

THE EFFECT OF SIMULATED EUTROFICATION ON THE GROWTH AND MYCORRHIZAL SYMBIOSIS OF *SERAPIAS LINGUA*

EFEKT SIMULOVANÉ EUTROFIZACE NA RŮST A MYKORHIZNÍ SYMBIÓZU DRUHU *SERAPIAS LINGUA*

Veselá B., Baláž M.

Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University,
Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Czech Republic

E-mail: vesela.b@czechglobe.com

ABSTRACT

Eutrofication is one of key factors affecting decline of orchid populations in nature. Although this phenomenon has been observed many times and is generally accepted, there is very little information about the mechanisms of eutrofication on terrestrial orchids of temperate or Mediterranean climatic zone. In principle, two modes of action may occur: direct toxic effect of higher nutrient content on orchids or their mycorrhizal fungi, and/or indirect effect mediated by altered competition with surrounding vegetation. I tested the significance of direct effect in a three-year lasting pot greenhouse experiment using Mediterranean orchid *Serapias lingua*. Indirect effect of eutrofication was excluded by omitting any co-cultivated plant species, eutrofication was simulated by the series of nutrient solutions. The most concentrated basic solution containing 6 mM N-NO₃⁻, 2.4 mM N-NH₄⁺, 2 mM P, 8 mM K, 2.6 mM Ca a 2 mM Mg was gradually diluted with distilled water in 1:1 ratio, in order to prepare 2, 4, 8, and 16× diluted treatments. No data suggesting direct negative effect of eutrofication on orchids were obtained. After the first growing season, no effect of simulated eutrofication on the ratio of fresh mass of tubers in 2007 and 2006 (FM₂₀₀₇/FM₂₀₀₆) was observed. The highest value of this coefficient was 7.79, SD=2.68, n=115. Positive effect of higher nutrient availability on the FM₂₀₀₈/FM₂₀₀₇ was observed after the second growing season, during which the nutrient demand was higher due to higher count of greater plants planted in individual pots. For example, the mean FM₂₀₀₈/FM₂₀₀₇ value of *S. lingua* treated with 16× diluted solution was 1.21 (SD=0.31, n=23), while for plants treated with undiluted basic solution was the mean 2.20 (SD=0.58, n=23). These results strongly support the opinion that indirect, by competition mediated effect of eutrofication on adult, photosynthesizing plants is responsible cause decline of orchid population and the published evidence was discussed with this respect.

Key words: Orchidaceae, eutrofication, mycorrhizal symbiosis, *Serapias lingua*

ÚVOD

Vstavačovité (Orchidaceae) jsou nejpočetnější a nejrozmanitější čeledí kvetoucích rostlin na Zemi. Bohužel se zároveň jedná o čeleď, která je působením člověka velmi ohrožená, zejména kvůli svým specifickým nárokům na životní prostředí. Výrazným faktorem podléjícím se na úbytku vstavačovitých je bezesporu eutrofizace související se špatným zemědělským hospodařením v krajině a s automobilovou dopravou. Bylo publikováno několik studií, jejichž autoři se zabývali vlivem eutrofizace na orchideje (Dijk & Olf 1994, Mattila & Kuitunen 2000, Dijk & Eck 1995, Hejzman et al. 2010). Bezprostřední příčina úbytku lokalit a zmenšování populací orchidejí po eutrofizaci ovšem dosud není známa. Uvažován je jak přímý negativní vliv zvýšené dostupnosti živin na metabolismus orchidejí a jejich mykorhizní symbiózy, popřípadě nepřímý vliv zprostředkovaný ovlivněním kompetice s jinými rostlinnými druhy. Pro efektivní ochranu a management lokalit těchto rostlin je proto důležité poznat mechanismus ovlivnění jejich růstu eutrofizací.

V kulivačním experimentu jsem se zabývala přímým vlivem zvýšeného přísunu živin na růst a mykorhizní symbiózu mediteránní orchideje *Serapias lingua*. Vzhledem k absenci kompetujících rostlin v průběhu kultivace jsem byla schopna vyloučit nepřímý vliv eutrofizace, spojený se změnou kompetice, a odhalit případný přímý negativní efekt zvýšené dostupnosti živin na růst orchidejí a jejich mykorhizní symbiózu. Výsledky mnou docílené jsou nejen příspěvkem k pochopení biologie orchidejí, ale mohou nalézt i praktické uplatnění při záchranných *ex situ* kultivacích těchto rostlin (Swart & Dixon 2009).

MATERIÁL A METODIKA

Rostliny byly pěstovány ve studeném skleníku, kde byla teplota regulována tak, aby simulovala podmínky na přirozeném stanovišti druhů v mediteránních oblastech. V celém období kultivace nebyly tyto rostliny nikdy záměrně inokulovány orchideoidními mykorhizními houbami.

Rostliny byly zasazeny po jedné do polyetylenových květináčů TEKU 0350 (Pöppelmann, Lohne, Německo) o rozměrech 90×90×95mm. Jako substrát byla použita směs zeolitu klinoptilolitu o velikosti částic 1,5–2 mm (Zeocem Bystré, Slovensko) a organického substrátu na bázi světlé a tmavé rašeliny Klasmann Substrate No.1 (Klasmann-Deilmann, Geest, Německo), v poměru 1:1 vol/vol. Pokusných rostlin bylo celkem 115. Před zasazením byly zváženy a rozděleny do 23 bloků s přibližně stejnou hmotností, v jejichž rámci bylo jednotlivým rostlinám náhodně přiřazováno 5 experimentálních variant. Těmito variantami byla zálivka roztokem s různou koncentrací živin. Pro simulovanou eutrofizaci byl připraven jako výchozí roztok varianty 4×, který obsahoval v 1 litru destilované vody 193 mg NH₄NO₃, 500 mg MgSO₄·7H₂O, 614 mg Ca(NO₃)₂·4H₂O, 137 mg K₂HPO₄·3H₂O, 191 mg KH₂PO₄, 421 mg K₂SO₄, 16 mg FeNaEDTA,

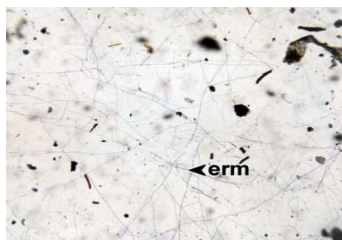
15 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mg KI, 3 mg H_3BO_3 , 4,8 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,024 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Tento roztok, obsahující 7,6 mM N-NO_3^- , 2,4 mM N-NH_4^+ , 2 mM P, 8 mM K, 2,6 mM Ca a 2 mM Mg byl postupně ředěn destilovanou vodou vždy v poměru 1:1, čím byly připraveny varianty 2× až 0,25×.

Minerální výživa byla rostlinám aplikována ve formě roztoku vždy po 50ml, což je množství nad zádržnou kapacitu substrátu v kontejneru. Zálivka byla aplikována v první sezóně třikrát, poprvé 25. 2. 2007, podruhé 24. 3. 2007 a potřetí 17. 4. 2007. Analogicky byla zálivka rostlinám aplikována ve druhé sezóně, a to v datech 26. 2. 2008, 23. 3. 2008 a 20. 4. 2008. Pro hodnocení růstu rostlin byly po prvním roce kultivace hlízy vyjmuty z kontejneru, očištěny štětcem, spočítány, zváženy a všechny zasazeny zpět do původního substrátu, po druhém roce kultivace byla zasazena vždy pouze jedna hlíza. Při sázení po druhém roce kultivace byla do substrátu přidána ještě membrána pro hodnocení rozvoje mimokořenového mycelia (ERM).

Růst rostlin byl hodnocen jako počet a čerstvá hmotnost (FM, angl. fresh mass) dceřiných zásobních hlíz vždy v období končící dormance, tedy na podzim let 2007 a 2008. Pro statistické hodnocení dat byly vypočteny tři koeficienty mezisezónního přírůstku FM zásobních hlíz. Koeficient $\text{FM}_{2007}/\text{FM}_{2006}$ je podílem celkové FM všech zásobních hlíz jednotlivých rostlin po prvním roce kultivace a FM zásobních hlíz jednotlivých rostlin na začátku kultivace; analogicky koeficient $\text{FM}_{2008}/\text{FM}_{2007}$ je analogicky podílem celkové FM všech zásobních hlíz jednotlivých rostlin po druhém roce kultivace a celkové FM všech zásobních hlíz jednotlivých rostlin po prvním roce kultivace. Koeficient $\text{FM}_{2008}/\text{FM}_{2006}$ integruje přírůstek za oba dva roky kultivace.

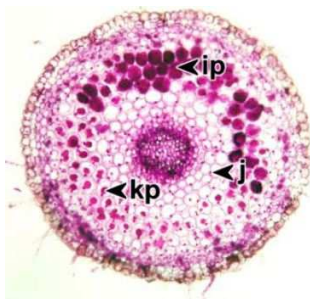
Mimokořenové mycelium (ERM) bylo ze substrátu vyextrahováno pomocí techniky vnořené membrány (Baláž & Vosátka 2001, obr. 1)). Ze substrátu každé kultivační nádoby byla vyjmuta membrána s narostlým myceliem, která byla obarvena 0,05% trypanovou modří v laktoglycerolu (stejně objemové díly 80% kyseliny mléčné, glycerolu a destilované vody; Brundrett et al. 1984). Preparáty pro hodnocení denzity ERM (délky mycelia vztahené na jednotkovou plochu membránového filtru) byly pozorované a náhodně vybraná místa na membráně byla fotografována pomocí světelného mikroskopu Olympus BX-50 s objektivem 4× a digitální kamerou Olympus C-5050Z. Vzniklé snímky byly hodnoceny pomocí průsečíkové metody (Gryndler et al. 2004).

Obr. 1: Mimokořenové mycelium (erm) izolované z půdy pomocí techniky vnořené membrány.



Pro vyhodnocení kolonizace kořenů mykorrhizní houbou byl 27.3.2009 z každé rostliny odebrán jeden reprezentativní kořen. Odebraný kořen byl rozdělen na tři úseky - bázi, střed a apex. Z každého úseku bylo zhotoveno 5 kompletních tenkých řezů a ty byly následně barveny 0,01% kyselým fuchsinem v laktoglycerolu. Preparáty byly fotografovány pomocí světelného mikroskopu Olympus BX-50 s objektivem 4× a digitální kamerou Olympus C-5050Z. V rámci každého řezu bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení kortikálních buněk s intaktními pelotony, kolabovanými pelotony a nekolonizovaných buněk kortexu, přičemž jako potencionální hostitelské buňky byly uvažovány pouze ty vrstvy primární kůry, které mohou být houbou kolonizovány (obr.2).

Obr. 2: Kolonizace adventivního kořene S. lingua hyfami mykorrhizní houby, která uvnitř buněk primární kůry tvoří typické pelotony, které jsou buď intaktní (ip) nebo kolabované (kp). Uvnitř buněk jsou viditelná jádra (j).



VÝSLEDKY A DISKUZE

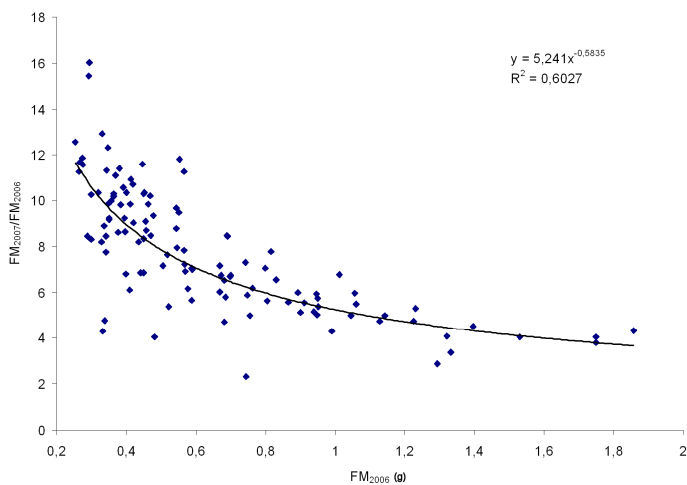
Tvorba zásobních hlíz

Mezisezónní koeficient čerstvé hmotnosti hlíz FM_{2007}/FM_{2006} u druhu *Serapias lingua* nebyl statisticky průkazně ovlivněn různými dávkami minerálních živin ($F=0,55$; $P=0,70$), průměrná hodnota tohoto koeficientu činila 7,79 ($SD=2,68$; $n=115$). Naproti tomu v druhém roce kultivace byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezisezónního koeficientu FM_{2008}/FM_{2007} v závislosti na různých dávkách minerálních živin ($F=22,08$; $P<0,001$). Vyšší dávka minerálních živin tedy pozitivně ovlivnila růst rostlin, koeficient FM_{2008}/FM_{2007} byl největší při nejvyšší dávce minerální výživy (2,20; $SD=0,58$; $n=23$) a nejmenší při nejnižší dávce minerální výživy (1,21; $SD=0,31$; $n=23$). Průměrná hodnota koeficientu FM_{2008}/FM_{2007} činila bez ohledu na výživovou variantu 1,57 ($SD=0,55$; $n=115$). Rozdíly v růstu v sezóně 2007/2008 se projeví i v mezisezónním koeficientu FM_{2008}/FM_{2006} , kdy se podle výživových variant statisticky průkazně lišily ($F=13,78$; $P<0,01$); opět byl v průměru nejvyšší ve variantě 4× (17,24; $SD=7,54$; $n=23$) a nejnižší ve variantě 0,25× (9,34; $SD=4,14$; $n=23$). Mezi přírůstkem hmotností hlíz rostlin v první sezóně, vyjádřeným koeficientem FM_{2007}/FM_{2006} , a výchozí hmotností hlíz (FM_{2006}) byla statisticky průkazná korelace (Spearmanův korelační koeficient $R=-0,77$, $P<0,001$, $n=115$). Tento vztah byl nelineární (obr. 3.)

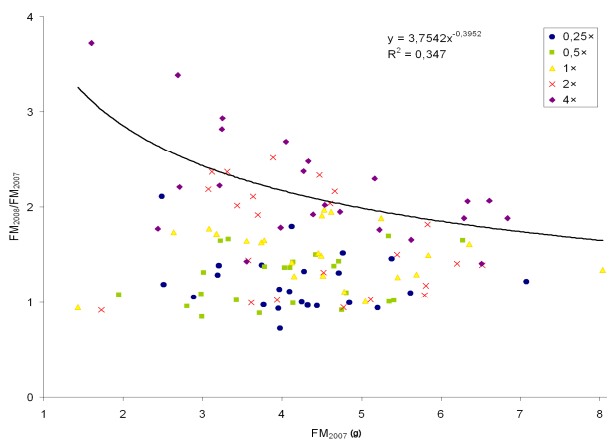
MENDELNET 2012

a ukazuje, že nejvyšší potenciál přírůstku měly rostliny s nejmenší výchozí hmotností hlíz. Obdobná závislost po druhém roce kultivace se projevila pouze u rostlin z varianty 4× (obr. 4), tedy těch, které měly nejvyšší hodnotu koeficientu FM_{2008}/FM_{2007} (Spearmanův korelační koeficient $R = -0,49$, $P = 0,02$, $n = 23$).

Obr. 3: Závislost koeficientu mezisezónního přírůstku FM_{2007}/FM_{2006} na čerstvé hmotnosti zásobních hlíz před začátkem experimentu (FM_{2006}). Mocninnou závislostí jsou proložena všechna data ($n = 115$).



Obr. 4: Závislost koeficientu mezisezónního přírůstku FM_{2008}/FM_{2007} na čerstvé hmotnosti zásobních hlíz druhu *Serapias lingua* po prvním roce kultivace (FM_{2007}). Mocninnou závislostí jsou proložena data z varianty 4× ($n = 23$).



Denzita mimokořenového mycelia

Denzita mimokořenového mycelia mykorhizní houby byla statisticky průkazně ovlivněna různými dávkami minerální výživy ($F=3,08$; $P=0,04$; tab. 1), kdy nejvyšší denzita byla zjištěna u varianty s nejvyšší dostupností živin ($4\times$), nejnižší hodnoty byly naopak zjištěny pro varianty $0,25\times$ a $0,5\times$. Zjištěná hustota mimokořenového mycelia tedy vzrůstala se zvyšující se koncentrací živin v živném roztoku. Existují dvě možná vysvětlení těchto rozdílů: zálivka roztokem s vyšším obsahem živin, zejména N, mohla zlepšit C/N poměr v substrátu, který mohl být příznivější pro saprotrofní růst OM houby. Druhou variantou je, že vyšší hustota ERM byla způsobena vyšším biotrofním přenosem C látek z kořenů orchideje do ERM. Pro tento jev, který byl poprvé kvantifikován teprve nedávno (Látalová a Baláz 2010), svědčí zjištěná pozitivní korelace mezi hmotností sazených hlíz (FM2008) a zjištěnou denzitou ERM (Pearsonův $r=0,513$, $P=0,004$).

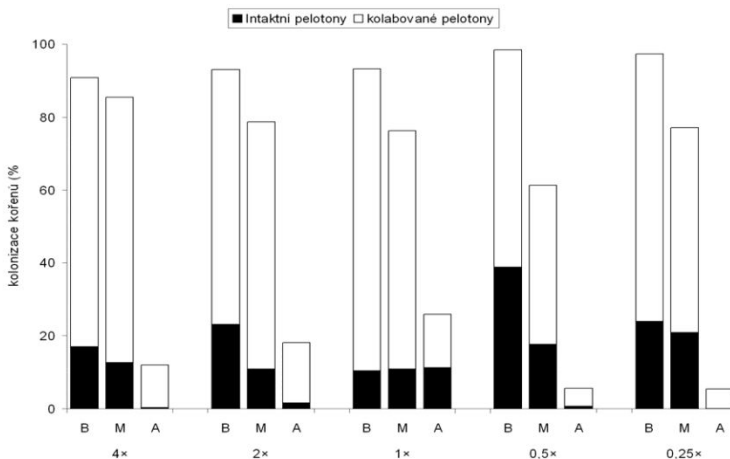
Tab. 1: Vliv minerální výživy na denzitu mimokořenového mycelia (ERM) mykorhizní houby

Efekt	d.f./n	denzita ERM
typ hnojení	1	3,78 (0,07)
minerální výživa	4	3,08 (0,04)
0,25×	6	44,08 (13,16) a
0,5×	6	30,43 (15,54) a
1×	6	48,40 (25,16) ab
2×	6	47,55 (29,88) ab
4×	6	71,90 (22,07) b

Kolonizace kořenů

Mykorhizní houby vytvářely ve středních vrstvách kořenového kortexu všech rostlin pelotony typické pro OM mykorhizu, které byly buď intaktní, nebo částečně či úplně zkolabované. Výskyt intaktních pelotonů byl statisticky průkazně ovlivněn efektem minerální výživy a byl odlišný i v závislosti na hodnoceném segmentu kořene (obr.5). Byl zjištěn vyšší výskyt intaktních pelotonů v bazálních a středních segmentech kořenů rostlin z variant $0,25\times$ a $0,5\times$. V apikálním segmentu kořene byl navíc zjištěn velmi malý výskyt nejen intaktních, ale i kolabovaných pelotonů a tedy i celkové kolonizace u všech variant minerální výživy – celková kolonizace činila v průměru 12,8 % ($sd=23,3$ %, $n=30$; tab. 2).

Obr. 5: Kolonizace kořenů mykorrhizní houbou v závislosti na různých dávkách minerální výživy ($4\times$ až $0,25\times$) a na segmentu kořene (B – báze, M – střed, A – apex).



Tab. 2: Výsledky analýz rozptylu s opakovanými měřeními kolonizace kořenů (bazální, střední a apikální segment). V tabulce jsou uvedeny výsledky F-testů, v závorkách jejich statistické průkaznosti. MV – minerální výživa, SG – segment kořene.

Intaktní pelotony	minerální výživa	0,55 (0,702)
	segment	28,08 (<0,001)
	MV×SG	3,25 (0,005)
Kolabované pelotony	minerální výživa	1,72 (0,178)
	segment	99,76 (<0,001)
	MV×SG	0,44 (0,889)
Celková kolonizace	minerální výživa	0,43 (0,785)
	segment	139,17 (<0,001)
	MV×SG	0,88 (0,541)

ZÁVĚR

Výsledky experimentu ukazují na neexistenci přímého negativního působení simulované eutrofizace na růst orchidejí. Vzhledem k mnohokrát zdokumentovanému faktu, že eutrofizace na lokalitách vede k poškození populací orchidejí, je zřejmé, že větší význam v tomto případě bude mít nepřímý, kompetičí zprostředkovaný efekt eutrofizace, v minulosti opakovaně uváděný jako pravděpodobné vysvětlení tohoto jevu (Silvertown et al. 1994, McKendrick 1996, Mattila & Kuitunen 2000, Hejcman et al. 2010). Z tohoto pohledu se jeví vysoká účinnost managementu lokalit orchidejí založeného na spásání či kosení následovaném odnosem biomasy, empiricky ověřeno jako velmi účinné opatření (Wotavová et al. 2004, Janečková et al. 2006), jako logický důsledek existence kompetičí zprostředkovaného negativního působení eutrofizace.

LITERATURA

- Baláž M., Vosátka M. 2001. A novel inserted membrane technique for studies of mycorrhizal extraradical mycelium. *Mycorrhiza* 11:291–296.
- Brundrett M.C., Piche Y., Peterson R.L. 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*. 62: 2128–2134.
- Dijk E., Eck N. 1995b. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist*, 131, 361–367.
- Dijk E., Olf H. 1994. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on field performance of *Dactylorhiza majalis*. *Acta Botanica Neerlandica*, 43: 383–392.
- Gryndler M., Baláž M., Hřelová H., Jansa J., Vosátka M. 2004. Mykorhizní symbiózy. Praha: Academia, pp. 366.
- Hejcman M., Schellberg J., Pavlů V. 2010. *Dactylorhiza maculata*, *Platanthera bifolia* and *Listera ovata* survive N application under P limitation. *Acta Oecologica*, 138: 684–688.
- Janečková P., Wotavová K., Schödelbauerová I., Jersáková J., Kindlmann P. 2006. Relative effects of management and environmental conditions on performance and survival of populations of a terrestrial orchid, *Dactylorhiza majalis*. *Biological Conservation* 129: 40–49.
- Látalová K., Baláž M. 2010. Carbon nutrition of mature green orchid *Serapias strictiflora* and its mycorrhizal fungus *Epulorhiza sp.* *Biologia plantarum* 54: 97–104.
- Mattila E., Kuitunen M.T. 2000. Nutrient versus pollination limitation in *Platanthera bifolia* and *Dactylorhiza incarnata* (*Orchidaceae*). *Oikos* 89: 360–366.
- McKendrick S.L. 1996. The effects of fertilizer and root competition on seedlings of *Orchis morio* and *Dactylorhiza fuchsii* in chalk and clay soil. *New Phytologist* 134: 335–342.
- Silvertown J., Wells D.A., Gillman M., Dodd M.E., Robertson H., Lakhani K.H. 1994. Short-term effects and long-term after-effects of fertilizer application on the flowering population of green winged orchid *Orchis morio*. *Biological Conservation* 69: 191–197.

Swart N.D., Dixon K.W. 2009. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, 11: 590-598.

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