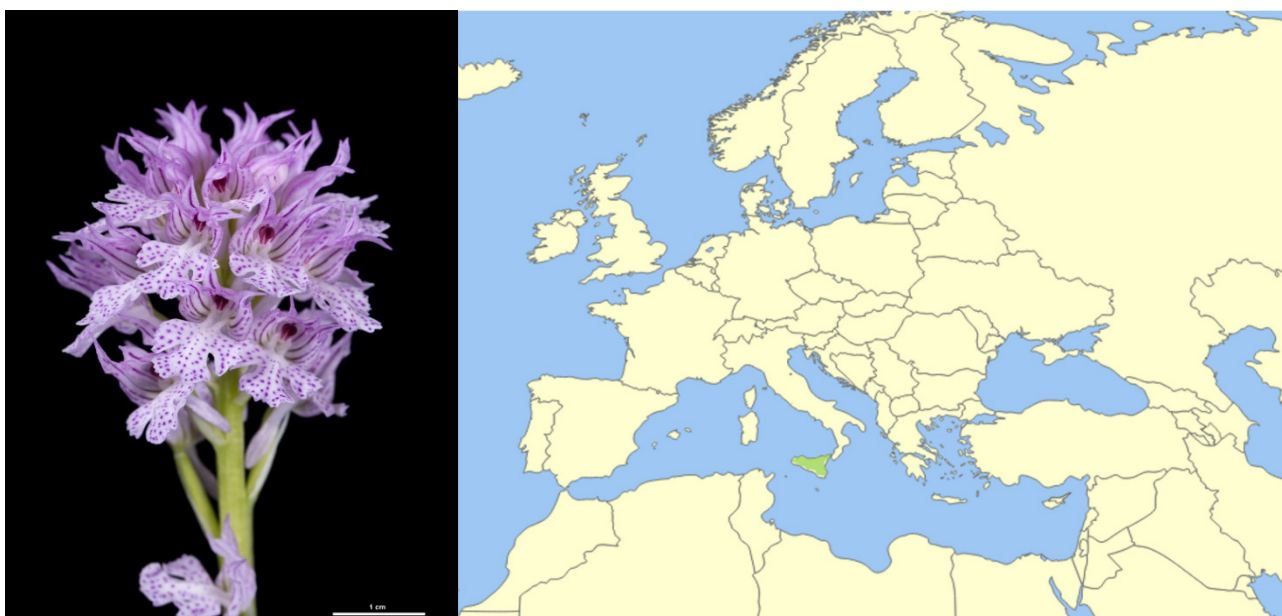
Obrázek 5: Foto a mapa rozšíření *N. tridentata*. Data převzata z GBIF (2024) a Kühn *et al.* (2019). Graficky přepracováno a upraveno pro účely práce.

1.2.4 *Neotinea commutata*

Neotinea commutata (Tod.) R.M.Bateman byla popsána ze Sicílie (**Obrázek 6**), kde je považována za endemický tetraploidní taxon blízký *N. tridentata* (Del Prete & Mazzola 1995; Pavarese *et al.* 2013). Pochyby vzbuzují záznamy z jiných lokalit – z pevninské Itálie (Pridgeon *et al.* 1997), či dokonce z České republiky (herbářová položka v článku Gamarra *et al.* 2007). Rostlina z pevninské Itálie byla původně označena jako *N. tridentata* (Pridgeon *et al.* 1997). Až na základě výsledků ITS analýzy byla původní determinace zpochybněna, jelikož měla shodnou sekvenci s *N. commutata* sbíranou ze Sicílie (Bateman *et al.* 2003). Autoři se ve studii pozastavují nad nepřibuzností sicílské *N. commutata* se vzorky *N. tridentata* (ze smíšené populace) ze Sicílie, které naopak vykazovaly příbuznost s tamními *N. lactea* a *N. conica*. Výskyt *N. tridentata* s.s. na Sicílii je ovšem spekulativní a není vždy uznáván (Del Prete & Mazzola 1995; POWO 2023). Sicílská *N. tridentata* tak mohla být chybně určena *N. lactea* a *N. tridentata* z pevninské Itálie zástupce středomediterránní populace. Topologie stromu by pak lépe odpovídala pozdější studii založené na RAD sekvenování, kdy se *N. commutata* ukázala jako vnitřní skupina druhu *N. tridentata* (Trávníček *et al.* 2021). Nutné je také zmínit, že ITS byl jako marker vhodný pro řešení intragenerických vztahů rodu *Neotinea* zpochybněn (Hürkan & Taşkin 2021) a sekvence ITS jsou velmi podobné i u morfologicky dobře definovaných druhů v jiných rodech, například mezi *Gymnadenia conopsea* a *G. odoratissima* (Bateman *et al.* 2003).

Herbářová položka z Moravy je poněkud záhadnější, neboť její analýza (semen) našla rozdíl oproti též zahrnuté *N. tridentata* ze Sardinie (Gamarra *et al.* 2007). Semena *N. tridentata* vykazovala oproti *N. commutata* vyšší hodnoty ve všech měřených parametrech, což je v rozporu s vyšším stupněm ploidie *N. commutata*, u kterého je běžnější nárůst velikosti semen (Jaskani *et al.* 2004). Navzdory nalezené odlišnosti se pravděpodobně jednalo o chybně určenou položku *N. tridentata*.

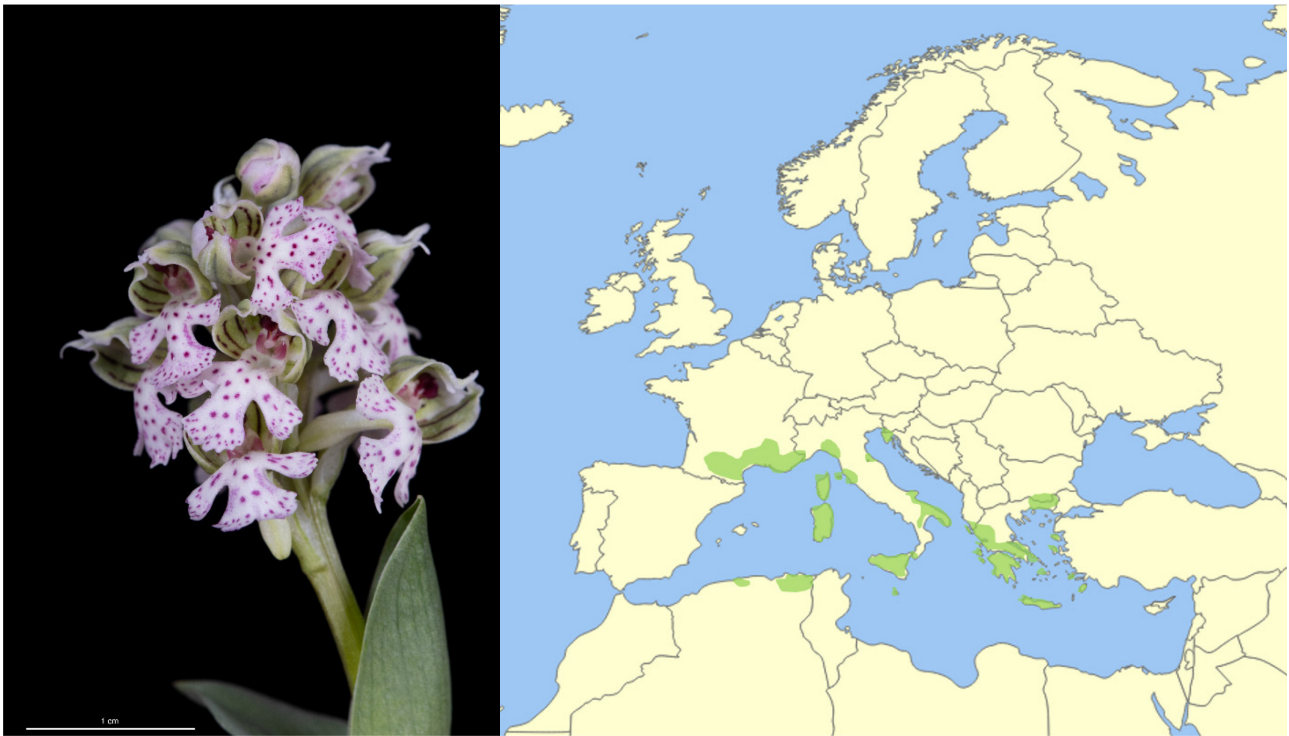
Z morfologického hlediska jsou jedinci *N. commutata* značně podobní druhu *N. tridentata*. Menší odlišnost spočívá především ve větším pysku a ostruže (Pavarese *et al.* 2013; Trávníček *et al.* 2021). Taxon je v současné době stále rozlišován na úrovni druhu. V souladu s výsledky studie založené na RAD sekvenování (Trávníček *et al.* 2021) by bylo vhodné ho ponížít na úroveň poddruhu. Ve studii byl však obsažen pouze jeden jedinec, což k osvětlení taxonomického postavení, i vzhledem k možnému hybridnímu původu, není dostatečné.



Obrázek 6: Foto a mapa rozšíření *N. commutata*. Data převzata z GBIF (2024) a Kühn *et al.* (2019). Graficky přepracováno a upraveno pro účely práce.

1.2.5 *Neotinea lactea*

Neotinea lactea (Poir.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase se vyskytuje hlavně v centrální a východní části mediteránní oblasti. Mnoho lokalit se nachází na velkých ostrovech – Sicílii, Sardinii a Korsice (**Obrázek 7**). Květy jsou zbarveny od světle růžové až do bíla s růžovými skrvkami na mírně konkávním pysku. Přílba je bílá až světle zelená. Celkový vzhled rostliny je oproti ostatním zástupcům poněkud robustnější (Kühn *et al.* 2019). Korsická populace byla popsána jako samostatný druh *Neotinea corsica* (Viv.) W.Foelsche. Při molekulární analýze začlenění jedinci sice tvořili monofyletickou, ale vnitřní skupinu *N. lactea*, a ani morfometrická analýza nepotvrdila výraznou odlišnost (Trávníček *et al.* 2021). Byl tak podpořen současný stav, kdy taxon *N. corsica* není uznán (POWO 2023).

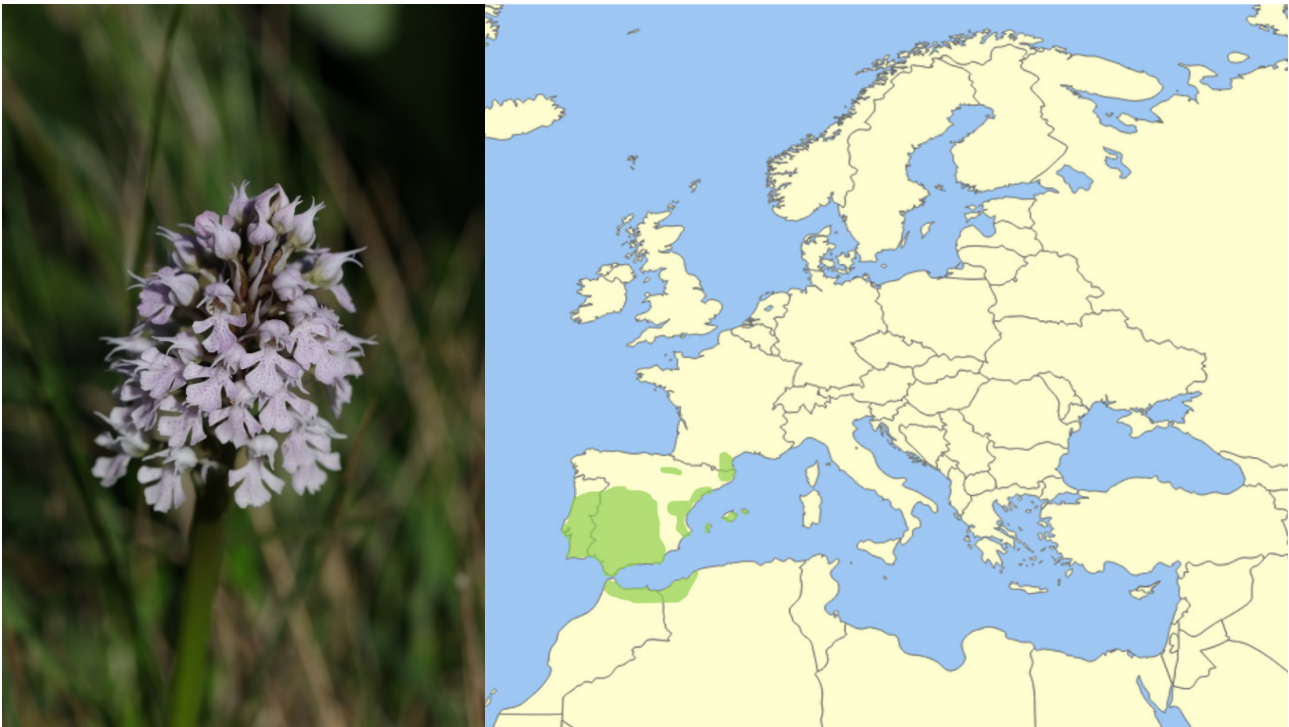


Obrázek 7: Foto a mapa rozšíření *N. lactea*. Data převzata z GBIF (2024) a Kühn *et al.* (2019). Graficky přepracováno a upraveno pro účely práce.

1.2.6 *Neotinea conica*

Neotinea conica (Willd.) R.M.Bateman široce obývá západní mediterán (**Obrázek 8**). Morfologicky se podobá *N. lactea* a *N. tridentata*. Od prvního druhu se odlišuje spíše bílým, či pouze lehce růžovým zbarvením s růžovými skvrnami na pysku, od druhého pak až mírně konvexním prohnutím pysku narozdíl od konkávního. Oproti podobným druhům je také celková velikost květů menší (Kühn *et al.* 2019). Pod oba zmíněné taxony byla dříve zařazována na úroveň poddruhu (Bateman *et al.* 1997; Kreutz 2004; Kühn *et al.* 2019). Nedávná molekulární analýza odhalila, že se jedná o monofyletickou vnitřní linii uvnitř *N. lactea* (Trávníček *et al.* 2021). Jde tedy o linii, která kolonizovala západní Středomoří a postupně se morfologicky odlišila. Odlišnosti byly potvrzeny i morfometrickým rozbohem. Jak autoři studie navrhuji, bylo by vhodné ponížít druh na úroveň poddruhu ve tvaru *Neotinea lactea* subsp. *conica* (Willd.) J.Ponert, P.Trávn. & Chumová. Studie též označila za jí sesterskou skupinu rostliny původem z Korsiky (ačkoli s malou podporou; Trávníček *et al.* 2021). K porozumění odštěpení linie *N. conica* a statusu korsické populace by byl potřeba úžeji zaměřený průzkum.

Na Pyrenejském poloostrově byly od *N. conica* odlišeny dvě variety – var. *ricardina* a var. *saenzii* (Vázquez 2008). Odlišnosti spočívají ve tvaru pysku, kdy var. *ricardina* má laterální úkrojky úzké a téměř kolmo odstálé, zatímco var. *saenzii* má úkrojky téměř celé srostlé s pyskem. V současnosti nejsou uznány (POWO 2023). Popisy pochází ze shodné malé oblasti a je otázkou, zda jde o místně specifické varianty, nebo pouze o projev vnitrodruhové variability.



Obrázek 8: Foto (Pavel Trávníček) a mapa rozšíření *N. conica*. Data převzata z GBIF (2024) a Kühn *et al.* (2019). Graficky přepracováno a upraveno pro účely práce.

1.2.7 Hybridní taxony

Areály jednotlivých druhů se překrývají a v místech sympatrického výskytu dochází ke vzniku kříženců. Zatím byli platně popsáni dva (POWO 2023). *Neotinea* × *bugarachensis* (J.Claess. & J.-M.Lewin) B.Bock vznikla křížením *N. conica* a *N. ustulata*. Tento hybrid byl zatím zjištěn pouze z území Francie (Classens & Lewin 1995). *Neotinea* × *dietrichiana* (Bogenh.) H.Kretzschmar, Eccarius & H.Dietr. je přírodním křížencem *N. tridentata* a *N. ustulata*. Analýzou plastidové DNA byla jako donor pylu určena *N. ustulata* (Cozzolino *et al.* 1998). Vzhledem k pouze jedinému zkoumanému jedinci však nelze říci, zda je tento případ v přírodě převažující. Kříženec se přirozeně objevuje sporadicky na více lokalitách se sympatrickým výskytem zmíněných rodičovských druhů (Cozzolino *et al.* 1998; Lumaga *et al.* 2006; Djordjević *et al.* 2012).

Kromě již zmíněných intragenerických hybridů byly popsáni i hybridi mezirodoví. *Dactylorhiza maculata* dala s *N. ustulata* vznik hybridu × *Neotinarhiza labbei* (Chr.Bernard) B.Bock (IPNI 2024). Došlo také ke křížení s rodem *Orchis* (v pojetí Bateman *et al.* 1997). Rodiči *Orchis* × *canutii* K.Richt. jsou *O. militaris* a *N. tridentata* a jeho výskyt byl zaznamenán i v ČR (Procházka & Velíšek 1983). *Orchis* × *diversifolia* Gau Dagno údajně vznikl křížením *N. conica* a *O. italica*. Záznamy pocházejí z území Španělska (Hermosilla & Sabando 1996; Martín & Oliva 2006). Donedávna byl za hybrida považován i × *Neotiaceras mattinatae* Kohlmüller. Za rodičovské druhy byly označeny *O. anthropophora* a *N. maculata*. Zaměřená studie však odhalila, že se jedná pouze o projev vnitrodruhové variability odpovídající *O. anthropophora* var. *flavescens* (Laliga & Espinosa 2022).

Podrobnější průzkum by jistě zasloužila i situace *O. × diversifolia*. *O. italica* je značně variabilní a morfologické projevy připisované křížení by mohly do projevů variability druhu spadat.

2 Genetická informace

2.1 Velikost genomu, chromozomové počty a vznik tetraploidní *N. commutata*

Velikost genomu v rodě *Neotinea* se pohybuje v rozmezí od 6,48 pg u *N. maculata* do hodnot kolem 31,14 pg u *N. lactea* (2C). Nutno poznamenat, že *N. lactea* (spolu s *N. conica*) velikostí genomu značně vybočuje oproti zbylým taxonům (Trávníček *et al.* 2021). Podrobné hodnoty k jednotlivým druhům jsou shrnuty v **Tabulce 1**. Z porovnání velikosti genomu s dalšími zástupci tribu Orchidoideae vyplývá, že zmíněné hodnoty nijak nevybočují z velikostí typických pro tento tribus. Perspektivou velikostí genomu čeledi Orchidaceae je patrné, že jde o genomy spíše menší. Diskutovaná velikostní kategorie ovšem patří mezi ty méně zastoupené ve srovnání s genomy ještě menšími (Leitch *et al.* 2009; Trávníček *et al.* 2019). Na úrovni krytosemenných rostlin lze genom dle definice (Leitch *et al.* 2005) označit jako střední. Z hlediska zastoupení různých velikostí genomu je situace obdobná jako v čeledi Orchidaceae (Michael 2014; Leitch *et al.* 2019). V rámci druhu byla nejvyšší variabilita ve velikosti genomu pozorovaná u *N. tridentata*. Zde odlišnost dobře odpovídá jednotlivým intraspecifickým liniím (viz výše **Obrázek 2**). Nejmenší velikost genomu má izraelská linie odlišující se v průměru od dvou nejbližších linií o více jak 3 pg v případě populace z Kréty, respektive téměř o 5 pg od populace východomediterránní (Trávníček *et al.* 2021).

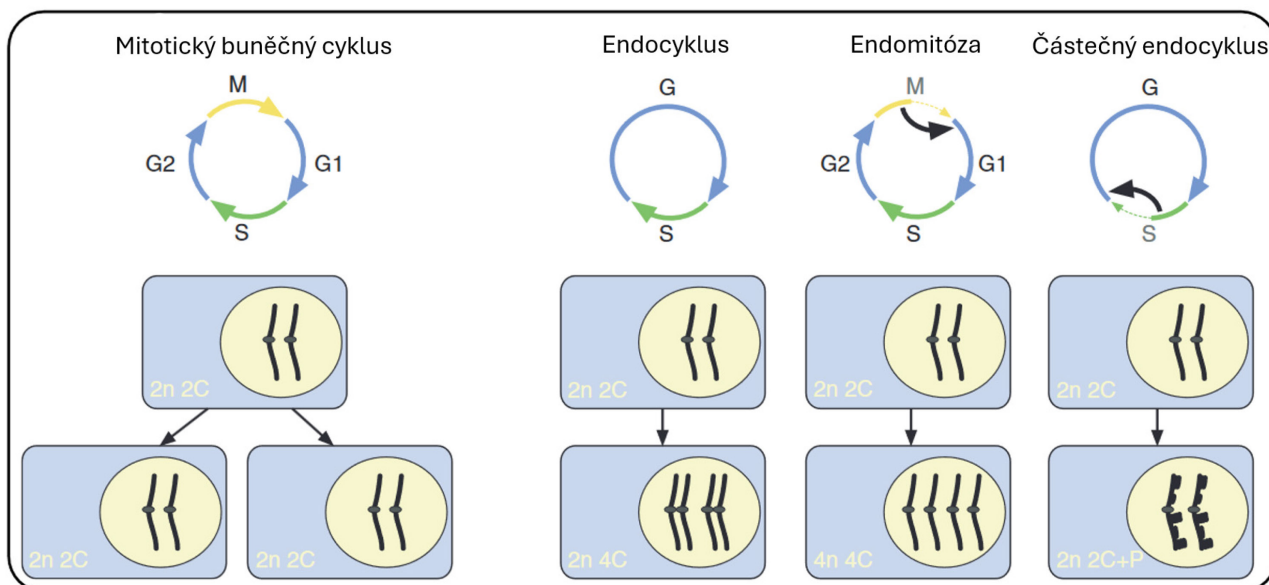
Základním chromozomovým číslem rodu je $2n = 42$ (Cauwet-Marc & Balayser 1984; Mazzola 1984; D'Emérico *et al.* 1990; Trávníček *et al.* 2021). Stejně chromozomové číslo má i rod *Orchis* s.s. (D'Emérico *et al.* 2002). Karyotypy zjištěné pro *N. tridentata* a *N. lactea* se značně neliší. Oba druhy mají metacentrické a submetacentrické chromozomy, kdy první zmíněný typ převažuje. Byl potvrzen i výskyt sekundárních konstrikcí na určitých chromozomech (D'Emérico *et al.* 1990, 1992). Podrobnější struktura chromozomů byla zkoumána za účelem posouzení vzájemné taxonomické pozice u *N. tridentata* a *N. lactea*. Bylo využito jednak techniky C-pruhování pomocí barviva Giemsa a také barvení fluorescenčním barvivem DAPI. Pomocí obou technik se podařilo získat drobné pruhy v oblasti centromer na chromozomech *N. tridentata*. Chromozomy *N. lactea* nejen, že měly pruhy v oblasti centromer silnější, ale některé z nich nesly též výrazné bloky heterochromatinu poblíž telomer (D'Emérico *et al.* 2002). V rodě byla pozorována i přítomnost B chromozomů, konkrétně u druhů *N. tridentata* a *N. ustulata* (D'Emérico *et al.* 1990).

Chromozomový počet vyšší než základní má *N. commutata*, a to $2n = 84$ (Mazzola 1984). Jak již bylo zmíněno, jedná se o tetraploidní taxon. Nicméně u *N. commutata* byly zaznamenány i další, nižší, chromozomové počty v rozsahu 72–81 chromozomů (Pavarese *et al.* 2013; Trávníček *et al.* 2021).

Polyploidie, konkrétně triploidie, byla ještě dále detekována u *N. tridentata* v její středoevropské/středomediterránní linii (Trávníček *et al.* 2021). Polyploidizační událost u *N. commutata* stále není uspokojivě vysvětlena (Pavarese *et al.* 2013; Trávníček *et al.* 2021; Turco *et al.* 2024). Původně byl navržen autotetraploidní původ (zmnožení v rámci druhu) a mateřský druh *N. tridentata* (Mazzola 1984). Podrobná studie s využitím morfologických (květní charakteristiky), molekulárních (ITS, lokus *ycf4-cemA* plastidové DNA) a cytogenetických metod naopak navrhla allopolyploidní původ (zmnožení chromozomů zároveň s hybridizací) s mateřskými druhy *N. tridentata* a *N. lactea*. Hlavními argumenty jsou přítomnost *N. lactea*-specifického haplotypu plastidového lokusu u všech zkoumaných jedinců *N. commutata*, nízká přítomnost ribozomálních sekvencí *N. lactea* (1,52 %) proti častým sekvencím *N. tridentata* (69,70 %) a tvorba 42 bivalentů v profázi I. Dále je zmíněno, že doba kvetení se nachází mezi potenciálními rodičovskými druhy. Vše je v téže publikaci podpořeno pokusy s umělým opylením, které dokázalo produkci životaschopných embryí ve všech kombinacích. Absenci ribozomálních sekvencí odpovídajících *N. lactea* vysvětlují autoři opakovaným zpětným křížením *N. tridentata*, který v jeho důsledku ze Sicílie vymizel (Pavarese *et al.* 2013). Zde je opět třeba připomenout, že o významu analýzy ITS na úrovni druhů panují pochyby (Hürkan & Taşkin 2021). Trávníček *et al.* (2021) se naopak přiklání k původně postulovanému autotetraploidnímu vzniku z *N. tridentata*. Poukazují na dvojnásobný obsah DNA zároveň s dvojnásobnou velikostí endoreplikované (viz níže) části genomu oproti středomediterránní populaci *N. tridentata*. V souladu s dřívějšími poznatky o parciální endoreplikaci by zjištění opravdu ukazovalo na autopolyploidní původ, neboť kříženci by vykazovaly přechodné hodnoty (Trávníček *et al.* 2011). Další studium karyologie rodu *Neotinea* potvrdilo absenci chromozomů s telomerickými heterochromatinovými bloky typickými pro *N. lactea* v karyotypu *N. commutata*, stejně jako tvorbu čtyřiceti dvou bivalentů v profázi I (Turco *et al.* 2024). Autoři navrhli, že při vzniku *N. commutata* po prvotní autopolyploidizaci *N. tridentata* následovala allopolyploidizace s účastí *N. lactea*. Allopolyploidní jedinci dle teorie postupně v populaci převládli, jelikož mohli vykazovat lepší adaptivní vlastnosti. Posledně navržený scénář se nicméně jeví jako značně nepravděpodobný. Navržený způsob vzniku je velmi složitý a vyžaduje rovnou dvě v rodě *Neotinea* jinak neobvyklé události – allopolyploidizaci (v rodě dosud nepotvrzená) a autopolyploidizaci (výjimečně triploidii; viz výše). Velmi zvláštní je, že by následná hybridizace autopolyploidů a allopolyploidů v evoluci naprosto odstranila z karyotypu veškeré chromozomy původně pocházející od *N. lactea* a nesoucí unikátní heterochromatinové bloky. Více světla do problému by mohlo vnést podrobnější studium uniparentálně děděné DNA, protože se jedná v současnosti o hlavní důkaz vlivu *N. lactea* na formování druhu *N. commutata*.

2.2 Endopolyploidie

Pletiva krytosemenných rostlin se od sebe značně liší tvarem, organizací i funkcí. Napříč pletivy jsou rozdílné požadavky například na velikost buňky, či její metabolickou kapacitu. Diferenciaci buněk specializovaných pletiv často provází jev zvaný endopolyploidie (Nagl 1974; Beaulieu *et al.* 2008). Jedná se o cílené zmnožení genomových sad, které postihuje většinu rostlinných buněčných typů kromě gamet, meristematičtých buněk a svěřacích buněk průduchů (Leitch & Dodsworth 2017). Způsoby zmnožení genomu jsou různé (**Obrázek 9**). U krytosemenných rostlin je nejčastějším způsobem dosažení endopolyploidie endoreduplikace. Jedná se o modifikaci buněčného cyklu, při které dochází ke střídání syntetické fáze „S“ a pauzy „G“. Modifikovaným cyklem, endocyklem, může buňka projít vícekrát, kdy při každém kole dochází ke zmnožení veškeré jaderné DNA. Výsledkem jsou hodnoty 2C, 4C, 8C, 16C a dále, kde „C“ je velikost haploidního genomu gamet (Leitch & Dodsworth 2017). Endoreduplikace v klasické podobě se vyskytuje i v čeledi Orchidaceae (Trávníček *et al.* 2015; Chumová *et al.* 2021). Unikátní vlastností čeledi je ale přítomnost parciální endoreplikace (partial endoreplication, PE). Při PE orchideje duplikují pouze konkrétní část genomu, označovanou jako „P“. Pomocí PE lze tedy v pletivu dosáhnout hodnot 2C, 2C + P, 2C + 3P, 2C + 7P, 2C + 15P a tak dále (Bory *et al.* 2008). Počet proběhlých cyklů se může mezi pletivy lišit, a v důsledku toho je variabilní i převažující hodnota množství DNA v buňkách pletiva (Trávníček *et al.* 2015). Zmnožení jen části genomu je opravdu dosaženo selekcí množené části, nikoli její zpětnou redukcí (Hřibová *et al.* 2016). Dle nedávného výzkumu je patrné, že nezmnožené úseky obsahují málo genů a především repetice. Pro PE jsou tedy vybrány na geny bohatší úseky. Výsledky dále naznačují, že by mohl být i jistý vzor ve vyhýbání se replikaci konkrétních typů repetic. Ovšem na podrobnější zhodnocení nejsou znalosti repetic v genomu orchidejí dostatečné (Piet *et al.* 2022). Rozsah endoreplikované části sahá v rámci Orchidaceae od 94,7 % u *Lepanthes melpomene* (Chumová *et al.* 2021) do 12,5 % genomu u *Neotinea lactea* (Trávníček *et al.* 2021). V současné době byla ale endopolyploidie zkoumána pouze u stovek druhů diskutované čeledi (Brown *et al.* 2017; Chumová *et al.* 2021), což je nepatrný zlomek z celkové druhové bohatosti (POWO 2023). Pro rod *Neotinea* byly hodnoty PE zjištěny pomocí průtokové cytometrie (**Tabulka 1**, Trávníček *et al.* 2021). Pro diploidní taxony se absolutní množství endoreplikované DNA pohybuje od 2,89 pg u *N. maculata* po 3,64 pg u *N. conica* (taxonomicky blízká *N. lactea* endoreplikuje 3,59 pg). Při porovnání velikosti endoreplikované části s velikostí genomu, opět u diploidních taxonů, dosahuje nejvyšší relativní hodnoty PE *N. maculata*, a sice 40 %. Na opačném konci se nalézá *N. lactea*



Obrázek 9: Mitotický buněčný cyklus a z něj odvozené cykly uplatňující se při zmnožení genetické informace u živých organismů – endoreduplikace (Endocyklus), endomitóza (Endomitóza) a částečné endoreplikace (Částečný endocyklus). Převzato z Leitch & Dodsworth (2017), upraveno pro potřeby práce.

s 12,5 % genomu podléhajícímu endoreplikaci (Trávníček *et al.* 2021). Jak bylo zmíněno výše, jedná se o nejnižší prozatím detekované procento genomu. Rozpětí velikostí genomu podléhajícímu PE je opravdu úzké při faktu, že rozdíl v průměrné velikosti genomu mezi *N. lactea* a *N. maculata* je čtyřnásobný. Pokles v endoreplikované části je však pouze o jednu čtvrtinu. Vztah velikosti endoreplikované části genomu k celkovému množství genetické informace lze dobře ilustrovat na druhu *N. tridentata*. Linie středoevropská/středomediterránní endoreplikuje stejné množství DNA jako linie východomediterránní, což je 3,55 pg. Přitom východomediterránní linie má o 50 % větší genom oproti středoevropské/středomediterránní linii. Avšak triploidní jedinec předpokládaný přibližně padesátiprocentní nárůst endoreplikované složky vykazuje (Trávníček *et al.* 2021). Nárůst genomu u východomediterránní populace byl tedy zapříčiněn zmnožením částí, které endoreduplikaci nepodléhají. Mírné změny v množství endoreplikovaného materiálu lze pozorovat u krétské (nárůst) a izraelské (pokles) populace, jež se svými velikostmi genomu od středoevropské/středomediterránní populace také odchyľují. V jejich případě byly tedy zřejmě endoreplikované části zasaženy. Vzhledem k malému počtu vzorků z příslušných populací je ale tento efekt diskutabilní.

Jediný polyploidní taxon, *N. commutata*, endoreduplikuje 36 % svého genomu. Endoreplikovaná část dosahuje velikosti 7,09 pg, což je takřka přesně dvojnásobek hodnoty *N. tridentata* (Trávníček *et al.* 2021). Nutno ovšem podotknout, že jediný zkoumaný jedinec nebyl jedincem typickým. Měl totiž pouze 80 chromozomů, nikoli 84, jak je pro jedince *N. commutata* obvyklé (Pavarese *et al.* 2013).

3 Ekologie

3.1 Ekologické nároky

Jak již bylo zmíněno, rod *Neotinea* má centrum diverzity ve Středomoří (Kühn *et al.* 2019). Pouze v mediteránním klimatu dle Köppenovy-Geigerovy klasifikace podnebí (pro Evropu dle Peel *et al.* 2007) se vyskytuje *N. lactea* a *N. commutata*. *N. conica* má sice též areál pouze v západním Středomoří, ale ve vnitrozemí a na jihozápadě Pyrenejského poloostrova již zažívá studené semiaridní podnebí. V západním Středomoří se nachází i těžiště areálu *N. maculata*. Ovšem vzhledem k výskytu v západním Irsku, západní Francii a na jižním pobřeží Černého moře (Kühn *et al.* 2019) se setkává i s klimatem mírným oceánickým. Naopak v jižní a jihovýchodní Evropě má centrum rozšíření *N. tridentata*. Na Balkáně už tedy areálem významně vstupuje i na území s vlhkým kontinentálním klimatem s teplými léty. Nejširší klimatické spektrum osidluje *N. ustulata*. Vyskytuje se jak v podnebí mediteránním (např. v Itálii), mírném oceánickém (např. Francie a Velká Británie), vlhkém kontinentálním (např. Pobaltí), tak i subpolárním (např. vyšší polohy Alp a Pyrenejí; Kühn *et al.* 2019). Tali *et al.* (2004) zmiňují, že suchá léta druhu nesvědčí a v roce následujícím po suchém létě rostliny méně kvetou. Pozorování proběhlo na estonské populaci, a lze tedy předpokládat, že jižní populace budou přizpůsobeny letním přísuškům lépe. Godfery *et al.* (1933) zmiňují častější výskyt v kopcovité krajině a horách. Vliv by mohl mít vyšší srážkový úhrn ve vyšší nadmořské výšce, což by bylo v souladu s dříve zmíněným pozorováním negativního vlivu letního sucha (Tali *et al.* 2004). Existuje ale i mnoho lokalit nížinných (Tali *et al.* 2004; Průša 2019). Je možné, že kopcovitá či horská krajina představuje pro *N. ustulata* místo s lokalitami méně ovlivněnými lidskou činností, a tedy preferované.

Lidská činnost se každopádně na distribuci diskutovaných druhů projevuje velmi. Ačkoli je areál souvislý, v krajině je výskyt často ostrůvkovitý. Zemědělské využití krajiny nejen přímo ničí hlízy rostlin, ale má dlouhodobý vliv i na složení mykorhizních společenstev. Tím může být ztížen návrat na lokalitu zemědělsky využívanou a následně opuštěnou (Vogt-Schilb *et al.* 2020). Pro *N. ustulata* byl takový návrat zaznamenán, kvetoucí rostliny se objevily po šesti letech od ukončení orby (Tali *et al.* 2006).

Na malé škále, na úrovni habitatu, se jedná o druhy světlomilné a suchomilné. Vyskytují se vesměs především v rozvolněných suchých travních ekosystémech, vstupují ale i do světlých lesů a řídkých mediteránních křovin (Kühn *et al.* 2019). Pouze *N. ustulata* osidluje i vlhčí biotopy (Tali *et al.* 2004). Všechny druhy mají v oblíbě slabě alkalické vápnité půdy, ale nejsou na ně vázány (Kühn *et al.* 2019). Jsou známy například lokality *N. maculata* na břidlicovém podloží (Godfery *et al.* 1933) a *N. ustulata* z fylitu (Djordjević & Tsiftsis 2019). *N. tridentata* a *N. ustulata* byly naopak zaznamenány i na podloží ultrabazickém, na hadci (Djordjević *et al.* 2012).

Rozsah pH je též široký, naznačující absenci konkrétní preference. Pro *N. maculata* jsou známy hodnoty mezi 5,76 a 7,84 (Duffy *et al.* 2009) a pro *N. ustulata* je rozpětí 4,9 až 7,6 (Tali *et al.* 2004).

3.2 Mykorhizní interakce

Interakce s houbovým symbiontem je pro rod *Neotinea*, stejně jako pro celou čeleď Orchidaceae, naprosto zásadní. Drobná prachová semena neobsahují dostatek živin pro vznik dospělé rostliny (Leake 1994). Nutriční podporu klíčovému semeni poskytují asociující houbové hyfy. Díky nim se ze semene vyvíjí nezelený útvar zvaný protokorm. V této rané fázi ontogeneze lze orchideje považovat za zcela mykoheterotrofní, neboť jim houbový symbiont poskytuje i organický zdroj uhlíku (Rasmussen & Rasmussen 2009). Mladá orchidej stráví ve stádiu protokormu vyšší jednotky měsíců (Ponert *et al.* 2011; Nabieva 2021). Malá část orchidejí zůstává závislá na mykorhizní symbióze po celý život (Leake 1994). Většina druhů, stejně tak i všichni zástupci rodu *Neotinea*, po tvorbě prvního zeleného listu přecházejí na autotrofní způsob výživy. Jejich kořeny však i tehdy zůstávají prorostlé hyfami hub v symbiotické interakci známé jako orchideoidní mykorhiza (OrM; Jacquemyn *et al.* 2017). Tento případ se od ostatních typů mykorhiz odlišuje přítomností morfologicky unikátních pelotonů z hyf tvořených pod buněčnou stěnou, těsně obklopených cytoplazmatickou membránou rostlinné buňky (Rasmussen & Rasmussen 2009). Pelotony pozorované v rodě *Neotinea* se nacházejí pouze v buňkách korové vrstvy kořenů (Pecoraro *et al.* 2012b), což je v souladu s pozorováním v jiných rodech čeledi (Hadley & Williamson 1972; Pecoraro *et al.* 2012a). Stejně koordinovaná je i infekce embrya. K ní dochází pouze v jeho bazální části (Li *et al.* 2022; Ma *et al.* 2022).

Nejvýznamnější houby vstupující do OrM jsou v anglicky psané literatuře označovány souhrnným pojmem „*Rizoctonia* fungi“. Jedná se pouze o označení bez taxonomického významu, neboť zahrnutí zástupci tvoří polyfyletickou skupinu sestávající ze stopkovýtrusých hub čeledí Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae (Cantharellales) a Serendipitaceae (Sebacinales; Jacquemyn *et al.* 2017). U všech tří čeledí je rozšířenou strategií saprotrofie, a ani vstup do mykorhizního vztahu jejich schopnosti v tomto směru neomezil (Veldre *et al.* 2013; Kohler *et al.* 2015). Jak u Ceratobasidiaceae, tak i Serendipitaceae se dále vyskytují rostlinní endofyté (Veldre *et al.* 2013; Weiß *et al.* 2016) a u první zmíněné i parazité (McMahon & Purwantara 2016). Mykorhizní interakce s orchidejemi se ale mohou účastnit i některé houby běžně ektomykorhizní, jako třeba stopkovýtrusé rody *Hymenogaster* a *Inocybe*, vřeckovýtrusý *Tuber* (Bidartondo *et al.* 2004).

Za globálně nejvýznamnější čeleď OrM je považována Tulasnellaceae (Jacquemyn *et al.* 2017). V tomto směru je rod *Neotinea* výjimkou, neboť dominantní čeledí ve vzorcích všech analyzovaných druhů byla Ceratobasidiaceae (Liebel *et al.* 2010; Pecoraro *et al.* 2012b; Schweiger *et al.* 2017). V prvotní studii bylo diskutováno možné zkreslení výsledků využitím primerů dobře souhlasících s Ceratobasidiaceae, ovšem značně hůře s Tulasnellaceae (Pecoraro *et al.* 2012b). Podobná skladba

byla detekována i u dalších druhů (Liebel *et al.* 2010; Schweiger *et al.* 2017). V porovnání s příbuznými rody subtribu Orchidinae vykazují podobnou tendenci asociovat s Ceratobasidiaceae například zástupci rodu *Platanthera*, oproti tomu v rodech *Ophrys* a *Orchis* velmi značně převažuje symbióza se zástupci Tulasnellaceae napříč stanovišti (Mennicken *et al.* 2023). Rod *Neotinea* obsahuje z pohledu mykorhizních interakcí méně specializované druhy. Maximální zaznamenaný počet taxonomických jednotek (operational taxonomic unit, OTU) přítomných na jednom stanovišti je 21 u jedinců *N. lactea* (Jacquemyn *et al.* 2014). U nejrozšířenější *N. ustulata* byla nalezena mnohem menší diverzita. Analýza rostlin z alpské pasené louky odhalila sedm OTU. Šest jich odpovídalo čeledi Ceratobasidiaceae, z toho pět rodu *Thanatephorus*, a jedna rodu *Tulasnella* (Tulasnellaceae; Schweiger *et al.* 2017). Ovšem analýza dvou lokalit ve Francii vzájemně vzdálených 15 km ukázala zajímavý rozpor. Na první lokalitě se dominantní ukázala čeleď Tulasnellaceae (70 %), doprovázená čeleděmi Ceratobasidiaceae (20 %), Serendipitaceae (5 %) a Thelephoraceae (5 %). Na druhé lokalitě byla jako hlavní OrM symbiont zastoupena čeleď Ceratobasidiaceae (70 %), následovaná Tulasnellaceae (mírně pod 20 %) a Thelephoraceae (mírně nad 10 %). Průměrně byly rostliny asociovány s 10,5 OTU. Klimatické podmínky na stanovištích byly díky značné blízkosti a stejné nadmořské výšce shodné. Pozoruhodná byla zvýšená přítomnost čeledi Serendipitaceae napříč druhy s výskytem na obou stanovištích a obecně vyšší diverzita společenstev OrM na první lokalitě (Mennicken *et al.* 2023). Rozdíl mezi stanovišti nejspíš bude na úrovni mikroklimatických podmínek. První lokalita leží na severní straně kopce, zatímco druhá má expozici převážně jižní. Pro potvrzení, že zmíněný případ majoritní interakce s Tulasnellaceae není jen výjimkou, bude potřeba další výzkum. Mohl by být rovnou spojen s otázkou blízkosti mykorhizních společenstev v rámci variet. U *N. maculata* se opět nejčastěji vyskytují zástupci čeledi Ceratobasidiaceae (4 OTU), jednou byl zaznamenán rod *Tulasnella* a třikrát rod *Leptodontidium* (Leptodontiaceae; Liebel *et al.* 2010). Význam rodu *Leptodontidium* v mykorhize je ovšem nejistý, neboť se jedná o jinak široce rozšířeného endofyta (Mesny *et al.* 2021), který je též přítomný v ektomykorhizních družících na stanovišti (Liebel *et al.* 2010). Z tohoto pohledu je škoda, že nejsou na přítomnost endofytů testovány i druhy považované za nemykorhizní. Přítomnost endofytických hub u některých takových druhů již byla prokázána (Quilliam & Jones 2012), a mohla by tak posloužit jako kontrola pozadí na lokalitě. Poslední druh s podrobněji zjištěným mykobiomem je *N. tridentata*. Vzorkování u diskutovaného druhu proběhlo v Toskánsku na chudém horském travním porostu na vápnitém podloží. Šest z deseti zkoumaných rostlin bylo asociováno alespoň s jedním zástupcem čeledi Ceratobasidiaceae a u jednoho jedince pak dominovala čeleď Tulasnellaceae. Další dvě rostliny byly v interakci s ektomykorhizními zástupci čeledí Pezizaceae a Hymenogastraceae (Pecoraro *et al.* 2012b). Rod *Neotinea* je, co se mykorhizních partnerů týče, generalistický. Dle stanoviště je spektrum hub odlišné.

Častá detekce čeledi Ceratobasidiaceae může být zapříčiněna jejím častějším výskytem ve Středomoří oproti Tulasnellaceae (Jacquemyn *et al.* 2017).

Význam mykorhizní interakce při klíčení semene byl již zmíněn (viz výše). Je ale třeba doplnit informaci o stavu v dospělé rostlině. Analýza toku látek *in situ* mezi symbionty v případě OrM probíhá pomocí stabilních izotopů běžně přítomných v prostředí. Jedná se o uhlík ^{13}C , dusík ^{15}N , vodík ^2H a kyslík ^{18}O (Liebel *et al.* 2010; Schweiger *et al.* 2017). Fosfor má pouze jeden stabilní izotop (ChemLin 2022), je tedy pro analýzu dlouhodobého toku živin v prostředí nepoužitelný. Vyžití zmíněných stabilních izotopů vychází z pozorování, že orgány hub bývají o zmíněné prvky obohaceny. Trend v zastoupení izotopů je přenosný na partnera v příslušném mykorhizním vztahu dle směru toku živin (Ziegler 1989; Gleixner *et al.* 1993; Högberg *et al.* 1999). Výsledky analýzy izotopů ^{13}C a ^{14}N rozdělují fotosyntetizující orchideje do tří kategorií: orchideje značně obohacené o oba izotopy, orchideje obohacené jen o ^{15}N a jen mírně o ^{13}C a orchideje obohacené o ^{15}N a zároveň ochuzené o ^{13}C . Do první kategorie spadají druhy interagující s ektomykorhizními houbami, které od partnerských hub přijímají jak organický uhlík, tak dusík. Označujeme je jako částečně mykoheterotrofní (Gebauer & Meyer 2003; Liebel *et al.* 2010). Zástupci rodu *Neotinea* jsou řazeni do druhé a třetí skupiny. Ve skupině druhé se nachází *N. tridentata* (Liebel *et al.* 2010). Ve třetí potom *N. maculata* (Liebel *et al.* 2010) a *N. ustulata* (Schweiger *et al.* 2017). Pokles obsahu uhlíku ^{13}C ve třetí skupině je interpretován jako přesun organických látek z orchideje do mykobionta. Pro orchideje spadající do této kategorie je společným znakem výskyt v otevřených habitatech (Liebel *et al.* 2010). Izotop vodíku ^2H bývá měřen jako doprovodný prvek k ^{13}C . Deplece ^{13}C v orchidejích třetí skupiny totiž může být interpretována i jako obousměrný tok uhlíku s převažujícím směrem k houbě. ^{18}O potom slouží jako kontrola, zda nedochází k obohacení vodíkem prostřednictvím odparu vody (Ziegler 1989; Schweiger *et al.* 2017). Studie s využitím všech tří, respektive čtyř, izotopů ukázala, že k obohacení izotopem ^2H při současném obohacení o ^{15}N a poklesu ^{13}C opravdu dochází (i u *N. ustulata*). Autoři na základě zjištění označili i tyto plně fotosyntetické orchideje za částečně mykoheterotrofní. Navíc zastoupená *N. ustulata* spolu s dalšími lučními druhy vykazovaly výrazně vyšší celkový obsah dusíku (přibližně 20% nárůst) v pletivech oproti kontrole (Schweiger *et al.* 2017). Cesta vodíku do těla rostliny ovšem nemusí být spojena pouze s uhlíkem (v organické podobě) a kyslíkem (v podobě vody, či hydroxylové skupiny). Možný je též přechod ve formě amoniaku, tedy závislý pouze na dusíku. Transport dusíku ve formě amonného kationtu (nikoli aminokyselin) byl již prokázán pro arbuskulární mykorhizu (Govindarajulu *et al.* 2005). Pokud by těžší izotop vodíku putoval touto cestou, došlo by k obohacení nezávisle na uhlíku či kyslíku. Vyloučení této možnosti by potřebovalo podrobný zbor.

3.3 Reprodukční strategie

Reprodukce rostliny může být dosaženo buď vegetativně, nebo generativně. Vegetativní rozmnožování není v rodě *Neotinea* příliš rozšířené. Druhy jsou schopny tvořit drobné trsy, ovšem jako hlavní strategie převažuje množení generativní. Pro celou čeleď Orchidaceae je typická přítomnost brylek (polinarií, sg.: polinarium). Brylka je útvar vzniklý modifikací tyčinky. Pylová zrna jsou ve výsledku slepena do hrudek zajišťujících při přenosu na bliznu přítomnost mnoha pylových zrn. Vzhledem k drobnosti a potenciálnímu vysokému počtu budoucích semen je tak orchidej pojištěna, že nebude tvořit semeník pouze kvůli pár událostem oplození. Orchidej může mít v květu brylku jednu, nebo více. V případě rodu *Neotinea* se v květu nacházejí pollinaria dvě (Kemeç Hürkan *et al.* 2015; PalDat 2024). V rámci subtribu Orchidinae se jedná o převažující případ, výjimku tvoří monofyletická trojice rodů *Anacamptis*, *Himantoglossum* a *Serapias* s jednou rozvětvenou brylkou (Pridgeon *et al.* 1997; PalDat 2024). Brylky jsou značně těžké a přenos větrem by byl velmi neefektivní. Orchideje tedy využívají k přenosu brylek jako vektorů živočichy – převážně hmyz. Tomu je brylka přizpůsobena přítomností lepivého terčíku (tzv. viscidium). Při kontaktu terčíku s opylovačem dochází k přilepení brylky. Brylka po přilepení na opylovače ještě provádí specifický ohybový pohyb, čímž se teprve dostává do pozice vhodné pro navázání pevného kontaktu s bliznou. Tento pohyb je různě časovaný u různých druhů, kdy časování závisí především na době zdržení opylovače v květu. *N. ustulata* má květy snadno dostupné a opylovač se v květu příliš nezdržuje (12 až 22 sekund). Rekonfigurace tak trvá pouze 35 až 40 sekund. Oproti tomu například v rodě *Ophrys* může jít i o 2 až 4 minuty (Lanzino *et al.* 2022).

Opylovače je ovšem potřeba do květu nejprve nalákat. Čeleď Orchidaceae je ve strategiích lákání opylovačů velmi variabilní. V obecné rovině lze přístupy rozdělit na strategie odměňující a šálivé (též deceptivní, či klamavé). Za odměňující lze považovat kupříkladu tvorbu nektaru. Klamavé strategie představuje například obecná absence nektaru v květu, specializovanější napodobování květů jiných rostlin, či sexuální deceptce (Jersáková *et al.* 2006). Pět ze šesti v současnosti uznaných druhů rodu *Neotinea* tvoří šálivé květy bez odměny. Jedná se konkrétně o potravní deceptci na základě obecné absence nektaru v květech.

Jediný druh, u něž byla zjištěna produkce nektaru, je bazální *N. maculata*. K sekreci sacharidů by mělo docházet na bázi pysku (Duffy *et al.* 2009). Jiný průzkum však nektar nedetekoval (Claessens & Kleynen 2018). U zmíněného druhu je též prokázána autogamie. *N. maculata* vykazuje výrazné anatomické přizpůsobení vzhledem ke zvolenému způsobu reprodukce. Blizna ve formě dvou cípů vychází ze stran sloupku, oproti běžnému umístění na spodní straně. Díky širokému rozevření chlopní držících brylky dojde při ohybu brylek a jejich kontaktu s cípy blizny (Claessens & Kleynen 2018). Efektivita autogamie v produkci semen je shodná s xenogamií (Duffy *et al.* 2009). Kromě produkce nektaru ale květy *N. maculata* i slabě vanilkově voní (Claessens & Kleynen 2018). Vůně obsahuje

minimálně 23 složek s hlavním zastoupení alifatických uhlovodíků (1-decen, pentadekan a heptadekan) a esterů (ethyl dodekanoát). Za sladkou vůní stojí pravděpodobně především estery (D'Auria *et al.* 2021). Tato autogamická orchidej má tedy tendenci opylovače lákat a je v tom úspěšná. Při dvanáctihodinovém pozorování proběhlo průměrně 1,25 návštěvy za hodinu. Z návštěvníků byla určena pouze samotářská včela *Lasioglossum villosulum* (Hymenoptera; Fernandes *et al.* 2005). Existují dále i záznamy o přítomnosti drobných brouků (Coleoptera; Claessens & Kleynen 2018), či mravenců skupiny *Temnothorax exilis* (Hymenoptera; García-Gila & Blasco-Aróstegui 2021) nesoucích brylky.

Lákání nabývá značného významu u šálivých květů zbytku rodu, kde na opylovače žádná odměna nečeká. Odér *N. lactea* obsahoval opět největší zastoupení alifatických nasycených uhlovodíků (pentadekan, heptadekan) a esterů (isopropyl palmitát, ethyl dodecanoát; D'Auria *et al.* 2021). Opylovači tohoto druhu nejsou známi.

Jinou strukturu měla vůně šálivého květu *N. tridentata*. Zde byly hlavním prvkem vůně ketony (α -ionon, 2,6-di-t-butylbenzochinon) a alkany (pentadekan, hexadekan). Analýza jedné rostliny z jižní Itálie odhalila celkem 21 složek (D'Auria *et al.* 2021). Naproti tomu studie tří rostlin ze severní Itálie identifikovala u nemanipulované rostliny *in situ* 77 složek s převahou esterů (methyl 2-methylbutanoát), aldehydů (nonanal, decanal) a terpenů (β -pinen). U ustřížených květů při detekci pokleslo množství zaznamenaných látek na 63 s obecným poklesem četnosti, vyjma alkoholů a fenolů vykazujících nárůst (Manzo *et al.* 2014). Za rozdíly ve výsledcích stojí částečně odlišné metodické provedení, kdy ve druhé zmíněné studii bylo při analýze v prostředí umožněno proudění vzduchu a byl analyzován odér přímo v přílbě, zatímco v první studii byla přesazená rostlina pod skleněným poklopem s přítomným absorpčním agens bez proudění. D'Auria *et al.* (2021) diskutují i možnost odlišných převažujících opylovačů ve zkoumaných oblastech.

N. ustulata vykazuje opět odlišný bouquet. Jako volatilní složky byly identifikovány především terpeny (α -pinen, β -myrcen), přičemž extrakce slabě těkavých látek pomocí roztoku odhalila především dlouhé alkany (pentakosan, heptakosan) a alkeny (trikosen a izomery heptacosenu) doprovázené v menší míře aldehydy (Martel *et al.* 2021). Alkeny byly v jiné studii nalezeny ve značné míře i ve volatilní složce. 9-tricosen tvořil 24,55 % a heinecosan 9,72 % z celkového množství zachycených látek. Dále byly v bouquetu zastoupeny především další alkany a alkoholy (D'Auria *et al.* 2021). Při bližším pohledu pouze na uhlovodíky může být obsah izomeru 11-trikosenu v extraktu více než 42 % (Schiestl & Cozzolino 2008). Jistá specializace *N. ustulata* na produkci alkenů jako atraktantů je patrná v porovnání s ostatními zástupci rodu, u nichž byly alkeny v oděru detekovány jen sporadicky nebo vůbec (Schiestl & Cozzolino 2008; Manzo *et al.* 2014; D'Auria *et al.* 2021). Podobná situace panuje ve složení kutikulárních vosků. Zastoupení izomerů trikosenu a pentacosenu je u obou variet *N. ustulata* signifikantně vyšší než u ostatních testovaných zástupců (Martel *et al.*

2023). Výskyt alkenů ve vůni je častý u orchidejí zaměřených na sexuální šálení (Schiestl & Cozzolino 2008). Má to své opodstatnění. Konkrétně 9-trikosen byl například detekován u druhu *Musca domestica* a úspěšně testován i jako syntetický sexuální atraktant (Carlson *et al.* 1971). (Z)-11-trikosen byl detekován přímo u některých zástupců čeledi Tachinidae (Martel *et al.* 2021). Tato skutečnost souhlasí s pozorováním kuklice *Tachina magnicornis* (Diptera) při návštěvě květenství. Interakce probíhá tak, že kuklice přistává na tmavém vrcholu květenství a hlavou dolů prohledává sosákem květy. Brylky se jí tak přilepí na spodní stranu sosáku (Godfery *et al.* 1933). Květy navštěvují kromě řádu Diptera (především rod *Tachina*) i jiní opylovači, zejména různí zástupci řádu Hymenoptera. Mezi Diptera a Hymenoptera se řadí 90 % všech zaznamenaných jedinců opylovačů. Mezi varietami panuje jistá odlišnost v poměru zmíněných skupin (Martel *et al.* 2021). Rozdíl však může být ovlivněn spektrem a abundancí potenciálních opylovačů na lokalitě, k jejichž charakterizaci nedošlo. Efektivnější opylovači jsou zástupci řádu Diptera. Jednak pro svůj charakteristický přístup ke květům shora, ale též jelikož si brylky na rozdíl od blanokřídlých nedokážou odstranit. Častějšími návštěvníky květenství jsou co do pohlaví samci, což je v souladu s efektem produkce izomerů trikosenu (Martel *et al.* 2021). Jak již bylo zmíněno výše, přistávací plochou pro mouchy je kontrastní tmavý vrchol květenství. Jeho role v atrakci opylovače je značná, neboť při jeho odstranění dojde k výraznému poklesu návštěv květenství. Význam potvrzuje i zakládání tobolek především na spodu a ve středu květenství. S postupem času je otevřeno stále více květů, kontrastní vrchol se neustále zmenšuje a v důsledku toho dochází k poklesu návštěv (Martel *et al.* 2021). Opylení je ovšem navzdory probíhající specializaci málo časté, průměrný počet vytvořených tobolek na kvetoucího jednice v estonských populacích nepřesáhl čtyři. Ani mezi varietami nebyl v tomto ukazateli nalezen rozdíl (Tali *et al.* 2004).

Navzdory drobným rozdílům v kompozici oděrů a atrakčních strategiích je spektrum opylovačů v rámci rodu *Neotinea* značně podobné (Scopece *et al.* 2007). Druhy tak potenciálně čelí riziku hybridizace. Četnost hybridizačních událostí lze při stejném složení spektra opylovačů snížit nastolením postpolinačních bariér při oplodnění (prezygotické bariéry) a v následném vývoji hybrida (postzygotické bariéry; Grant 1963; Rick 1963). Nastolení bariér bylo zkoumáno u trojice druhů *N. lactea*, *N. ustulata* a *N. tridentata*. V párech s *N. lactea* bylo postpolinační izolace dosaženo ze 42 a 49 %, ovšem v páru *N. tridentata* x *N. ustulata* z 90 % (Scopece *et al.* 2007). Vyšší izolace mezi druhy *N. tridentata* a *N. ustulata* může být zaviněna překryvem jejich dob kvetení. Riziko vzájemného křížení je tak vyšší než s časněji kvetoucí *N. lactea* (Kühn *et al.* 2019). Izolace *N. tridentata* a *N. ustulata* se ukazuje silnější, rostou-li ve smíšené populaci. Tehdy dochází k posílení prezygotické bariéry, čímž se rostliny chrání před investicí zdrojů do tvorby defektních hybridních semen (Pellegrino 2016). Avšak vzhledem k zaznamenaným hybridům (viz kap. 1.2.7) je reprodukční bariéra částečně propustná.

Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabýval rodem *Neotinea* na území Evropy. Zde shrnuji nejdůležitější poznatky o jeho fylogenezi, vnitřní taxonomické struktuře, velikosti genomu, endoreplikaci, ekologických nárocích, mykorhizních interakcích a reprodukčních způsobech. Zároveň poukazují na méně probádané aspekty a možnosti směřování navazujícího výzkumu.

Po odlišení od rodu *Orchis* bylo umístění rodu *Neotinea* v rámci subtribu Orchidinae nejasné. Nyní se rod jeví jako sesterský ke skupině orchidejí s 36 chromozomy (*Anacamptis*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Ophrys*). Tato pozice byla podpořena plastidovými, mitochondriálními i jadernými markery. Jednoznačné vymezení vztahů v rámci subtribu však čeká na své rozřešení, neboť nejnovější mnoha sekvencemi podpořená studie se zabývala fylogenetickou problematikou na úrovni celé čeledi Orchidaceae a rodu *Neotinea* byla věnována jen omezená pozornost.

V současnosti čítá rod 6 druhů. Lze očekávat, že se množství změní, neboť se v molekulárních analýzách *N. conica* a *N. commutata* ukázaly jako vnitřní skupiny druhů *N. lactea* a *N. tridentata*. Na druhou stranu bylo u druhu *N. tridentata* odhaleno větší množství sesterských linií, jejichž taxonomická klasifikace by zasluhovala důkladné zhodnocení.

Jak na molekulární, tak na ekologické úrovni vykazuje rod značnou variabilitu. Rozdíl ve velikosti genomu je sice čtyřnásobný, ovšem rozpětí množství endoreplikované části genomu je napříč druhy značně úzké. V relativních číslech tak *N. lactea* díky své značné velikosti genomu replikuje v průměru jen 12,5 % genomu, což je nejméně v rámci zkoumaných zástupců Orchidaceae. Rod *Neotinea* tak představuje ideální objekt ke studiu parciální endoreplikace a dvourychlostní evoluce genomu, neboť je zjevné, že replikovaná část genomu je evolučně velmi stabilní, zatímco nereplikovaná část podléhá rozsáhlým změnám.

Z molekulárního pohledu byl podrobněji zkoumán tetraploidní druh *N. commutata*. Pro autopolyploidní vznik z *N. tridentata* svědčí absence chromozomů se znaky specifickými pro *N. lactea*, velikost genomu i množství endoreplikované DNA odpovídající spíše dvojnásobným hodnotám *N. tridentata*. Účast *N. lactea* na vzniku taxonu podporují jen plastidové markery. Podrobná analýza uniparentálně děděné DNA je tak nezbytná pro potvrzení či vyvrácení vlivu *N. lactea*.

V mykorhizních interakcích se nejčastěji vyskytuje jako majoritní symbiont čeledi Ceratobasidiaceae, a to napříč druhy. Zaznamenána byla ale i lokalita s dominantní Tulasnellaceae. Vzhledem k tomu, že většina analyzovaných druhů byla zkoumána pouze na jedné či dvou lokalitách, je otázkou, zda zdánlivá preference pro Ceratobasidiaceae není jen projevem nedostatečného vzorkování. Opět i zde by byla vhodná podrobnější analýza, která by mohla mít zásadní význam pro ochranu druhů, například při výběru vhodných lokalit pro reintrodukce.

V reprodukčních strategiích je též jistý gradient. V rodě je přítomna autogamie (s odměnou), druhy plně generalistické s obecným potravním šálením, i druh specializovaný s mírnou sexuální deceptí prostřednictvím vůně. Nehledě na rozdílné strategie je vůně komplexní u všech druhů. Co do konkrétního složení se ale výsledky studií liší. Diskutovaný je vliv místně specifického spektra opylovačů, ale roli by mohl hrát i zvolený metodický přístup. Souhrnná studie s jednotným metodickým postupem napříč lokalitami by k otázce přítomnosti lokálního přizpůsobení ke spektru opylovačů jistě pomohla nalézt odpověď.

Navzdory malému počtu taxonů je rod velmi rozmanitý v mnoha rovinách. Ačkoli poznání rodu od jeho redefinování dále postoupilo, z předložené rešeršní práce vyplývá, že téma rodu *Neotinea* stále ještě poskytuje mnoho prostoru pro výzkum.

Seznam použité literatury

- Aceto S., Caputo P., Cozzolino S., Gaudio L., Moretti A. (1999) Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: Morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**:67–76.
- Addam K., Kebbe I., Bou-Hamdan M., Hout K. (2014) *Neotinea tridentata* var. *libanotica* (Orchidaceae), a new species from Lebanon. *Journal of Botanical Research* **5**:35–38.
- Ames O. (1938) Resupination as a diagnostic character in the Orchidaceae with special reference to *Malaxis monophyllos*. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University* **6**:145–183.
- Bateman R.M., Hollingsworth P.M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A.M., Chase M.W. (2003) Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **142**:1–40.
- Bateman R.M., Pridgeon A.M., Chase M.W. (1997) Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto. *Lindleyana* **12**:113–141.
- Beaulieu J.M., Leitch I.J., Patel S., Pendharkar A., Knight C.A. (2008) Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist* **179**:975–986.
- Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T.D., Read D.J. (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **271**:1799–1806.
- Bory S., Catrice O., Brown S., Leitch I.J., Gigant R., Chiroleu F., Grisoni M., Duval M.-F., Besse P. (2008) Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Genome* **51**:816–826.
- Brown S.C., Bourge M., Maunoury N., Wong M., Wolfe Bianchi M., Lepers-Andrzejewski S., Besse P., Siljak-Yakovlev S., Dron M., Satiat-Jeunemaître B. (2017) DNA remodeling by strict partial endoreplication in orchids, an original process in the plant kingdom. *Genome Biology and Evolution* **9**:1051–1071.
- Carlson D.A., Mayer M.S., Silhacek D.L., James J.D., Beroza M., Bierl B.A. (1971) Sex attractant pheromone of the house fly: Isolation, identification and synthesis. *Science* **174**:76–78.
- Cauwet-Marc A.M., Balayser M. (1984) Les genres *Orchis* L., *Dactylorhiza* Necker ex Newski, *Neotinea* Reichb. et *Traunsteinera* Reichb.: caryologie et proposition de phylogénie et d'évolution. *Botanica Helvetica* **94**:391–406.
- ChemLin (2022) [online] URL: <https://www.chemlin.org/> (navštíveno 25. března 2024).
- Claessens J., Kleyne J. (2018) The pollination of European orchids Part 7. Autogamy: *Neotinea maculata* and *Corallorhiza trifida*. *Journal of the Hardy Orchid Society* **15**:50–57.
- Classens J., Lewin J.-M. (1995) À propos d'*Orchis conica* Willd. Dans l'Aude et les Pyrénées-Orientales et de son hybride avec *Orchis ustulata* L. *L'Orchidophile* **117**:105–113.
- Cozzolino S., Aceto S., Caputo P., Menale B. (1998) Characterization of *Orchis x dietrichiana* Bogenh., a natural orchid hybrid. *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **132**:71–76.

- Cozzolino S., Caputo P., Aceto S., Widmer A., Dafni A. (2001) Speciation processes in Eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: Molecular evidence and the role of pollination biology. *Israel Journal of Plant Sciences* **49**:91–103.
- D’Auria M., Lorenz R., Mecca M., Racioppi R., Romano V.A., Viggiani L. (2022) The scent of *Neotinea* orchids from Basilicata (Southern Italy). *Natural Product Research* **36**:3741–3743.
- Del Prete C., Mazzola P. (1995) Endemism and speciation in the orchids of Mediterranean Islands. *Ecologia Mediterranea* **21**:119–134.
- D’Emerico S., Bianco P., Medagli P. (1992) Karyological studies on Orchidaceae. Tribe Ophrydeae, subtribe Serapiadinae. *Caryologia* **45**:301–311.
- D’Emerico S., Bianco P., Medagli P., Ruggiero L. (1990) Karyological studies of some taxa of the genera *Himantoglossum*, *Orchis*, *Serapias* and *Spiranthes* (Orchidaceae) From Apulia (Italy). *Caryologia* **43**:267–276.
- D’Emerico S., Cozzolino S., Pellegrino G., Pignone D., Scrugli A. (2002) Heterochromatin distribution in selected taxa of the 42-chromosomes *Orchis* s. l. (Orchidaceae). *Caryologia* **55**:55–62.
- Djordjević V., Tsiftsis S. (2019) Patterns of orchid species richness and composition in relation to geological substrates. *Wulfenia* **26**:1–21.
- Djordjević V., Tsiftsis S., Jakovljević K., Šinžar-Sekulić J., Vukojičić S. (2012) First record of a natural hybrid *Neotinea* × *dietrichiana* (Orchidaceae) in Serbia. *Phytologia Balcanica* **18**:163–171.
- Dressler R.L. (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides press, Oregon. 342 s.
- Duffy K.J., Scopece G., Cozzolino S., Fay M.F., Smith R.J., Stout J.C. (2009) Ecology and genetic diversity of the dense-flowered orchid, *Neotinea maculata*, at the centre and edge of its range. *Annals of Botany* **104**:507–516.
- Fernandes F., Pinheiro de Carvalho M.Â., Aguiar A. (2005) Pollination of Madeiran indigenous Orchids. In: Pinheiro de Carvalho, M.A.A., *et al.* (Eds.). *Proceedings of the II Symposium of Island Ecosystems*. Pp. 25–36. Centre for Macaronesian Studies, Madeira.
- Gamarra R., Dorda E., Scrugli A., Galán P., Ortúñez E. (2007) Seed micromorphology in the genus *Neotinea* Rchb.f. (Orchidaceae, Orchidinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **153**:133–140.
- García-Gila J., Blasco-Aróstegui J. (2021) First report on the pollination of *Neotinea maculata* (Orchidaceae) by minor worker ants of the *Temnothorax exilis* group (Hymenoptera: Formicidae). *Mediterranean Botany* **42**:e71171.
- GBIF.org (2024) Global Biodiversity Information Facility Free and Open Access to Biodiversity Data [online] URL: <https://www.gbif.org/> (navštíveno 18. dubna 2024).
- Gebauer G., Meyer M. (2003) ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist* **160**:209–223.

- Gleixner G., Danier H.J., Werner R.A., Schmidt H.L. (1993) Correlations between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiology* **102**:1287–1290.
- Godfery M.John., Godfery M.J., Godfery H.M. (1933) *Monograph & iconograph of native British Orchidaceae*. Cambridge university press, Cambridge. 536 s.
- Govindarajulu M., Pfeffer P.E., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers P.J., Shachar-Hill Y. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **435**:819–823.
- Grant V. (1963) *The origin of adaptations*. New York: Columbia University Press. [online] URL: <http://archive.org/details/originofadaptati0000gran> (navštíveno 3. dubna 2024).
- Hadley G., Williamson B. (1972) Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytologist* **71**:1111–1118.
- Haraštová-Sobotková M., Jersáková J., Kindlmann P., Čurn L. (2005) Morphometric and genetic divergence among populations of *Neotinea ustulata* (Orchidaceae) with different flowering phenologies. *Folia Geobotanica* **40**:385–405.
- Hermosilla C.E., Sabando J. (1996) Notas sobre orquídeas II. Estudios del Museo de Ciencias Naturales de Álavaie **10**:119–140.
- Högberg P., Plamboeck A.H., Taylor A.F.S., Fransson P.M.A. (1999) Natural ^{13}C abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:8534–8539.
- Hříbová E., Holušová K., Trávníček P., Petrovská B., Ponert J., Šimková H., Kubátová B., Jersáková J., Čurn V., Suda J., Doležel J., Vrána J. (2016) The enigma of progressively partial endoreplication: new insights provided by flow cytometry and next-generation sequencing. *Genome Biology and Evolution* **8**:1996–2005.
- Hürkan K., Taşkin K.M. (2021) Internal transcribed spacer (ITS) fails barcoding of the genus *Neotinea* Rchb.f. (Orchidaceae). *Journal of Agricultural Sciences* **27**:69–75.
- Chumová Z., Záveská E., Hloušková P., Ponert J., Schmidt P.-A., Čertner M., Mandáková T., Trávníček P. (2021) Repeat proliferation and partial endoreplication jointly shape the patterns of genome size evolution in orchids. *The Plant Journal* **107**:511–524.
- Inda L.A., Pimentel M., Chase M.W. (2012) Phylogenetics of tribe Orchideae (Orchidaceae: Orchidoideae) based on combined DNA matrices: inferences regarding timing of diversification and evolution of pollination syndromes. *Annals of Botany* **110**:71–90.
- IPNI (2024) International Plant Names Index [online] URL: <https://www.ipni.org/citeus> (navštíveno 11. dubna 2024).
- Jacquemyn H., Brys R., Merckx V.S.F.T., Waud M., Lievens B., Wiegand T. (2014) Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytologist* **202**:616–627.
- Jacquemyn H., Duffy K.J., Selosse M.-A. (2017) Biogeography of orchid mycorrhizas. In: Tedersoo L (ed) *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Springer International Publishing, Cham, pp 159–177. [online] URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_8 (navštíveno 19. března 2024).

- Jaskani M.J., Kwon S.W., Kim E.J., Ko B.R. (2004) Polyploidy affects fruit characteristics, seed morphology, and germination in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Horticulture environment and biotechnology* **45**:233–237.
- Jersáková J., Johnson S.D., Kindlmann P. (2006) Mechanism and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**:219–235.
- Jin W.-T., Schuiteman A., Chase M.W., Li J.-W., Chung S.-W., Hsu T.-C., Jin X.-H. (2017) Phylogenetics of subtribe Orchidinae s.l. (Orchidaceae; Orchidoideae) based on seven markers (plastid matK, psaB, rbcL, trnL-F, trnH-psba, and nuclear nrITS, Xdh): implications for generic delimitation. *BMC Plant Biology* **17**:222.
- Kemeç Hürkan Y., Hürkan K., AKI C. (2015) *In vitro* pollen germination of orchids traditionally used to produce salep. *European Journal of Environmental Sciences* **5**:148–152.
- Kohler A., Kuo A., Nagy L.G., Morin E., Barry K.W., Buscot F., Canbäck B., Choi C., Cichocki N., Clum A., Colpaert J., Copeland A., Costa M.D., Doré J., Floudas D., Gay G., Girlanda M., Henrissat B., Herrmann S., Hess J., Högberg N., Johansson T., Khouja H.-R., LaButti K., Lahrman U., Lévassieur A., Lindquist E.A., Lipzen A., Marmeisse R., Martino E., Murat C., Ngan C.Y., Nehls U., Plett J.M., Pringle A., Ohm R.A., Perotto S., Peter M., Riley R., Rineau F., Ruytinx J., Salamov A., Shah F., Sun H., Tarkka M., Tritt A., Veneault-Fourrey C., Zuccaro A., Tunlid A., Grigoriev I.V., Hibbett D.S., Martin F. (2015) Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics* **47**:410–415.
- Kreutz K. (2004) *Kompendium der Europäischen Orchideen / Catalogue of European Orchids*, First edition. Landgraaf, Netherlands. 240 s.
- Kühn R., Pedersen H.Æ., Cribb P. (2019) *Field guide to the orchids of Europe and the Mediterranean*. Royal Botanic Gardens, Kew, Great Britain. 409 s.
- Kümpel, H., Mrkvicka A.Ch. (1980) Untersuchungen zur Abtrennung der *Orchis ustulata* L. subsp. *aestivalis* (Kümpel) Kümpel & Mrkvicka. *Mitteilungsblatt, Arbeitskreis heimische Orchideen, Baden-Württemberg* **22**: 306–324. Citováno dle Tali *et al.* 2004
- Laliga L.S., Espinosa J.A.L. (2022) ¿Es *Neotiaceras mattinatae* realmente un híbrido? *Flora Montiberica* **82**:141–147.
- Lanzino M., Palermo A.M., Pellegrino G. (2022) Pollinaria reconfiguration mechanism of widespread Euro-Mediterranean orchids: The effects of increasing air temperature. *Plants* **11**:1327.
- Leake J.R. (1994) The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* **127**:171–216.
- Leitch I.J., Dodsworth S. (2017) Endopolyploidy in plants. In: *Encyclopedia of life sciences*. American Cancer Society, pp 1–10. [online] URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0020097.pub2> (navštíveno 13. ledna 2019).
- Leitch I.J., Johnston E., Pellicer J., Hidalgo O., Bennett M.D. (2019) Plant DNA C-values Database | Royal Botanic Gardens, Kew. Plant DNA C-values Database | Royal Botanic Gardens, Kew [online] URL: <https://cvalues.science.kew.org/> (navštíveno 14. března 2024).
- Leitch I.J., Kahandawala I., Suda J., Hanson L., Ingrouille M.J., Chase M.W., Fay M.F. (2009) Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany* **104**:469–481.

- Leitch I.J., Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett M.D. (2005) Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Annals of Botany* **95**:207–217.
- Li Y.-Y., Boeraeve M., Cho Y.-H., Jacquemyn H., Lee Y.-I. (2022) Mycorrhizal switching and the role of fungal abundance in seed germination in a fully mycoheterotrophic Orchid, *Gastrodia confusoides*. *Frontiers in Plant Science* **12**:775290.
- Liebel H.T., Bidartondo M.I., Preiss K., Segreto R., Stöckel M., Rodda M., Gebauer G. (2010) C and N stable isotope signatures reveal constraints to nutritional modes in orchids from the Mediterranean and Macaronesia. *American Journal of Botany* **97**:903–912.
- Lumaga M.R.B., Cozzolino S., Kocyan A. (2006) Exine micromorphology of Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae): Phylogenetic constraints or ecological influences? *Annals of Botany* **98**:237–244.
- Ma G.-H., Chen X.-G., Selosse M.-A., Gao J.-Y. (2022) Compatible and incompatible mycorrhizal fungi with seeds of *Dendrobium* species: The colonization process and effects of coculture on germination and seedling development. *Frontiers in Plant Science* **13**:823794.
- Manzo A., Panseri S., Vagge I., Giorgi A. (2014) Volatile fingerprint of Italian populations of orchids using solid phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Molecules* **19**:7913–7936.
- Martel C., Rakosy D., Dötterl S., Johnson S.D., Ayasse M., Paulus H.F., Nilsson L.A., Mejlun H., Jersáková J. (2021) Specialization for tachinid fly pollination in the phenologically divergent varieties of the orchid *Neotinea ustulata*. *Frontiers in Ecology and Evolution* **9**:371.
- Martel C., Rakosy D., Romero P.E., Jersáková J., Ayasse M. (2023) The evolution of tachinid pollination in *Neotinea ustulata* is related to floral cuticular composition and the combined high relative production of (Z)-11-C23/C25enes. *Journal of Systematics and Evolution* **61**:487–497.
- Martín J.A.M., Oliva F.D. (2006) *Guía de orquídeas de Extremadura*. Tecnigraf, S.A., Badajoz. 120 s.
- Mazzola P. (1984) Cytogeographic aspects of *Orchis commutata* Tod. (Orchidaceae). *Webbia* [online] URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00837792.1984.10670348> (navštíveno 9. března 2024).
- McMahon P., Purwantara A. (2016) Vascular streak dieback (*Ceratobasidium theobromae*): History and biology. In: Bailey BA, Meinhardt LW (eds) *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing, Cham, pp 307–335. [online] URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_9 (navštíveno 24. března 2024).
- Mennicken S., Vogt-Schilb H., Těšitelová T., Kotlínek M., Alomía Y.A., Schatz B., Jersáková J. (2023) Orchid–mycorrhizal fungi interactions reveal a duality in their network structure in two European regions differing in climate. *Molecular Ecology* **32**:3308–3321.
- Mesny F., Miyauchi S., Thiergart T., Pickel B., Atanasova L., Karlsson M., Hüttel B., Barry K.W., Haridas S., Chen C., Bauer D., Andreopoulos W., Pangilinan J., LaButti K., Riley R., Lipzen A., Clum A., Drula E., Henrissat B., Kohler A., Grigoriev I.V., Martin F.M., Hacquard S. (2021) Genetic determinants of endophytism in the *Arabidopsis* root mycobiome. *Nature Communications* **12**:7227.

- Michael T.P. (2014) Plant genome size variation: bloating and purging DNA. *Briefings in Functional Genomics* **13**:308–317.
- Nabieva A.Y. (2021) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Orchis militaris*, an endangered orchid in Siberia. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology* **19**:122.
- Nagl W. (1974) The *Phaseolus* suspensor and its polytene chromosomes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **73**:1–44.
- PalDat (2024) [online] URL: <https://www.paldat.org/> (navštíveno 27. března 2024).
- Pavarese G., Tranchida-Lombardo V., Galesi R., D’Emerico S., Casotti R., Cristaudo A., Cozzolino S. (2013) When polyploidy and hybridization produce a fuzzy taxon: the complex origin of the insular neoendemic *Neotinea commutata* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **173**:707–720.
- Pecoraro L., Girlanda M., Kull T., Perini C., Perotto S. (2012a) Molecular identification of root fungal associates in *Orchis pauciflora* Tenore. *Plant Biosystems* **146**:985–991.
- Pecoraro L., Girlanda M., Kull T., Perini C., Perotto S. (2012b) Analysis of fungal diversity in *Orchis tridentata* Scopoli. *Central European Journal of Biology* **7**:850–857.
- Peel M., Finlayson B., McMahon T. (2007) Updated world map of the Köpper-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* **11**:1633–1644.
- Pellegrino G. (2016) Sympatric reinforcement of reproductive barriers between *Neotinea tridentata* and *N. ustulata* (Orchidaceae). *Journal of Plant Research* **129**:1061–1068.
- Pérez-Escobar O.A., Bogarín D., Przelomska N.A.S., Ackerman J.D., Balbuena J.A., Bellot S., Bühlmann R.P., Cabrera B., Cano J.A., Charitonidou M., Chomicki G., Clements M.A., Cribb P., Fernández M., Flanagan N.S., Gravendeel B., Hágsater E., Halley J.M., Hu A.-Q., Jaramillo C., Mauad A.V., Maurin O., Müntz R., Leitch I.J., Li L., Negrão R., Oses L., Phillips C., Rincon M., Salazar G.A., Simpson L., Smidt E., Solano-Gomez R., Parra-Sánchez E., Tremblay R.L., van den Berg C., Tamayo B.S.V., Zuluaga A., Zuntini A.R., Chase M.W., Fay M.F., Condamine F.L., Forest F., Nargar K., Renner S.S., Baker W.J., Antonelli A. (2024) The origin and speciation of orchids. *New Phytologist* **242**:700–716.
- Piet Q., Droc G., Marande W., Sarah G., Bocs S., Klopp C., Bourge M., Siljak-Yakovlev S., Bouchez O., Lopez-Roques C., Lepers-Andrzejewski S., Bourgois L., Zucca J., Dron M., Besse P., Grisoni M., Jourda C., Charron C. (2022) A chromosome-level, haplotype-phased *Vanilla planifolia* genome highlights the challenge of partial endoreplication for accurate whole-genome assembly. *Plant Communications* **3**:100330.
- Ponert J., Vosolsobě S., Kmecová K., Lipavská H. (2011) European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* **1**:95–107.
- POWO (2023): Plants of the World Online | Kew Science (2023) Plants of the World Online [online] URL: <https://powo.science.kew.org/> (navštíveno 6. března 2024).
- Pridgeon A.M., Bateman R.M., Richard M., Cox A.V. (1997) Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear DNA sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana* **12**:89–109.

- Procházka F., Velíšek V. (1983) *Orchideje naší přírody*, 1. Academia, Praha. 284 s.
- Průša D. (2019) *Orchideje České republiky 2. rozšíř. vydání*. CPress. 239 s.
- Quilliam R.S., Jones D.L. (2012) Evidence for host-specificity of culturable fungal root endophytes from the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris* (Common Butterwort). *Mycological Progress* **11**:583–585.
- Rasmussen H.N., Rasmussen F.N. (2009) Orchid mycorrhiza: Implications of a mycophagous life style. *Oikos* **118**:334–345.
- Reichenbach H.G. (1852) *De Pollinis Orchidearum genesi ac structura, et de Orchideis in artem ac systema redigendis*. Sumpt F. Hofnester, Lipsko. 48 s.
- Reineke D., Rietdorf K. (1991) Zur phänologie von *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. und *Orchis ustulata* L. *Mitteilungsblatt, Arbeitskreis heimische Orchideen, BadenWürttemberg* **23**:521–556. Citováno dle Tali *et al.* 2004
- Rick C.M. (1963) Barriers to interbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. *Evolution* **17**:216–232.
- Schiestl F.P., Cozzolino S. (2008) Evolution of sexual mimicry in the orchid subtribe orchidinae: the role of preadaptations in the attraction of male bees as pollinators. *BMC Evolutionary Biology* **8**:27.
- Schweiger J., Bidartondo M., Lenhard F., Makiola A., Gebauer G. (2017) Exploiting mycorrhizas in broad daylight: Partial mycoheterotrophy is a common nutritional strategy in meadow orchids. *Journal of Ecology* **106**:168–178.
- Scopece G., Musacchio A., Widmer A., Cozzolino S. (2007) Patterns of reproductive isolation in Mediterranean deceptive orchids. *Evolution* **61**:2623–2642.
- Squirrell J., Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Tebbitt M.C., Hollingsworth M.L. (2002) Taxonomic complexity and breeding system transitions: conservation genetics of the *Epipactis leptochila* complex (Orchidaceae). *Molecular Ecology* **11**:1957–1964.
- Tali K., Fay M.F., Bateman R.M. (2006) Little genetic differentiation across Europe between early-flowering and late-flowering populations of the rapidly declining orchid *Neotinea ustulata*. *Biological Journal of the Linnean Society* **87**:13–25.
- Tali K., Foley M.J.Y., Kull T. (2004) *Orchis ustulata* L. *Journal of Ecology* **92**:174–184.
- Tali K., Kull T. (2001) Highly variable flowering time in *Orchis ustulata* (Orchidaceae): consequences for population dynamics. *Nordic Journal of Botany* **21**:457–466.
- Trávníček P., Čertner M., Ponert J., Chumová Z., Jersáková J., Suda J. (2019) Diversity in genome size and GC content shows adaptive potential in orchids and is closely linked to partial endoreplication, plant life-history traits and climatic conditions. *New Phytologist* **224**:1642–1656.
- Trávníček P., Chumová Z., Závěská E., Hanzlíčková J., Kupková (Jankolová) L., Kučera J., Gbúrová Štubňová E., Rejlová L., Mandáková T., Ponert J. (2021) Integrative study of genotypic and phenotypic diversity in the Eurasian orchid genus *Neotinea*. *Frontiers in Plant Science* **12**:734240.
- Trávníček P., Kubátová B., Čurn V., Rauchová J., Krajníková E., Jersáková J., Suda J. (2011) Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. *Annals of Botany* **107**:77–87.

- Trávníček P., Ponert J., Urfus T., Jersáková J., Vrána J., Hřibová E., Doležel J., Suda J. (2015) Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication. *Cytometry Part A* **87**:958–966.
- Turco A., Wagensommer R.P., Medagli P., Albano A., D’Emerico S. (2024) Advances in the study of Orchidinae subtribe (Orchidaceae) species with 40,42-chromosomes in the mediterranean region. *Diversity* **16**:41.
- Vázquez F.M. (2008) Annotations to the Orchidaceae of Extremadura (SW Spain). *Journal Europäischer Orchideen* **40**:699–725.
- Veldre V., Abarenkov K., Bahram M., Martos F., Selosse M.-A., Tamm H., Kõljalg U., Tedersoo L. (2013) Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Ecology* **6**:256–268.
- Vogt-Schilb H., Těšitelová T., Kotlínek M., Sucháček P., Kohout P., Jersáková J. (2020) Altered rhizoctonia assemblages in grasslands on ex-arable land support germination of mycorrhizal generalist, not specialist orchids. *New Phytologist* **227**:1200–1212.
- Weiß M., Waller F., Zuccaro A., Selosse M.-A. (2016) Sebacinales – one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist* **211**:20–40.
- Zhang G., Hu Y., Huang M.-Z., Huang W.-C., Liu D.-K., Zhang D., Hu H., Downing J.L., Liu Z.-J., Ma H. (2023) Comprehensive phylogenetic analyses of Orchidaceae using nuclear genes and evolutionary insights into epiphytism. *Journal of Integrative Plant Biology* **65**:1204–1225.
- Ziegler H. (1989) Hydrogen isotope fractionation in plant tissues. In: Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA (eds) *Stable Isotopes in Ecological Research*. Springer New York, New York, NY, pp 105–123. [online] URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-3498-2_8 (navštíveno 25. března 2024).