

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

katedra biologie

Srovnání klíčivosti semen zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v závislosti na stáří semen a způsobu přerušování jejich dormance

Bakalářská práce

Autor: Klára Lipanská

Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Romana Prausová, Ph.D.

Hradec Králové

červen 2024

Zadání bakalářské práce

Autor: Klára Lipanská

Studium: S20BI008BP

Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Název bakalářské práce: **Srovnání klíčivosti semen zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v závislosti na stáří semen a způsobu přerušení jejich dormance**

Název bakalářské práce AJ: Comparison of *Adenophora liliifolia* seeds germination in dependency on the age and way of the dormancy seeds breaking

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*) je v současné době kriticky ohrožený druh cévnaté rostliny podle vyhlášky č. 395/1995 Sb. Do stejné kategorie je zařazen také podle Černého a červeného seznamu ČR (Grulich et Chobot 2017). Patří k druhům chráněným v rámci soustavy NATURA 2000. V ČR byl v roce 2018 schválen záchranný program pro tento druh, přežívající v malých populacích na posledních pěti lokalitách. V rámci záchranných aktivit probíhají výzkumy zaměřené na životní cyklus druhu, jeho ekologické nároky a faktory, které ho ohrožují. Dosavadní testy klíčivosti realizované u několika českých (Bajerová 2015, Prausová et al. 2016) a polských (Puchalski et al. 2014) populací ukázaly na přirozenou klíčivost 13–14 %. Klíčivost semen lze aktivovat a zvýšit (až o několik desítek procent) chladovou stratifikací, aplikací Ethephonu a kyseliny Giberelové. Významná je též kryokonzervace, která zpomaluje stárnutí semen a ztrátu jejich klíčivosti.

Cílem této bakalářské práce je porovnání klíčivosti semen sebraných v letošní vegetační sezóně (2022), tj. sklizených před 2 měsíci, se semeny sklizenými v září a říjnu v letech 2019, 2021. Testy proběhnou v kontrolní variantě a ve třech typech ošetření (chladová stratifikace, aplikace Ethephonu, aplikace kyseliny Giberelové). Práce slouží ke zjištění vlivu stáří semen na jejich klíčivost a k odhalení typu dormance semen.

Klíčová slova: zvonovec liliolistý, klíčivost, dormance, zvonkovitě

Keywords: *Adenophora liliifolia*, seed germination, dormancy, Campanulaceae

Bajerová A. 2015. Studium ekologických nároků zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v podmínkách střední Evropy. 57 p., ms., [Bak. práce, depon. in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové].

Bojňanský V., Fargašová A. 2007. Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian Mountains Region. Springer, Dordrecht. 1046 p. ISBN 978-1-4020-5361-0.

Grulich V. et Chobot K., 2017, eds.: Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Cévnaté rostliny. Příroda, Praha, 35: 1–178.

Grulich V. 2017. Red List of vascular plants of the Czech Republic:3rd edition. Preslia 84: 631–645.

Moucha P. 1986. Záchrana včelníku rakouského a zvonovce liliolistého. In: Problematika záchrany ohrožených druhů rostlin, 90–92, Praha. [Seminář 14.4. 1986].

Prausová R. et Truhlářová K. 2009. Zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*) v evropsky významné lokalitě Vražba v lesním komplexu u obce Habřina na Královéhradecku. Vč. sb. přír. Práce a studie, 16: 83–110.

Prausová R., Marečková L., Kapler A., Majeský L., Farkas T. Indreica A., Šafářová L. et Kitner M. 2016a. *Adenophora liliifolia*: condition of its populations in Central Europe. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 58/2: 83-105.

Puchalski J., Niemczyk M., Walerowski W. P. et Kapler A., 2014. Long-term seed cryopreservation of rare and endangered Polish Ponto-Panonian species. Opole Scientific Society, Nature Journal. No 47 – 2014: 1–8.

Samková V. 2003. Nález zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia* (L.) DC.) ve východních Čechách. In Acta Musei Reginae hradecensis, s. A. 29:79., Hradec Králové. Truhlářová K. 2008. Zvonovec liliolistý [*Adenophora liliifolia*] na Jaroměřsku. 58 p., ms., [Bakal. práce, depon. in: Pedagogická fakulta, Univerzita Hradec Králové].

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Romana Prausová, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2022

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne:

Klára Lipanská

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce RNDr. Romaně Prausové Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, za pomoc a rady při zpracování této práce.

ANOTACE

Zvonovec liliolistý (*Adenophora lilifolia*) je v současné době kriticky ohrožený druh cévnaté rostliny podle vyhlášky č. 395/1995 Sb. Do stejné kategorie je zařazen také podle Černého a červeného seznamu ČR (Grulich et Chobot 2017). Patří k druhům chráněným v rámci soustavy NATURA 2000. V ČR byl v roce 2018 schválen záchranný program pro tento druh, přežívající v malých populacích na posledních šesti lokalitách. V rámci záchranných aktivit probíhají výzkumy zaměřené na životní cyklus druhu, jeho ekologické nároky a faktory, které ho ohrožují. Dosavadní testy klíčivosti realizované u několika českých (Bajerová 2015, Prausová et al. 2016) a polských (Puchalski et al. 2014) populací ukázaly na přirozenou klíčivost 13–14 %. Klíčivost semen lze aktivovat a zvýšit (až o několika desítek procent) chladovou stratifikací, aplikací ethephonu a kyseliny gibberelové. Významná je též kryokonzervace, která zpomaluje stárnutí a ztrátu jejich klíčivosti.

Klíčová slova: zvonovec liliolistý (*Adenophora lilifolia*), klíčivost, dormance, zvonkovité

ANNOTATION

Adenophora lilifolia is currently a critically endangered species of vascular plant according to Decree No. 395/1995 Coll. It is also included in the same category according to the Black and Red List of the Czech Republic (Grulich et Chobot 2017). It belongs to the species protected within the NATURA 2000 system. In the Czech Republic, a rescue programme for this species was approved in 2018, as it is surviving in small populations at the last six sites. As part of the conservation activities, research is being carried out on the life cycle of the species, its ecological requirements and the factors that threaten it. So far, germination tests carried out on several Czech (Bajerová 2015, Prausová et al. 2016) and Polish (Puchalski et al. 2014) populations have shown a natural germination rate of 13-14 %. Seed germination can be activated and increased (up to several tens of percent) by cold stratification, application of ethephon and giberel acid. Cryopreservation is also important to slow down ageing and loss of germination capability.

Keywords: *Adenophora liliifolia*, seed germination, dormancy, *Campanulaceae*

Obsah

1 Úvod	10
2 Rešerše	11
2.1. Charakteristika druhu	11
2.2. Výskyt druhu	13
2.3. Rozmnožování a šíření druhu	15
2.4. Dormance	16
2.5. Klíčení semen	17
2.6. Semenná banka	19
2.7. Kontaminace.....	19
3 Metodika	20
3.1. Skladování a příprava semen	20
3.2. Příprava testů a pomůcky	20
3.3. Testy klíčivosti	21
3.4. Ověřování výskytu semenáčků na lokalitě	24
4 Výsledky	25
4.1. Výsledky	25
4.1.1. Vyhodnocení testu č. 1 – Kontrola	25
4.1.2. Vyhodnocení testu č. 2 – Ethephon	25
4.1.3. Vyhodnocení testu č. 3 – Kyselina gibberelová	25
4.1.4. Vyhodnocení testu č. 4 – Chladová stratifikace	25

4.2. Průběh testů	26
4.3. Srovnávání aktuálních a předchozích testů klíčivosti.....	30
4.4. Kontaminace semen	32
4.5. Výskyt semenáčků v PP Babinské louky ve vegetační sezóně 2023.....	33
5 Diskuze	35
5.1. Srovnávání vlastních výsledků s předchozími testy klíčivosti.....	35
6 Závěr	39
7 Literatura	40
8 Seznam příloh	45
8.1. Seznam obrázků	45
8.2. Seznam tabulek	45
8.3. Seznam grafů	46

1 Úvod

Tato bakalářská práce se zaměřuje na klíčivost semen zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v závislosti na stáří těchto semen. Práce částečně vychází a navazuje na předešlé kvalifikační práce psané na Univerzitě Hradec Králové (Truhlářová 2008, Bajerová 2015, Špringrová 2018), na jiných univerzitách (Gavendová 1997), nebo také z různých studií (Puchalski et al. 2014, Prausová et al. 2016, Prausová 2021). V mé práci jsem realizovala testy klíčivosti v různých variantách zaměřených na přerušení dormance semen. Tyto testy mohou vysvětlit, proč se populace na českých lokalitách zmenšují. Zda je příčinou vliv zvěře nebo drobných živočichů, malá odolnost vůči suchu, malá konkurenceschopnost či problémové generativní rozmnožování.

Zájmovým druhem mé práce je kriticky ohrožený druh, který se na našem území vyskytuje pouze na 6 lokalitách z původních 20 lokalit. Dosavadní monitoring ukazuje, že populace zvonovce liliolistého jsou nestabilní a jsou závislé na pravidelné péči o lokality i samotné jedince. Pro pochopení příčin jsou nutná sledování v terénu, ale i laboratorní experimenty, např.: testování klíčivosti, pěstování *in - vitro* kultur. Na základě porozumění významných faktorů ovlivňujících prosperitu a stabilitu populací lze zvolit vhodnou péči o lokality a populace druhu posilovat.

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda semena zvonovce liliolistého klíčí čerstvá či naopak potřebují projít klidovým obdobím. Testy klíčivosti mají také poukázat na rychlost ztráty klíčivosti semen. Proto byla použita semena nasbírána v různých letech (2019, 2021, 2022) a jaké způsoby přerušení dormance semen v přírodních podmínkách jsou neúčinnější.

2 Rešerše

2.1 Charakteristika druhu

Zvonovec liliolistý se řadí do čeledi zvonkovitých (*Campanulacae Juss.*) (Hoskovec 2007). Tento druh řadíme mezi vytrvalé cévnaté rostliny, které mají olistěný a větvený stonek. (obr. 1). Jedinci dosahují výšky 40–90 cm. Lodyhy se jeví pýřité ale převážně lysé. Počet lodyh v trsu je ve velkém rozpětí, může se pohybovat od 1 až po 15 lodyh (Prausová et al. 2016b, Kovanda 2000). Lodyha dorůstá až do výšky 90 cm a kořeny jsou spíše řepovité, vřetenovité a často větvené (Kovanda 2000). Ze současných výzkumů víme, že výška lodyh je v různých zemích rozdílná (Prausová et al., 2016b). Lodyha je napohled podélně rýhovaná, válcovitá a větvení je viditelné až u květenství (Kubát et al. 2010). U dospělých jedinců je květenství větvené až do 12 větví, přičemž u malých rostlin se větvení nevyskytuje (Prausová et al. 2016b).



Obr.1 Zvonovec liliolistý – olistěný stonek – Babinské louky, foto.: K. Lipanská 26.7.2023

Lodyžní listy mohou být postaveny střídavě nebo přeslenitě. Jejich okraje jsou pilovité někdy mohou být až celokrajné. Na povrchu lesklé, při přízemní části zúžené v řapík s obvejčitou a širokou čepelí. Jiné listy tohoto druhu jsou klínovitě přisedlé a kopinaté. Květy jsou od pohledu pětičetné, rozdělené na kalich a korunu, vonné a bledě modré vzácně i bílé (obr.2). Méně bohaté soubory květu jsou v hroznovitém květenství a soubory s velkým počtem květů mají laty. Tobolky, ve kterých se nachází drobná, hnědá, zploštělá a vypouklá semena jsou hruškovité a zakřivené (Kovanda 2000). Počet i tvar listů je velmi kolísavý (Prausová et al. 2016b).

Doba kvetení zvonovce liliolistého probíhá v rozmezí měsíců červen až září. Tento druh rostliny můžeme hledat např. ve světlých lesích, mezofilních a mírně vlhkých loukách, v nížinách či pahorkatinách. Dává přednost bazickým substrátům (slínovce, slíny, vápence, andezity) (Prausová et al. 2016b).

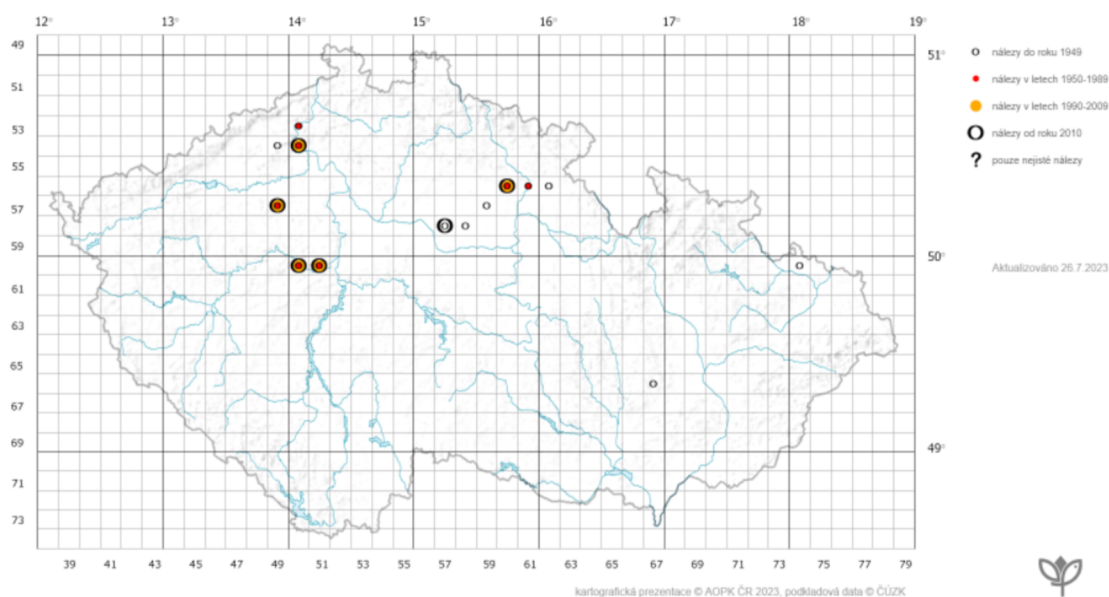


Obr. 2 Zvonovec liliolistý – celá rostlina –
Babinské louky, foto.: K. Lipanská
26.7.2023

2.2 Výskyt druhu

Tato rostlina se nachází ve střední a východní Evropě. Na našem území se s ní můžeme setkat jen velmi vzácně (Hoskovec 2007). Tento druh je v České republice řazen mezi zvláště chráněné druhy v kategorii kriticky ohrožené. Zvonovec liliolistý je jako druh chráněn dle směrnice Evropského společenství č. 92/43/EHS o ochraně volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin, ale také dle vyhlášky MŽP č. 395/1992 Sb. v kategorii kriticky ohrožený (Procházka et al., 2001).

Zvonovec liliolistý se vyskytoval na původních 20 lokalitách České republiky. Dnes se tento druh vyskytuje pouze na šesti. Místa výskytu tohoto druhu se nachází v severních a středních Čechách (Hoskovec 2007). Mezi tato místa patří – PP Vražba na Jaroměřsku (původ semen k testům klíčivosti), PP Babinské louky v CHKO České středohoří, PP Smradovna, NPR Karlštejn, PP Žehuňsko – Bán a CHKO Český kras – PP Džbán (Prausová et al. 2020).



Obr. 3 Rozšíření druhu na území ČR, (převzato z Prausová et al. 2020)

Rostlina se v některých oblastech nevyskytuje více než 50 let (Prausová et al. 2020). Roleček et Šťastný (2020) Ve své práci ukazují, že výskyt na Vyškovsku a Opavsku není ověřen už několik let a v Českém středohoří, na Kolínsku a na Královéhradecku se oproti historicky udávaným lokalitám dochovala pouze jediná (Prausová et al. 2020). Po 75 letech byl druh potvrzen i v okolí Kolína (Roleček et Šťastný 2020).

Nejméně 12 oblastí s výskytem tohoto druhu úplně zaniklo (Kovanda 2005). Kovanda (2005) zmiňuje, že změny v ekosystému a ve vegetaci mohou mít negativní dopady na přírodní prostředí a správu lesů. Autor tímto způsobem vysvětluje hlavní příčinu vymizení lokalit. Začátkem minulého století autor ověřoval různé lokality s výskytem druhu, avšak na několika z nich převažoval výskyt expanzivních druhů (*Carex brizoides*, *Senecio ovatus*, *Rubus* sp.).

Od roku 2005 se na východočeské lokalitě Vražba nachází nejdéle souvisle sledovaná populace. Výskyt jedinců je poměrně stálý, a to díky oplocení mikrolokalit. Nejnižší výskyt trsů byl 66, naopak nejvyšší podíl byl v počtu 133. Lokality prospívají účelné řízené zásahy jako je vytrhávání ostružiníků a prosvětlení keřového i stromového patra. Tyto řízené zásahy byly na lokalitě provedeny roku 2010, 2013 a naposledy roku 2016 (Prausová et al. 2020). Od roku 2018 se realizují každoročně (Prausová 2022).

Adenophora liliifolia byla historicky uváděna v mezofytiku Českého středohoří z lokality Němčí, která se nachází severně od Babinských luk (Domin 1904). Toto území s výskytem druhu bylo roku 1969 kompletně zalesněno smrkovou monokulturou. Poslední záznam o z. liliolistém je datován k roku 1974 (Domin 1904, Kubát 1986). Roku 1988 byl druh opět objeven na Babinských loukách. Kovanda (2005) potvrdil doložení druhu z PP Babinské louky herbářovými sběry z roku 1807 od Čelakovského a z roku 1876 od Hansgirga. Koncem osmdesátých let 20. století byla dnešní lokalita Babinské louky objevena Kuncovou a Kubátem (Machová et Kubát 2004). Lokality s populacemi zvonovce liliolistého (Český kras, Džbán a České středohoří) jsou v rámci soustavy NATURA 2000 monitorovány kompetentními regionálními pracovišti AOPK ČR.

Zvonovec liliolistý je na území Českého krasu historicky uváděn v termofytiku, což je oblast, ve které převažují teplomilné rostlinné druhy. Zahrnuje nižší a vyšší vegetační úrovně v nížinách a pahorkatinách. České termofytikum se vymezuje od Doupovské pahorkatiny až po východní Polabí. Panonské termofytikum zahrnuje oblasti jižní Moravy a Moravských úvalů (Skalický 1988, Slavík 1988). Z roku 1809 pocházejí nejstarší herbářové položky, které byly nasbírány v Českém krasu na lokalitě Vráž u Berouna (Brnu, Presl, 1809). První doložené herbářové sběry z roku

1957 pocházejí z dnešní PR Kralické údolí (PR, Manych, 1957). Na lokalitě U Čeřinky (tzn. Velká ohrada), probíhá pravidelné monitorování výskytu Zvonovce už od roku 1871. Taktéž byl monitoring od roku 1976 prováděn i na lokalitě Malá oplocenka. (Moucha 1984, 1986, Anonymus 1989, Severa 2003).

Na území PP Džbán byla *Adenophora lillifolia* historicky zaznamenána v termofytiku a to na lokalitách Bílichov a Zichovec (Kovanda 2000). V okolí lokality Džbán na Kladensku se v blízkosti hájovny Smradovna ve Smradenském údolí nachází omezená populace této rostliny (Brabec et Hadinec et al. 2005, Rybka et al. 2004). Herbářové nálezy z oblasti Bílichovských lesů, zahrnují vzorky z 19. století, které pocházejí z myslivny u Bílichova a myslivny u Zichovce (Bílek 1884). Známý jsou i záznamy sběrů z roku 1954 od Sojáka (Kovanda 2005). Tato lokalita je sledována V. Bylinským od roku 1958. Zvonovec liliolistý byl v roce 2009 zaznamenán ještě na dvou lokalitách v tomto fytochorionu, a to poblíž borské křižovatky a hříškovské silnice v okrese Louny (Štefánek et al. 2009, Plesková et al. 2014).

2.3. Rozmnožování a šíření druhu

Řepovitý kořen slouží k přežívání extrémních podmínek. Po nastolení příznivých podmínek, jako je např.: po období sucha v průběhu léta nebo po zimním období, raší nové lodyhy pod povrchem půdy. První stonky začínají rašit přibližně v polovině dubna. Tento typ řepovitého kořene umožňuje druhu dlouhodobé přežívání na lokalitách a také pravděpodobně funguje jako dormantní vegetativní orgán. (Prausová et al. 2020).

Zvonovec liliolistý se řadí mezi hemikryptofyta. Jsou to druhy ze skupiny vytrvalých rostlin, které mohou být dvouleté nebo vytrvalé (Scheuerer et Späth 2005). Vytrvalé rostliny mají obnovovací pupeny umístěné těsně nad povrchem půdy. V zimním období jsou pupeny pokryté sněhem, kvůli tomu jsou chráněné šupinami, živými nebo odumřelými lodyhami a listy (Hroneš 2008).

Pro častý výskyt zvonovce u cest je možné šíření antropochoricky či zoochoricky (Scheuerer et Späth 2005). Kovanda (2000) uvádí dobu kvetení od června do července, zatímco Rybka et al. (2004) zmiňuje dobu od června až po srpen. Na různých místech mimo ČR se doba kvetení může lišit, např. ve Slovinsku zvonovec

kvete od července do září (Bošok 2004). V letech s výrazně suchým začátkem léta či suchým jarem klesá počet fertálních lodyh (Scheuerer et Späth 2005).

Adenophora liliifolia využívá generativní rozmnožování. Za předpokladu, že je tento druh vystaven dostatečnému přísunu světla, živin a vlhkosti, dokáže každoročně vytvořit mnoho drobných a lehkých semen. Kovanda (2000) udává rozměry semen od 2 do 2,5 mm, která jsou zploštělá a mají rezavě hnědou barvu (obr. 4). Semena, která byla sklizena roku 2014 na českých lokalitách, byla rezavě hnědá, na povrchu svraskalá, lesklá a zploštělá. Tato semena byla o rozměrech 1,4–1,9 mm (Bajerová 2015). Semena jsou uložena v tobolkách a šíří se převážně anemochoricky (Kovanda 2000, Rybka et al. 2004, Kucharczyk et al. 2014).



Obr. 4 Semeno zvonovce liliolistého, Kyence VHX – E20, foto.:
K. Lipanská, 25.10. 2022

2.4. Dormance

Pokud je zdravé semeno v příznivých podmínkách a přesto neklíčí, nachází se ve stádiu klidu, kterému se říká dormance. K odstranění tohoto jevu se používá proces stratifikace, kdy nabobtnalá semena projdou chladem a tím se dormance přeruší. V semenech při stratifikačním období dochází k růstu hladiny giberelinů a cytokininů, ale také k degradaci inhibitorů (Tůma 1997). Rozlišujeme dva typy

dormance, a to dormanci primární a sekundární. Vrozená nebo jak již zmiňovaná primární dormance se vyskytuje u semen, která nezačínají ihned klíčit na mateřské rostlině. Regulace tohoto typu je závislá na inhibičních vlivech kyseliny abscisové (Finch – Savage et Leubner – Metzger 2006). Reakcí na nepříznivé životní podmínky vzniká dormance sekundární neboli vyvolaná. V tomto stavu dormance mohou semena přecházet krátkodobě nestabilní podmínky nebo také dlouhodobě v průběhu několika sezón (Harper 1977, Fenner 1985). K dormanci může dojít kvůli různým vlivům, např., poklesu teplot nebo silnému slunečnímu záření (Campoy et al. 2011). K přerušení stavu klidu musí dojít podnětem z vnějšího prostředí. Takovým podnětem může být např. působení světla, dusičnanů či teplot (Bewley et al. 2013).

2.5. Klíčení semen

Klíčení zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) bylo zkoumáno už mnoha studii. Testy klíčivosti probíhaly na našem území (Gavendová 1997, Truhlářová 2008, Bajerová 2015, Prausová et al. 2016a, Špringrová 2018), ale také například v Polsku (Puchalski et al. 2014). Realizované testy, které probíhaly v letech 2015–2016, uvádějí klíčivost okolo 13–14 %. Během testování byla použita chladová stratifikace, která zvýšila klíčivost až na 36 %. Nejúčinnější metodou bylo skladování semen v tekutém dusíku při teplotě -80 °C, poté semena klíčila lépe. V testech byla využita i teplotní stratifikace, která nebyla tak úspěšná. Klíčivost v tomto testu se pohybovala mezi 3–15 %, zde skladování semen nemělo významný vliv na průběh testu (Bajerová 2015, Prausová et al. 2016b). Pozitivní vliv na klíčivost mělo přidání ethephonu, z něhož se při aplikaci uvolňuje ethylen. Tento rostlinný hormon podporuje klíčení a tím stoupla klíčivost na 32 %. Nejúspěšnější variantou byl test s přidáním kyseliny gibberelové, kde byl viditelný rozdíl v klíčení v souvislosti s předchozím skladováním semen. Semena skladována v suchu měla klíčivost 79–88 %, oproti tomu semena skladována v tekutém dusíku měla klíčivost 69–94 %.

Klíčení trvá zpravidla 8–11 týdnů a při pěstování semenáčků je jejich přežívání variabilní (Scheuerer et Späth 2005).

Pokud mají klíčící rostlinky dobře vyvinuté dva děložní listy, je možné přesazení do růstových komor, kde se rostlinky dopěstovávají. Tyto klíčící rostlinky mají vzrůstové

rozměry 2–3 mm. Prausová et al. (2020) předpokládají, že semenáčky nalezené následující rok na holých místech v blízkosti mateřské rostliny a v zastoupení několika málo jedinců, budou mít vysokou mortalitu díky nízké konkurenceschopnosti a slabě rozvinutému systému kořenů. Vyšší mortalita těchto rostlin je způsobena také velkým suchem, okusem zvěří, napadením mikroorganismy nebo také sešlapem. Přehled dostupných výsledků testů klíčivosti, které byly u *A. liliifolia* realizovány, uvádí tabulka 1.

Tab.1 Přehled dostupných výsledků klíčivosti

	Test klíčivosti	Klíčivost (%)
GAVENDO VÁ (1997) původ semen: CHKO Český kras	Sterilní podmínky (70% ethanol a 10% roztok SAVO), 1/2 semen tma, 2/2 semen světlo kult. 25°C	6
	Nesterilní podmínky, 1/2 semen tma, 2/2 semen světlo, kult. 25°C	13,3 - 20
	Nesterilní podmínky, 1/2 semen tma, 2/2 semen světlo, kult. 25°C	0
TRUHLÁŘOVÁ (2008) původ semen: PP Vražba	Nesterilní podmínky, kult. stabilní 28°C	19
PUCHALSKI et al. (2014) původ semen: Dabrowa kolo Zaklikowa	Kontrola, kult. 25°C	50
	Kryokonzervace okamžité zmrazení na -160°C, kult. 25°C	52
	Kryokonzervace postupné zmrazení na -160°C, kult. 25°C	43
BAJEROVÁ (2015) původ semen: Karlštejn - zahradka, PP Vražba	Kontrola, světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	9
	SAVO (1:1), světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	6 - 11
	SAVO (1:1), světlo, tma, kult. S: 25°C, T: 25°C	4 - 26
	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	3,2 - 17,4
	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 25°C, T: 25°C	8,6 - 27,1
	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	0 - 5
PRAUSOVÁ et al. (2016) původ semen: Karlštejn - zahradka, PP Vražba	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 25°C, T: 25°C	0 - 9,5
	Kontrola, kult. 21°C	13 - 14
	Chladová stratifik. (1 měsíc v ledničce při teplotě 7±1°C), kult. 21°C	2 - 36
	Teplotní stratifik. (6 dní v termostatu při teplotě 30 ± 1°C), kult. 21°C	3 - 15
	Působ. Ethylenu - Ethephonu (24 hod., konc. 80 mg/l), kult. 21°C	13 - 32
	Působ. Kyseliny gibberelové (klíčící roztok 10 mg/l), kult. 21°C	69 - 94
	Klíčení v půdním substrátu, kult. 21°C	6 - 14
Klíčení v půdním substrátu, působení kyseliny gibberelové (klíčící roztok 10mg/l), kult. 21°C	28	
ŠPRINGROVÁ (2018) původ semen: Kralštejn - zahradka, PP Vražba	Kontrola (suché), kult.D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	2
	Kontrola (kryokonzervace), kult.D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	9
	Půdní substrát (suché), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	0
	Půdní substrát (kryokonzervace), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	4
	Půd. substrát - k. gibberelová (suché), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	26
	Půd. substrát - k. gibberelová (kryokonzervace), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	55
	Teplá (30°C - týden) a studená (8°C - měsíc) stratifik (suché), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	54
	Teplá (30°C - týden) a studená (8°C - měsíc) stratifik (kryokonzervace), kult. D: 16h (25°C), N: 8h (15°C)	80
PRAUSOVÁ (2021) původ semen: PP Vražba	Ošetř. Previcur 30 min., agar + kasein, Ethephon, D:15h (25°C), N: 9h (15°C)	20
	Ošetř. Previcur 30 min., agar + kasein, k. gibberelová, D:15h (25°C), N: 9h (15°C)	74

2.6. Semenná banka

Dosavadní výzkumy zatím jednoznačně neukázaly na existenci semenné banky a realizované laboratorní testy klíčivosti byly prováděny se skladovanými semeny starými maximálně 4 roky, kdy klíčivost se postupem času mírně zmenšovala (Bajerová 2015, Špringorová 2018). Zároveň nebyla prokázána klíčivost čerstvých semen, tj. vyklíčení v téže vegetační sezóně, kdy semena dozrála. V přírodních podmínkách jsou zřídka nalézány semenáčky, velmi často v tomtéž roce zahynou z důvodu sucha, okusu, sešlapu apod. (Prašová et al. 2020). V roce 2021 byla odebrána semena z nově objevené lokality Báň (EVL Žehuňsko – Báňský les), z nichž bylo v roce 2022 vypěstováno 24 vitálních rostlin, které byly na podzim 2022 a na jaře 2023 a lokalitu zpětně dosázeny za účelem posílení populace. Výsadba odrostlých rostlin (15–20 cm) s vytvořeným kořenovým systémem je relativně úspěšná, v červenci 2023 bylo ověřeno uchycení 17 rostlin z původních 24 vysázených (Prašová 2022, 2023).

2.7. Kontaminace

Z předchozích studií jsou prokázány značné kontaminace semen v laboratorních podmínkách. Největším problémem je napadení semen plísněmi a bakteriemi. Semena, která jsou ošetřena dezinfekčním roztokem Sava a jsou kultivována ve 21 °C, jsou nejvíce náchylná na kontaminace plísní. Naopak ty, co jsou vystavena teplotě 25 °C, u nich je zaznamenána značně menší až nulová kontaminace (Bajerová 2015). Semena se dají také ošetřit fungicidním prostředkem Previcurem. Tento přípravek by měl zabránit růst zoosporangií a vývoj mycelia. Testy probíhající s tímto ošetřením nezaznamenávají velké problémy s kontaminací (Špringorová 2018).

3 Metodika

Praktická část bakalářské práce je zaměřena především na klíčivost semen, která pocházejí z jedné z šesti českých lokalit (PP Vražba). Semena byla nasbírána školitelkou v letech 2019, 2020 a 2022. Klíčivost těchto semen byla laboratorně testována v různých variantách a poté srovnávána s již známými daty.

3.1 Skladování a příprava semen

Semena byla skladována v suchém prostředí při pokojové teplotě (21 ± 1 °C) a rozdělena podle roku sběru. K testování byla použita dobře vyvinutá semena – tmavě hnědá a přirozeně vypouklá. Celkem bylo použito 1200 suchých semen. Semena byla umístěna do malých uzavíratelných zkumavek po 100 kusech a použita k testování.

3.2 Příprava testů a pomůcky

Všechny testy byly prováděny v laboratorních, sterilních podmínkách na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové v období od 11.10.2022 do 29.3.2023. K realizaci testů byly použity tyto pomůcky: pinzety, preparační jehly, Petriho misky, kádinky, gumové rukavice, roušky, filtrační papíry, pipety, parafilm, popisovače, Savo a ethanol. Sterilní podmínky byly zajištěny v laminárním boxu (SCANLAF FORTUNA, obr. 4) pod UV lampou, některé pomůcky byly navíc vkládány do čistého Sava (5 % NaClO) pro průběžnou sterilizaci. Pro sterilizaci semen bylo použit roztok Sava (2,5 % NaClO). Veškerá manipulace se semeny byla prováděna v laminárním boxu. Semena byla ponořena do roztoku Sava na třicet vteřin. Poté byla semena propláchnuta a vkládána na sterilní filtrační papír v Petriho misce po 25 kusech. Celá Petriho miska byla překryta parafilmem, který zabraňuje případné kontaminaci. Všechny testy byly poté rovnoměrně rozloženy do kultivačního boxu (obr.5) za následujících podmínek: denní teplota 15 h (21 °C), noční teplota 9 h (15 °C). Box byl nastaven na střídání světla a tmy (měl tedy simulovat biorytmus).



Obr. 5 Laminární box pro zakládání testů klíčivosti, foto.: K. Lipanská, 28.2.2023



Obr. 6 Kultivační box se založenými testy, foto.: K. Lipanská, 7.2.2023

3.3 Testy klíčivosti

Připraveny byly čtyři testy klíčivosti, které byly rozděleny do variant dle roku sběru a způsobu přerušení dormance (přidání podpurné látky nebo chladová stratifikace) (tab.2).

Test 1 byl prováděn se sterilními semeny (2,5 % Savo) a pouze s destilovanou vodou. Sloužil jako kontrola.

Test 2 obsahoval semena ošetřená 2,5% roztokem Sava, následně byla semena propláchnuta a přendána do Petriho misek, kde byla zalitá vodným roztokem Ethephonu (80 mg/l).

Test 3 obsahoval semena ošetřená stejně jako v testu 2. V tomto testu byla semena vystavena působení vodného roztoku fytohormonu – kyseliny gibberelové (100 mg/l), která podporuje klíčení semen a prodlužování stonku.

Test 4 byl prováděn taktéž se sterilními semeny, která byla ošetřena 2,5% roztokem Sava. V této variantě byla použita chladová stratifikace, kdy byla semena vložena na dobu 1 měsíce do lednice při teplotě 8 °C (11.10.2022), následně byl test založen 8.11.2022 a ukončen ve stejnou dobu jako předešlé testy.

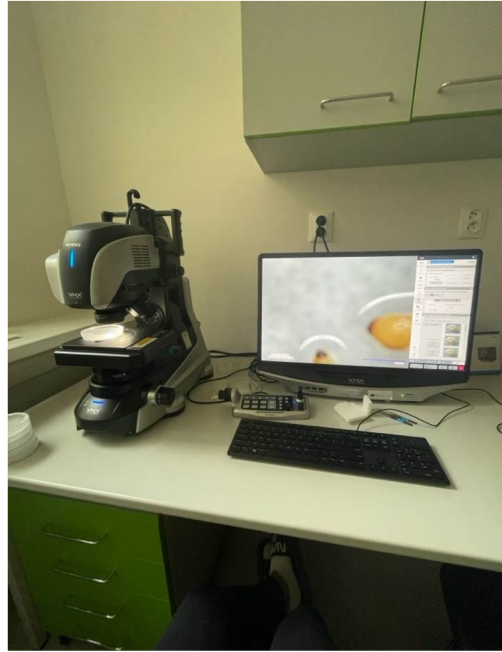
Kontrola průběhu testů probíhala každý týden ve stejný den a čas v botanické laboratoři. Ke kontrole byla použita stereolupa (ARSENAL viz obr. 7), pod kterou byl vyhodnocován týdenní nárůst vyklíčených semen, případně výskyt kontaminace. Dle potřeby byly misky zbaveny kontaminace či zality roztokem, který náležel dané variantě. Dolití či likvidace kontaminace probíhala ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Při výskytu menší kontaminace (bakterie, počátek plísně) bylo použito několik kapek ethanolu kvůli snížení rizika poškození ostatních semen. Při zjištění velkého množství kontaminace (plíseň) byla napadená semena odstraněna a místo bylo zakapáno několika kapkami 5 % NaClO, označeno a nadále sledováno. Pozorován nebyl jen počet vyklíčených semena, ale také doba klíčení v různých variantách. Každý test trval v rozmezí 17–25 týdnů. Všechna zaznamenaná data byla zapsána do tabulek. Vybrané vzorky byly fotografovány pomocí stereolupy Keyence (VHX digital microscope – obr.8) a jejich fotografie využity v této práci.

Tab. 2 Přehled použitých variant testů

Test	Varianta	Počet semen	Ošetření
1	1A	25	SAVO (2,5 %) Kontrola
1	1B	25	SAVO (2,5 %) Kontrola
1	1C	25	SAVO (2,5 %) Kontrola
1	1D	25	SAVO (2,5 %) Kontrola
2	2A	25	SAVO (2,5 %) Ethephon (80 mg/l)
2	2B	25	SAVO (2,5 %) Ethephon (80 mg/l)
2	2C	25	SAVO (2,5 %) Ethephon (80 mg/l)
2	2D	25	SAVO (2,5 %) Ethephon (80 mg/l)
3	3A	25	SAVO (2,5 %) Kys. giberelová (100 mg/l)
3	3B	25	SAVO (2,5 %) Kys. giberelová (100 mg/l)
3	3C	25	SAVO (2,5 %) Kys. giberelová (100 mg/l)
3	3D	25	SAVO (2,5 %) Kys. giberelová (100 mg/l)
4	4A	25	SAVO (2,5 %) Chladová stratifikace (8 °C)
4	4B	25	SAVO (2,5 %) Chladová stratifikace (8 °C)
4	4C	25	SAVO (2,5 %) Chladová stratifikace (8 °C)
4	4D	25	SAVO (2,5 %) Chladová stratifikace (8 °C)



Obr. 7 Kontrola klíčení stereolupou, foto.: K. Lipanská, 1.11.2022



Obr. 8 Kyence VHX – E20, foto.: K. Lipanská, 25.10.2022

3.4. Ověření výskytu semenáčků na lokalitě Babinské louky

Dne 26.7.2023 proběhlo v rámci monitoringu stavu populace zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) ověření výskytu semenáčků v blízkosti dospělých rostlin v PP Babinské louky. Byl zaznamenán počet dospělých rostlin a počet semenáčků.



Obr. 9 Semenáček Babinské louky, foto.: K. Lipanská, 26.7.2023

4 Výsledky

4.1. Výsledky testů

4.1.1. Vyhodnocení testu č. 1 – kontrola

V testu se semeny z roku 2019 celkem vyklíčily pouze 2 semena z původního počtu 100. Celková úspěšnost klíčení tedy činí 2 %. V této variantě došlo pouze k malé kontaminaci, která byla odstraněna pomocí kapání ethanolu do kontaminovaného místa v P-misce. Semena z roku 2021 měla 1% klíčivost. Oproti tomu semena, která byla nasbírána v roce 2022 měla klíčivost 3 % (Tab. 3).

4.1.2. Vyhodnocení test č. 2 – ethephon

Ve variantě s působením ethephonu měla nejvyšší klíčivost semena nasbírána v roce 2019, kdy klíčivost činila 3 %. Klíčivost semen z roku 2021, byla nižší, a to 2 %. Semena z roku 2022 měla pouze 1% klíčivost (Tab. 3).

4.1.3 – Vyhodnocení test č. 3 – kyselina gibberelová

Test s působením k. gibberelové měl nejúspěšnější klíčivost se semeny z roku 2021, kdy procentuální podíl vyklíčených rostlin činil 36 %. Zatímco semena z roku 2019 měla nulové procento klíčivosti. Klíčivost semen z roku 2022 činila 9 % (Tab. 3).

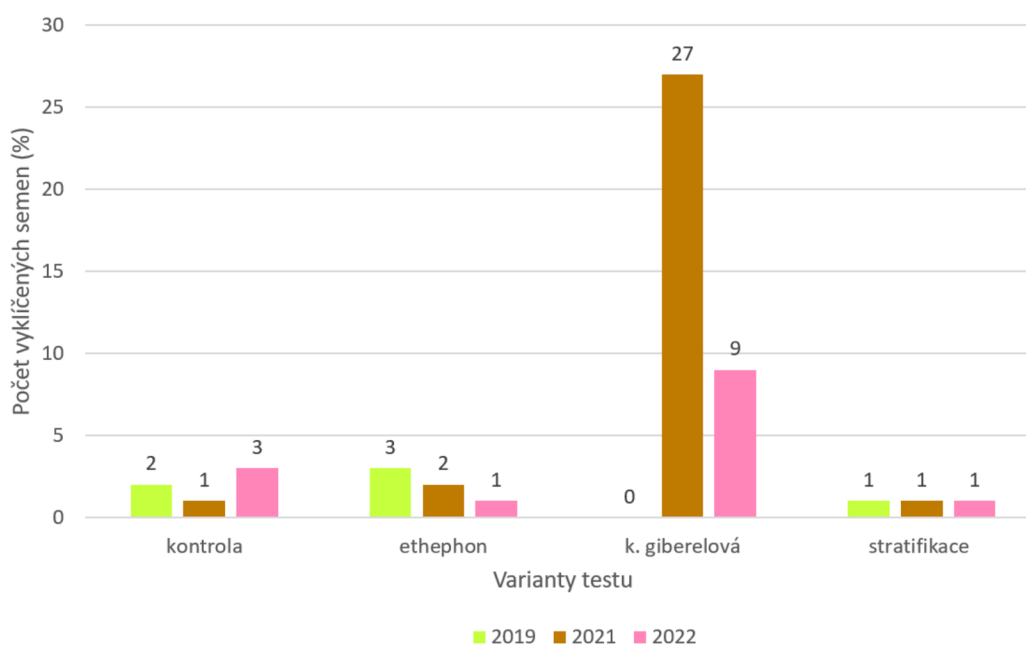
4.1.4. – Vyhodnocení test č. 4 – chladová stratifikace

Semena ošetřená chladovou stratifikací ve všech testovaných variantách (2019, 2021, 2022) nepřesáhla klíčivost 1 % (Tab. 3).

Tab. 3 Výsledky klíčení semen (%)

Test klíčivosti	Klíč. (%)
SAVO (2,5 %), kontrola, r. 2019, světlo tma, kult. D: 15 h (21 °C), N: 9 h (15 °C)	2
SAVO (2,5 %), kontrola, r. 2021, světlo tma, kult. D: 15 h (21 °C), N: 9 h (15 °C)	1
SAVO (2,5 %), kontrola, r. 2022, světlo tma, kult. D: 15 h (21 °C), N: 9 h (15 °C)	3
SAVO (2,5 %), půs. Etheponu (80 mg/l), r. 2019, světlo tma, kult. D: 15 h (21 °C), N:	3
SAVO (2,5 %), půs. Etheponu (80 mg/l), r. 2021, světlo tma, kult. D: 15 h (21 °C), N:	2
SAVO (2,5 %), půs. Etheponu (80 mg/l), r. 2022, světlo tma, kult. D: 15 h (21 °C), N:	1
SAVO (2,5 %), půs. Kyseliny giberelové (100 mg/l), r. 2019, světlo tma, kult. D: 15 h	0
SAVO (2,5 %), půs. Kyseliny giberelové (100 mg/l), r. 2021, světlo tma, kult. D: 15 h	36
SAVO (2,5 %), půs. Kyseliny giberelové (100 mg/l), r. 2022, světlo tma, kult. D: 15 h	9
SAVO (2,5 %), chladová stratifikace (8 °C, měsíc), r. 2019, světlo tma, kult. D: 15 h (21	1
SAVO (2,5 %), chladová stratifikace (8 °C, měsíc), r. 2021, světlo tma, kult. D: 15 h (21	1
SAVO (2,5 %), chladová stratifikace (8 °C, měsíc), r. 2022, světlo tma, kult. D: 15 h (21	1

Klíčovost zvonovce liliolistého dle varianty



Graf 1 Sloupcový graf klíčivosti dle varianty

4.2. Průběh testů

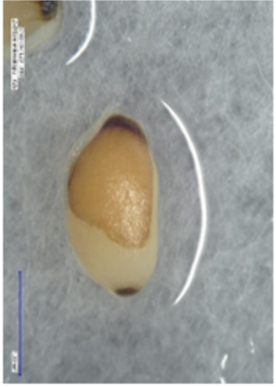
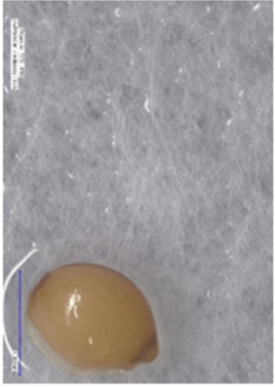
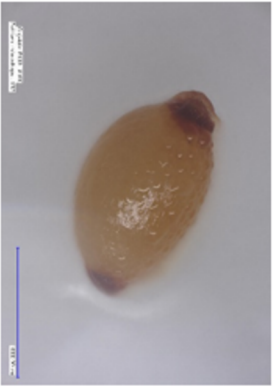
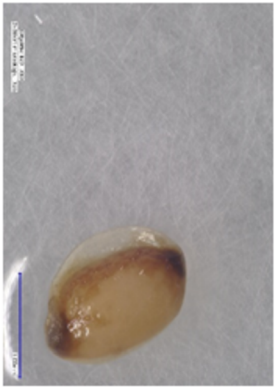
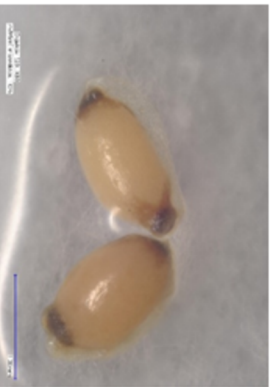


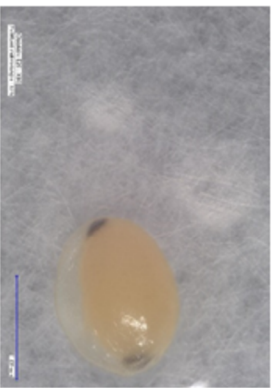

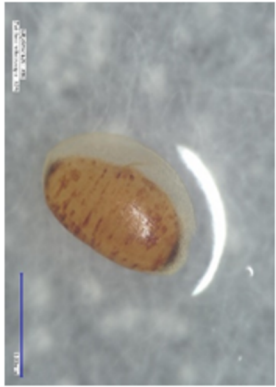

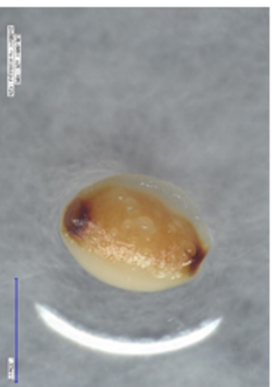
Z pravidelných kontrol testů klíčivosti vyplynulo, že semena začala klíčit 35. den ve všech variantách (Tab. 4). Nejúspěšnější klíčení semen bylo pozorováno ve variantě kontroly (1) a kyseliny giberelové (3), v těchto variantách byly 42. den přítomny




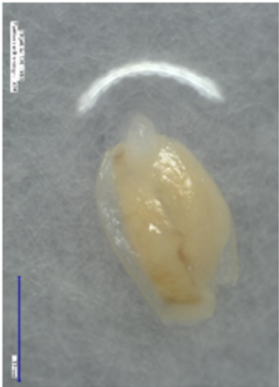
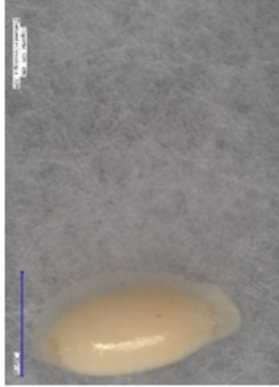
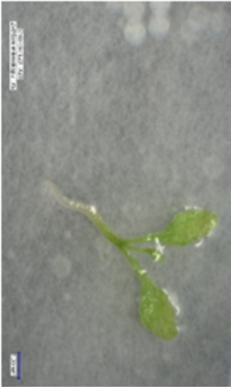


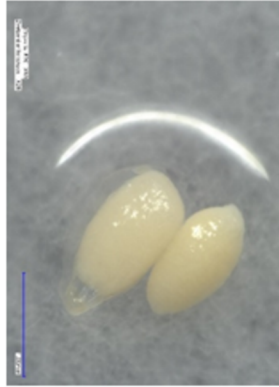
zelené vyvinuté klíčnické rostlinky. Ve variantě s použitím ethephonu došlo 42. den k vyklíčení, ale též k náhlému uhynutí, jak je viditelné z fotografie (odkaz na obr.). Do fáze klíčnické rostlinky se dostala pouze semena z variant 1 a 3. Tyto klíčnické rostlinky vyklíčily v testech 49. den. Varianty s ethephonem (2) a s chladovou stratifikací (4), neměly dále žádné pozitivní výsledky. Semena své klíčení zastavila 35. den (chladová stratifikace) a 42. den (ethephon). Výsledky byly srovnány s publikovanými daty (Tab. 4).



Obr. 10 Detail uhynulého semene, Kyence VHX – E20, foto.: K. Lipanská, 2.10.2023

Tab. 4 Zobrazení postupného klíčení, Kyence VHX – E20, foto.: K. Lipanská

	Prasklé osemení	Nabobtnalé semeno	Absorpce roztoku	
1. Kontrola	 28. den	 21. den	 7. den	
2. Ethephon	 28. den	 14. den	 7. den	
3. K. gibberelová	 28. den	 21. den	 7. den	
4. Stratifikace	 28. den	 21. den	 7. den	

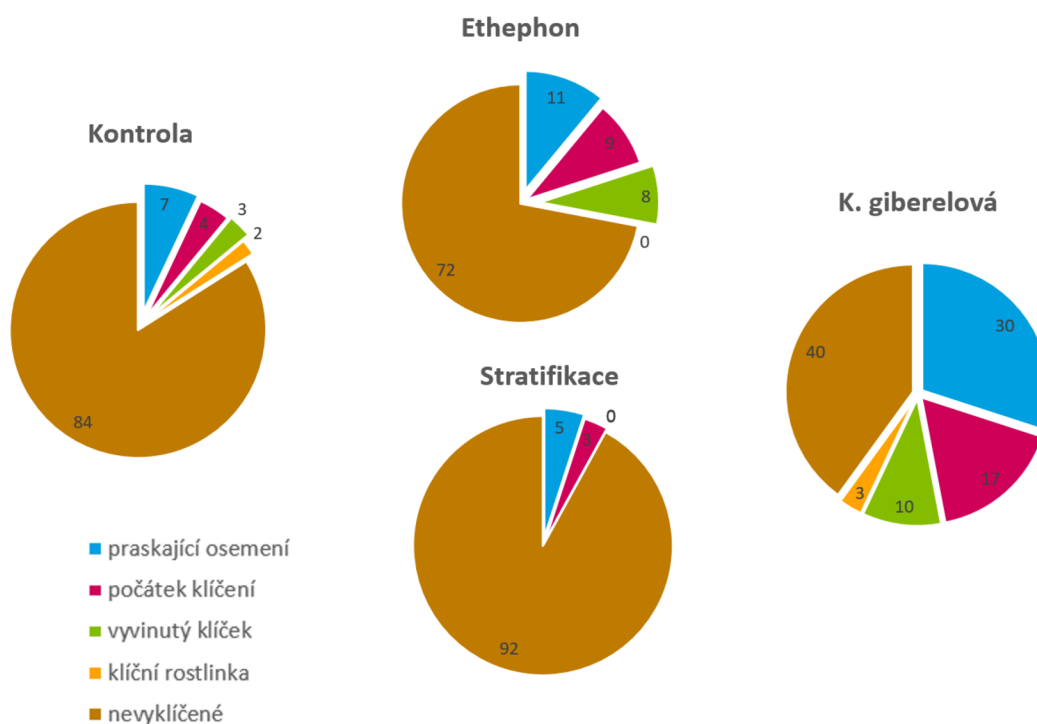
Klíčící rostlinka	Vyvinuté klíčky	Počátek klíčení
 <p>49. den</p>	 <p>42. den</p>	 <p>35. den</p>
	 <p>42. den</p>	 <p>35. den</p>
 <p>49. den</p>	 <p>42. den</p>	 <p>35. den</p>
		 <p>35. den</p>

4.3. Srovnání aktuálních a předchozích výsledků testů klíčivosti

Tab. 5 Srovnání použitých výsledků

	Test klíčivosti	Klíčivost (%)
GAVENDOVÁ (1997) původ semen: CHKO Český kras	Sterilní podmínky (70% ethanol a 10% roztok SAVO), 1/2 semen tma, 2/2 semen světlo kult. 25°C	6
	Nesterilní podmínky, 1/2 semen tma, 2/2 semen světlo, kult. 25°C	13,3 - 20
	Nesterilní podmínky, 1/2 semen tma, 2/2 semen světlo, kult. 25°C	0
TRUHLÁŘOVÁ (2008) původ semen: PP Vražba	Nesterilní podmínky, kult. stabilní 28°C	19
PUCHALSKI et. al. (2014) původ semen: Dabrowa kolo Zaklikowa	Kontrola, kult. 25°C	50
	Kryokonzervace okamžité zmrazení na -160°C, kult. 25°C	52
	Kryokonzervace postupné zmrazení na -160°C, kult. 25°C	43
BAJEROVÁ (2015) původ semen: Karlštejn - zahrada, PP Vražba	Kontrola, světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	9
	SAVO (1:1), světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	6 - 11
	SAVO (1:1), světlo, tma, kult. S: 25°C, T:25°C	4 - 26
	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	3,2 - 17,4
	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 25°C, T:25°C	8,6 - 27,1
	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 21°C, T: 21°C	0 - 5
	SAVO (3:1), Ethephon, světlo, tma, kult. S: 25°C, T:25°C	0 - 9,5
PRAUSOVA et. al. (2016) původ semen: Karlštejn - zahrada, PP Vražba	Kontrola, kult. 21°C	13 - 14
	Chladová stratifik. (1 měsíc v ledničce při teplotě 7±1°C), kult. 21°C	2 - 36
	Teplotní startifik. (6 dní v termostatu při teplotě 30 ± 1°C), kult. 21°C	3 - 15
	Působ. Ethylenu - Ethephonu (24 hod., konc. 80 mg/l), kult. 21°C	13 - 32
	Působ. Kyseliny gibberelové (klíční roztok 10 mg/l), kult. 21°C	69 - 94
	Klíčení v půdním substrátu, kult. 21°C	6 - 14
	Klíčení v půdním substrátu, působení kyseliny gibberelové (klíční roztok 10mg/l), kult. 21°C	28

ŠPRINGROVÁ (2018) původ semen: Kralštejn - zahradka, PP Vražba	Kontrola (suché), kult.D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	2
	Kontrola (kryokonzervace), kult.D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	9
	Pūd. substrát (suché), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	0
	Pūd. substrát (kryokonzervace), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	4
	Pūd. substrát - k. gibberelová (suché), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	26
	Pūd. substrát - k. gibberelová (kryokonzervace), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	55
	Teplá (30°C - týden) a studená (8°C - měsíc) stratifik (suché), kult. D: 16h (21°C), N: 8h (15°C)	54
	Teplá (30°C - týden) a studená (8°C - měsíc) stratifik (kryokonzervace), kult. D: 16h (25°C), N: 8h (15°C)	80
PRAUSOVÁ (2021) původ semen: PP Vražba	Ošetř. Previcur 30 min., agar + kasein, Ethepon, D:15h (25°C) , N: 9h (15°C)	20
	Ošetř. Previcur 30 min., agar + kasein, k. gibberelová, D:15h (25°C), N: 9h (15°C)	74
LIPANSKÁ (2023) původ semen: PP Vražba	SAVO (2,5%), kontrola, r. 2019, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	2
	SAVO (2,5%), kontrola, r. 2021, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	1
	SAVO (2,5%), kontrola, r. 2022, světlo tma, kult.D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	3
	SAVO (2,5%), půs. Etheponu (80 mg/l), r. 2019, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	3
	SAVO (2,5%), půs. Etheponu (80 mg/l), r. 2021, světlo tma, kult.D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	2
	SAVO (2,5%), půs. Etheponu (80 mg/l), r. 2022, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	1
	SAVO (2,5%), půs. Kyseliny gibberelové (100 mg/l), r. 2019, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	0
	SAVO (2,5%), půs. Kyseliny gibberelové (100 mg/l), r. 2021, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	36
	SAVO (2,5%), půs. Kyseliny gibberelové (100 mg/l) , r. 2022, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	9
	SAVO (2,5%), chladová stratifikace (8°C - měsíc), r. 2019, světlo tma, kult.D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	1
	SAVO (2,5%), chladová stratifikace (8°C - měsíc), r. 2021, světlo tma, kult.D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	1
	SAVO (2,5%), chladová stratifikace (8°C - měsíc), r. 2022, světlo tma, kult. D: 15h (21°C), N: 9h (15°C)	1



Graf 2 Koláčový graf podílu vyklíčených semen dle fází klíčení

4.4. Kontaminace semen

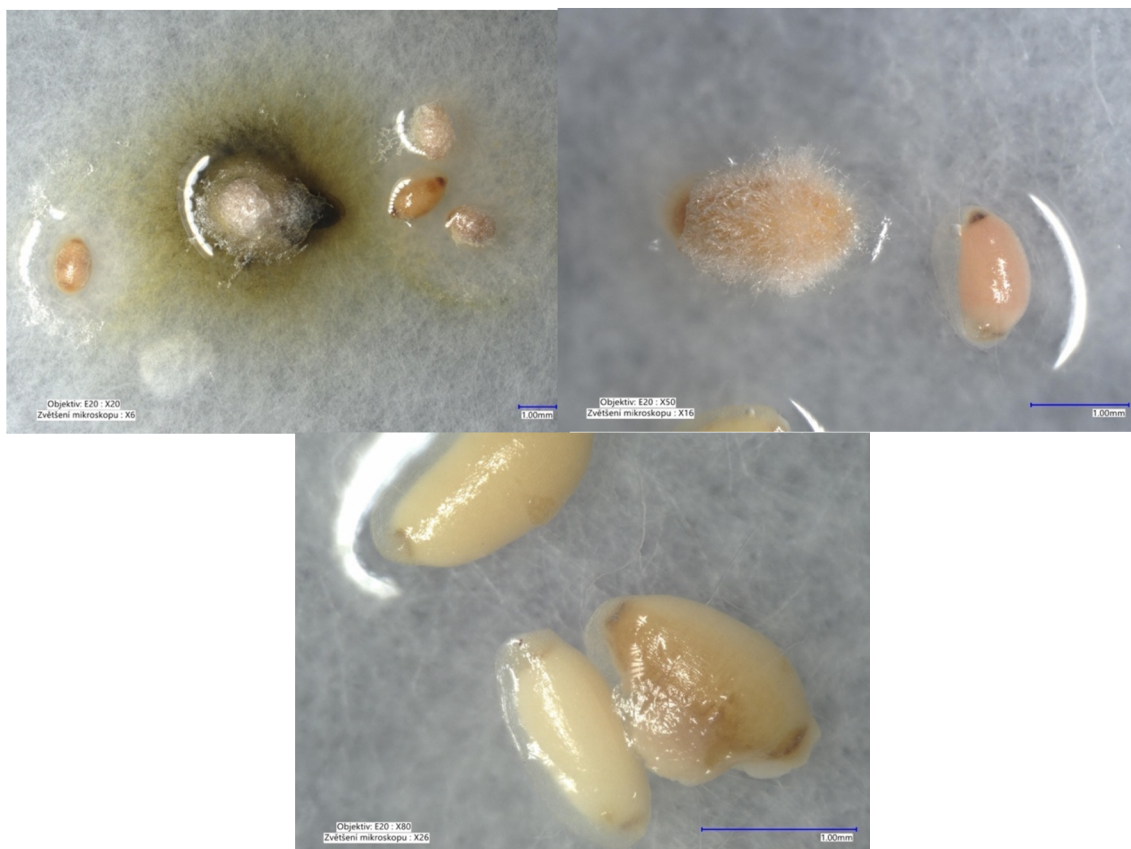
Testy klíčivosti byly komplikovány kontaminacemi. Jednalo se o napadení mikroorganismy, jako jsou plísně a bakterie.

Ze všech provedených variant bylo 26 misek se semeny kontaminováno, a to se rovná 54 % z celkového počtu.

Nejčastěji se na semenech vyskytovala plíseň. Jestliže byla semena podchycena teprve ze začátku této kontaminace, bylo napadané místo ve sterilních podmínkách zakápnuto roztokem Sava. Naopak pokud byla kontaminace ve vysokém rozpětí, napadená semena byla vyndána a místo opět ošetřeno. Savo mělo různý a někdy velmi silný vliv na semena. Semena byla buď zcela vybělená nebo uhynula. Naopak v několika Petriho miskách roztok Sava vyvolal startovací fázi a některá semena začala klíčit, avšak jen na krátkou dobu.

V několika variantách se objevilo i napadení bakteriemi. Tento typ kontaminace byl ošetřován lihem. Napadené místo bylo opět zakápnuto několika kapkami lihu.

Nejvíce podlehla kontaminaci semena nasbírána v roce 2022. Kontaminace mohla nastat z důvodu špatného skladování, krátké doby ošetření či nevytvoření dostačujících sterilních podmínek při zakládání testu.



Obr. 11 Semena napadena kontaminací, Kyence VHX – E20, foto.: K. Lipanská

4.5. Výskyt semenáčků v PP Babinské louky ve vegetační sezóně 2023

V rámci monitoringu stavu populace zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) 26.7.2023 bylo nalezeno 52 trsů tohoto druhu. V podrobném sledování lokality bylo zaznamenáno 139 fertálních lodyh v trsu, 31 sterilních lodyh v trsu a pouze dva semenáčky (obr.12). Zajímavostí bylo, že některé dospělé rostliny v letošním roce nevytvořily lodyhy, ale zůstaly v dormantním stavu, kdy vytvořily jenom okrouhlé přízemní listy (Obr. 13), případně nevytvořily žádné asimilující orgány.



Obr. 12 Semenáčky zvonovce liliolistého,
Babinské louky, foto.: K. Lipanská, 26.7.2023



Obr. 13 Okrouhlé přízemní listy zvonovce
lililolistého, Babinské louky, foto.: K.
Lipanská 26.7.2023

5 Diskuze

5.1. Srovnání vlastních výsledků s předchozími testy klíčivosti

Hlavním úkolem této bakalářské práce bylo srovnání klíčivosti různě starých semen zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v laboratorních podmínkách a přerušení jejich dormance. Výsledky testů neukázaly významnou míru úspěšnosti klíčení. Hlavním problémem byla kontaminace, přestože semena byla důkladně ošetřena 2,5% roztokem Sava. Nejméně úspěšné záznamy měla semena z roku 2019, která byla vystavena působení kyseliny giberelové o koncentraci 100 mg/l. Tato semena byla podrobena cyklu střídání světla (15 h) a tmy (9 h), kde docházelo i ke změnám teplot (21 °C a 15 °C). Klíčivost těchto semen byla nulová, což naznačuje, že tato metoda nebyla účinná. Naopak semena z roku 2021 projevila nejvyšší míru úspěšnosti v rámci testování prováděných pro tuto práci (36 %). V pokusu Prausové et al. (2016), byla semena vystavena kyselině giberelové o koncentraci 10 mg/l a následně kultivována při teplotě 21 °C. Úspěšnost tohoto testu se pohybovala v rozmezí 69–94 %. Ve svém výzkumu Špringrová (2018) dosáhla klíčivosti 26 % pomocí suchých semen s kultivací na půdním substrátu. Po aplikaci kryokonzervace vzrostla úspěšnost klíčení na 55 %. Zásadním faktorem pro markantní rozdíly úspěšnosti klíčení, je možnost rozdílných laboratorních podmínek, zejména kontaminace bakteriemi a plísněmi v testech souvisejícími s touto bakalářskou prací. V roce 2021 provedla Prausová pokus, kde byla zjištěna úspěšnost 74 % po ošetření semen Previcurem po dobu 30 minut a jejich následným klíčením na agarové půdě s přídatkem kaseinu a kyseliny giberelové. Tento rozdíl může být způsoben použitím odlišného přípravku k ošetření semen nebo i substrátu, který disponuje jinými výživovými vlastnostmi.

V další metodě byla použita chladová stratifikace po dobu jednoho měsíce při teplotě 8 °C. Tato metoda nepřinesla žádné úspěšné výsledky, a klíčivost činila u všech použitých variant 1 % úspěšnost. Výzkumný tým polských vědců se zaměřil na použití kryokonzervace, což je vystavení semen extrémně nízkým teplotám (– 160 °C). Tento postup vedl k významnému zvýšení klíčivosti semen. Konkrétně, semena po okamžitém zmrazení dosáhla klíčivosti 53 % (Puchalski et al. 2014). Použití chladové stratifikace s tepelnou stratifikací se zabývala ve své práci Špringrová

(2018). Semena byla nejprve vystavena kryokonzervaci a poté byla udržována při teplotě 30 °C po dobu jednoho týdne. Následně byla podrobena chladové stratifikaci při teplotě 8 °C během jednoho měsíce. Tento pokus dosáhl úspěšnosti klíčení 80 %. Bajerová (2015) uvádí, že velké rozdíly ve výsledcích, mohou být způsobeny vysokou teplotou, která není dostatečná pro eliminaci bakterií a plísní. Naopak, kryokonzervace tekutým dusíkem umožňuje efektivní likvidaci těchto mikroorganismů. Z dosavadních použitých metod se kryokonzervace jeví jako úspěšná.

V rámci připravovaných variant pro tuto bakalářskou práci byl použit i ethephon s koncentrací 80 mg/l k přerušení dormance. Tato zavedená metodika však neprokázala výraznou účinnost. Nejvyšší dosažená klíčivost v této variantě s ethephonem dosáhla pouze 2 %. Prausová et al. (2016a), se svým týmem dosáhly nejlepších výsledků. V tomto testu byla semena vystavena účinkům ethephonu s koncentrací 80mg/l po dobu 24 hodin a následně kultivována při teplotě 21 °C, což vedlo k dosažení úspěšnosti klíčení 32 %. Kultivací semen při 25 °C se ve své práci zabývala Bajerová (2015). Při této teplotě klíčivost klesla na 27 %. Prausová (2021) zvolila kultivaci na agarovém médiu s přidáním kaseinu a ethephonu. Semena byla nejprve ošetřena Previcurem po dobu 30 minut a poté byla kultivována při teplotě 25 °C a 9 hodin při teplotě 15 °C. Úspěšnost klíčení v tomto testu činila 20 %.

V každé probíhající studii byla zahrnuta kontrolní varianta, která obsahovala pouze destilovanou vodu, čímž se sledovalo chování semen za standardních laboratorních podmínek bez přídavku aktivátoru klíčení. Ošetření semen roztokem Sava, které bylo součástí této práce, nepřineslo žádné výrazné zlepšení klíčivosti. Nejvyšší dosažená klíčivost této varianty se ustálila na úrovni 2 %. Puchalski et al. (2014) se svým týmem provedl výzkum, kde kontrolní test probíhal při 25 °C. V rámci porovnávání s ostatními kontrolními testy dosáhla tato kontrolní varianta nejvyšší úspěšnosti (50 %). Prausová et al. (2016a) zkoumala klíčivost semen za střídání světla (16 h) a tmy (8 h). Klíčení probíhalo v Petriho miskách na filtračním papíře. Výsledná klíčivost této kontroly dosáhla hodnoty 14 %. Špringrová (2018) provedla taktéž kontrolní variantu se semeny, která byla předtím podrobena kryokonzervaci. Klíčivost těchto semen rovněž nedosáhla vysokých hodnot a snížila se na úspěšnost 9 %.

Testy provedené Gavendovou (1997), ukazují klíčení semen v nesterilních podmínkách. Tyto testy ukazují, že klíčivost semen při teplotě 25 °C dosáhla úspěšnosti 20 % v první variantě a 13,3 % ve druhé. Naopak, při nižší teplotě 20 °C, klíčivost v prvním testu klesla na 6 % a ve druhém dosáhla 0 %. Tyto výsledky naznačují, že semena preferují teplejší prostředí pro úspěšné klíčení. Z předchozích výzkumů Bajerové (2015) vyplývá, že semena zvonovce liliolistého dosahují vyšší klíčivosti při teplotě 25 °C ve srovnání s klíčením při 21 °C. to naznačuje, že tato semena mají větší tendenci klíčit na teplejších lokalitách. Testování klíčivosti semen zvonovce liliolistého se v práci zabývala Truhlářová (2008). Tento test dosáhl 19 % úspěšnosti. Truhlářová (2008) zvolila klíčení v nesterilních podmínkách na filtračním papíře v Petriho miskách a při vysoké teplotě 28 °C. Takto nepřiměřeně vysoké teplotě se semena ve volné přírodě dlouhodobě nejspíše vystavovat nebudou.

V této bakalářské práci se podařilo zachytit postupné klíčení semen, které bylo následně strukturováno do šesti fází, jak je uvedeno v tabulce 3. Z této tabulky lze získat informace o délce trvání jednotlivých fází klíčení ve dnech. První záznamy klíčení, konkrétně absorpce roztoku, byly pozorovány již sedmý den od zahájení testu. Všechna zkoumaná semena prošla fází počátečního klíčení, která nastala 35. den od spuštění testu. Do fáze vývoje klíčku dosažené 42. den postoupily tři varianty – kontrola (1), ethephon (2) a kyselina giberelová (3). Nejúspěšnějšími variantami byly 1 a 3, kde semena dosáhla fáze klíčící rostlinky (49. den).

Klíčení semen může být ovlivněno řadou faktorů, zahrnující fitness semen z různých lokalit. Dalšími faktory může být odlišná doba sběru semen, jejich stupeň zralosti a následně i způsob jejich skladování a podmínky pro kultivaci.

V případě této bakalářské práce se ukázalo, že nízká klíčivost semen byla způsobena různými kontaminacemi, díky nedostačujícímu ošetření při zahájení testu. Stejný problém s kontaminací měla ve svých testech Bajerová (2015). Její semena byla taktéž ošetřena roztokem Sava a následně kultivována při 21°C. Semena, která byla udržována při vyšší teplotě (25 °C), nedosáhla tak vysokého procenta kontaminace. Špringrová (2018) použila pro svá testovaná semena fungicidní prostředek Previcur, pro sterilizaci. Toto ošetření mělo výrazně lepší účinky. U semen těchto testů nebyl

zaznamenán vysoký podíl kontaminace. Ve volné přírodě jsou semena i klíčící rostlinky vystaveny dalším negativním faktorům a přirozeným půdním procesům, které omezují množství vyklíčených semen i počtu dospělých rostlin. Dalším faktorem, který přispívá k neúspěšnému klíčení, může být poškození semen půdními živočichy. Také okus a sešlap, který je doplňován hrabáním a rytím spárkatou zvěří, omezuje úspěšný růst tohoto druhu. (AOPK ČR, 2008; Prausová et Truhlářová 2009). Naopak okus konkurenčně schopných rostlin (např.: byliny, lesní a luční trávy, ostružiník), obnažuje plochy, což má příznivý vliv ke klíčení a růstu zvonovce liliolistého (AOPK ČR 2008).

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat klíčivost semen zvonovce liliolistého v závislosti na jejich stáří. Provedené testy se soustředily na důkazy klíčivosti pomocí různých metod, konkrétně aplikací ethephonu, kyseliny gibberelové a chladovou stratifikací. Primárním cílem bylo určit, zda semena vykazují klíčivost čerstvá nebo zda vyžadují klidové období k aktivaci klíčících procesů.

Závěry studie nebyly úplně jednoznačné. Výsledky mohly být ovlivněny nesprávným skladováním či sběrem semen, selháním sterilizačního procesu při zakládání testů, což vedlo k častým kontaminacím. Pro hlubší porozumění mechanismů úbytku populace je nezbytné provádět další testování a kultivaci semen *in vitro*. Tyto vyvozené výsledky jsou klíčové pro optimální péči o přírodní lokality, kde se vyskytuje právě zvonovec liliolistý.

Pro budoucí výzkumy by bylo vhodné před samotným testováním posoudit kvalitu semen, jako je jejich vitalita a stupeň zralosti. Příčinou neúplných výsledků mohl být předčasný sběr semen nebo semena nebyla dostatečně vitální.

Zvonovec liliolistý je řazen mezi kriticky ohrožené druhy České republiky, a jeho populace se postupně zmenšuje, ubývá též přirozených biotopů, kde druh může růst. Pro tento druh je nezbytné systematicky monitorovat přirozená stanoviště, aby bylo možné identifikovat, zda pokles populace není důsledkem lidské činnosti a souvisejících změn v krajině. Toto sledování je klíčové pro naplnění efektivních ochranných opatření.

7 Literatura

Anonymus 1989. Zvonovec za plotem. Zprav. Čes. Krasu, Beroun, 1989/3: 8.

Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky 2006. Natura 2000. Dostupné z: <http://www.nature.cz/natura2000-design3/hp.php>.

Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky 2008: Zásady managementu stanovišť druhů v evropsky významných lokalitách soustavy Natura 2000. AOPK ČR, Praha. 202 p.

Bajerová A. 2015. Studium ekologických nároků zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v podmínkách střední Evropy., Ms., 57 p. [Bak. práce, depon. in Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové].

Bílek F. 1884. Soustavný přehled rostlin cévnatých v okolí Slaného samorostlých a obecně pěstovaných I. Výr. Zpr. Obec. Výš. Gymn. Slané 4: 3-42.

Brabec J. et Hadinec J. 2005. *Adenophora liliifolia* (L.) A. DC. – In: Hadinec J., Lustyk P. et Procházka F. (2005): Additamenta ad floram Reipublicae Bohemicae. IV. – Zprávy České botanické společnosti 40: 80–82.

Domin K. 1904. České středohoří – studie fytogeografická. Praha.

Gavendová L. 1997. Využití explantátových kultur k ochraně genofondu *Adenophora liliifolia* (L.) Lebed. Ex DC. Ms., 53 p. [Dipl. Práce, depon. in: Univerzita Palackého Olomouc].

Grulich V. Chobot K., 2017 [eds.], 2017: Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Cévnaté rostliny. Příroda, Praha, 35–80.

Hoksovec L. 2007. *Adenophora liliifolia* (L.) Lebed. Ex DC – zvonovec lililolistý/zvonovec l'aliolistý. Online. Botany.cz., [cit. 2024-04-12] Dostupné z: <https://botany.cz/úcsúadenophora-lilifolia/>.

Hroneš M. 2008. Životní formy rostlin. Natura Bohemica příroda České republiky.

Kovanda M. 1998. Zvonovec vonný, *Adenophora liliifolia* (L.) Bess., na Moravě a ve Slezsku. Časopis Slezského zemského muzea, ser. A, Vědy přírodní, 47, s. 13-18.

Kovanda M. 2000. *Adenophora* Fisch. Zvonovec. [*Adenophora* Fisch. – Lilxleaf ladybell.] In: Slavík B.: Květena České republiky 6. Academia, Praha, 748 p.

Kovanda M. 2005. Zvonovec vonný (*Adenophora liliifolia*): poslední dějství? Fragmenta Ioannea Botanica, Collecta 3, s. 21-30.

Kubát K. 1986. Červená kniha vyšších rostlin Severočeského kraje. Praha.

Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J. Jun., Kaplan Z., Kirchner J. et Štěpánek J. [eds.] 2010. Klíč ke květeně České republiky. Academia. Praha. 928 p.

Machová I. et Kubát K. 2004. Zvláště chráněné a ohrožené druhy rostlin Ústecka. Academia, Praha, 220 s.

Manych J. 1957. Botanický herbář PR.

Moucha P. 1984. Kriticky ohrožené druhy rostlin. Památ. A Přír., Praha, 9.

Moucha P. 1986. Záchrana včelníku rakouského a zvonovce lililolistého. In: Problematika záchrany ohrožených druhů rostlin, 90–92, Praha.

Plesková E., Somol V., Brabec J., Štefánek M. et Krinke L. 2014. Kriticky ohrožené druhy rostlin ve Džábnu I. Závěrečná zpráva o realizaci projektu 111419. Ms., depon. in: Kancelář ÚVR ČSOP, Praha.

Prausová R., Truhlářová K. 2009: Zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*) v evropsky významné lokalitě Vražba v lesním komplexu u obce Habřina na Královéhradecku. In Vč. Sb. Přír. – Práce a studie., s. 83–110., Pardubice.

Prausová R. 2016. Výsledky pravidelného monitoringu *Adenophora liliifolia* na českých lokalitách v letech 2005–2016.

Prausová R., Marečková L., Kapler A., Majelský L., Farkas T. Indereica A., Šafářová L. et Kitner M. 2016a. *Adenophora liliifolia*: condition of its populations in Central Europe. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 58/2: 83–105.

Prausová R., Marečková L., Maixnerová K., Ptáčková L. 2016b. Čtvrtá průběžná zpráva z projektu MGSII – 17 p., ms., Průběžná zpráva, depon. in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové.

Prausová R., Rybka V., Čepelová B., Vaculná L., 2020. záchranný program pro zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*) v České republice. AOPK ČR, 67 p. Dostupné z: <https://www.zavhranneprogramy.cz/zvonovec-liliolisty/zacgranny-program-zp/>.

Prausová R. 2021. Testování klíčivosti zvonovec liliolistého (*Adenophora liliifolia*) na agarovém substrátu. Univerzita Hradec Králové, dílčí studie.

Prausová R. 2022. Průběžná zpráva z monitoringu zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v České republice. Ms., Depon, in: AOPK ČR Praha.

Presl J. S. et Presl K. B. 1819. Flora čechica: indicatis medicinalibus, oeconomicis technologiscis que plantis = Květena česká: s poznamenáním lékařských, hospodářských a řemeslných rostlin. Pragae: Calve.

Presl K.B. 1809. botanický herbář BRNU

Procházka F. 2001. [ed.] Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). – Příroda, Praha, 18: 1–166.

Puchalski J., Niemczyk M., Walerowski P., Podyma W., Kapler A. 2014. Seed banking of Polish endangered plants – the FlorNatur Project. Biodiversity Research and Conservation 34: 65–72. DOI: 10.2478/biorc-2014-0005.

Roleček J. et Šťastný M. 2020. Nález zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) u Žehuně ve středním Polabí po 75 letech.

Rybka V. Rybková V. et Hradílek Z. 2004. Rostliny ve svitu evropských hvězd. Sagittara, Olomouc, Praha, 88 p.

Severa M. 2003. *Adenophora liliifolia* (L.) A. DC. In: Hadinec J., Lustyk P. et Procházka F. [eds] 2003. Additamenta ad floram Reipublicae Bohemicae. II. Zprávy Čes. Bot. Společ. 38: 217–288.

Scheuerer M. et Späth J. 2005. Erfolgreiche Artenhilfsmaßnahmen für die in Deutschland vom Aussterben bedrohte *Adenophora liliifolia* (Campanulacea). Hoppea, Denkschr. Regensb. Bot. Ges. 66: 503–531.

Skalický V. 1988. Regionálně fytogeografické členění, in Hejný S., Slavík B., Květena České socialistické republiky 1, Academia, Praha, s. 103–121.

Špringorvá I. 2018. Význam kryokonzervace semen pro jejich klíčivost na příkladu terestrických a vodních rostlin Ms., 72 p., [Dipl. Práce, depon. In: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové].

Štefánek M., Brabec J., Krinke L. Plesková E. Somol V. et Šída O. 2009: *Adenophora liliifolia* (L.) A. DC. In: Hadinec J. et Lustyk P. [eds.] (2009): Additamenta ad floram Reipublicae Bohemicae. VIII. Zprávy Čes. Bot. Společ. 44: 185–319.

Truhlářová K. 2008. Zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*) na Jaroměřsku. Ms., 58 p., [Bakal. Práce, depon. In: Pedagogická fakulta, Univerzita Hradec Králové].

Vaculná L., Majeský L., Ali T., Seregin Ap., Prausová R. Kapler A. Iakushenko D., Thines M., Kitner M. 2021. Genetic structure of endangered species *Adenophora liliifolia* and footprints of postglacial recolonisation in Central Europe. *Conservation Genetics*.

8 Seznam příloh

8.1. Seznam obrázků

Obr. 1 Zvonovec liliolistý – olistěný stonek – Babinské louky	11
Obr. 2 Zvonovec liliolistý, celá rostlina – Babinské louky.....	12
Obr. 3 Rozšíření druhu na území ČR, (převzato z Prausová et al. 2020)	13
Obr. 4 Semeno zvonovce liliolistého, Kyence VHX – E 20.....	16
Obr. 5 Laminární box pro zakládání testů klíčivosti.....	21
Obr. 6 Kultivační box se založenými testy	21
Obr. 7 Kontrola klíčení stereolupou,	24
Obr. 8 Kyence VHX – E20.....	24
Obr. 9 Semenáček Babinské louky.....	24
Obr. 10 Detail uhynulého semene, Kyence VHX – E20.....	27
Obr. 11 Semena napadena kontaminací	33
Obr. 12 Semenáčky zvonovce liliolistého Babinské louky	34
Obr. 13 Okrouhlé přízemní listy zvonovce liliolistého	34

8.2. Seznam tabulek

Tab. 1 Přehled výsledků	18
Tab. 2 Přehled použitých variant testů	23
Tab. 3 Výsledky klíčení semen (%)	26
Tab. 4 Zobrazení postupného klíčení, Kyence VHX – E20	28
Tab. 5 Srovnání použitých výsledků.....	30

8.3. Seznam grafů

Graf 1 Sloupcový graf klíčivosti dle varianty.....	26
Graf 2 Koláčový graf podílu vyklíčených semen dle fází klíčení.....	33