

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ekologie lesa



Česká
zemědělská
univerzita
v Praze

**Generativní rozmnožování kriticky ohroženého
švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*)**

Diplomová práce

Autor: Bc. Anastázie Panská

Vedoucí práce: Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

2022

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Anastázie Panská

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Generativní rozmnožování kriticky ohroženého švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*)

Název anglicky

Generative reproduction of critically endangered orchid *Spiranthes spiralis*

Cíle práce

Diplomová práce se bude zabývat kriticky ohroženým druhem výslunných strání, švihlíkem krutiklasem (*Spiranthes spiralis*) v České republice.

Cílem je vyhodnotit parametry fitness rostlin na pohlavní rozmnožování švihlíku, zvláště se zaměřením na hodnocení klíčivosti semen švihlíku v in situ a in vitro podmínkách.

Metodika

Budou provedeny laboratorní výsevy semen z rostlin vykazujících různou fitness. Vyhodnocena bude zejména klíčivost. Protokormy budou nadále udržovány s cílem úspěšně převést rostliny do venkovního prostředí. Dále bude proveden a vyhodnocen pokus se semeny zakopanými v půdě přímo na lokalitě NPP Pastviště u Fínů, kde byla umístěna do tří různých typů prostředí.

Studentka se tak bude podílet na výzkumu autekologie a na monitoringu tohoto druhu, přičemž výsledky práce přispějí k podpoře tohoto velmi vzácného druhu na chráněných lokalitách.

Harmonogram prací:

V-VI/2021: pokus se zakopanými semeny na lokalitě.

IX-X/2021: monitoring kvetoucích rostlin na lokalitě a odběry semen.

V-XII/2021: kultivace protokormů v laboratoři

VIII-XII/2021: rešerše literatury I/2022: finální vyhodnocení pokusů

I-III/2022: sepsání konečné podoby práce

Doporučený rozsah práce

min. 50 stran bez příloh

Klíčová slova

Spiranthes spiralis, orchideje, cévnaté rostliny, červený seznam, klíčení, in vitro, in situ, kultivace

Doporučené zdroje informací

- Brabec J., Křenová Z., Nesvadbová J. (2004): Švihlík krutiklas – pozoruhodný druh naší přírody. – Živa (5): 209–211.
- Dykyjová D. (2003): Ekologie středoevropských orchidejí. – Kopp, České Budějovice.
- Ipser Z (2012): Vliv biotických a abiotických faktorů na populační dynamiku kriticky ohroženého druhu *Spiranthes spiralis*. – Ms., Dipl. práce, depon in JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH, ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA.
- Jacquemyn H., Brys R., Honnay O. (2009): Large population sizes mitigate negative effects of variable weather condition on fruit set in two spring woodland orchids. – *Biology Letters* 5: 495–498.
- Jacquemyn H., Brys R., Jongejans E. (2010): Size-dependent flowering and costs of reproduction affect population dynamics in a tuberous perennial woodland orchid. – *Journal of Ecology* 98: 1204–1215.
- Jersáková J., Kindlmann P. (2004): Zásady péče o orchidejová stanoviště. – Kopp, České Budějovice.
- Kindlmann P., Jersáková J. (2005): Effect of floral display on reproductive success in terrestrial orchids. – *Folia Geobotanica* 41: 47–60.
- Kindlmann P., Traxmandlová I., Štípková Z. (2015): Effect of global change on orchid diversity: A metaanalysis. – *Global Change & Ecosystems*, Vol. 1: Predictions on Terrestrial Ecosystems: 176–185.
- Machon N., Bardin P., Mazer S. J., Moret J., Godelle B., Austerlitz F. (2003): Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. *New Phytologist*, 157(3), 677–687.
- Nesvadbová J., Pivoňková L. (1996): Monitoring populace *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. na trvalých plochách v národní přírodní památce Pastviště u Fínů. *Příroda* 6: 95–104.
-

Předběžný termín obhajoby

2021/22 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie lesa

Konzultant

Mgr. Petr Karlík, Dr. rer. nat.

Elektronicky schváleno dne 1. 6. 2021

prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 28. 7. 2021

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 02. 04. 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Generativní rozmnožování kriticky ohroženého švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*) vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vítamváse, Ph.D. a použila jsem prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědoma, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Žichovicích dne 07.04.2022

.....

Anastázie Panská

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu Ing. Janu Vítamvásovi, Ph.D. za skvělé vedení této práce a za pomoc při práci v laboratoři, Mgr. Petru Karlíkovi, Dr. rer. nat. za konzultace a pomoc se zpracováním dat a Mgr. Radce Broumové za poskytnuté konzultace, odběr semeníků z lokality NPP Švařec a pomoc v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Jiřímu Brabcovi za možnost zúčastnit se monitoringu na lokalitě NPP Pastviště u Fínů, za pomoc při odběru semeníků a založení pokusu klíčivosti semen v in situ podmínkách.

Ráda bych poděkovala i dalším účastníkům monitoringu, kteří mi na lokalitě pomáhali, Ing. Jiřímu Šmitákovi za poskytnutí informací a zkušeností z lokality NPP Švařec a lokality u Hostýnských vrchů, Vladislavovi Hosnedlovi za poskytnutí a konzultace klimatických údajů, RNDr. Janu Ponertovi, Ph.D. za poskytnutí informací o laboratorním zpracování semeníků. V neposlední řadě chci poděkovat rodině a nejbližším přátelům za trpělivost, podporu, ale i pomoc při činnostech spojených s touto prací.

Abstrakt

Švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis* (L.) Chevall.) je kriticky ohrožený druh (C1) terestrické orchideje. Jako jeden z mála druhů středoevropských orchidejí má přezimující listové růžice, které na jaře usychají. Zároveň vykvétá až na podzim, kdy současně z nově vzniklé hlízy vyrůstá listová růžice. Tento druh je ohrožen vyhynutím změnou klimatu, přirozených stanovišť a změnou prováděného managementu. V minulosti se na území České republiky vyskytoval na více než 100 lokalitách. Dnes se ve volné přírodě vyskytuje pouze na dvou lokalitách, a to v NPP Pastviště u Fínů v Pošumaví a v NPP Švařec na Českomoravské vrchovině.

Práce se zabývala klíčivostí semen *Spiranthes spiralis* pocházejících z obou zmíněných lokalit v letech 2019, 2020 a 2021. Byl porovnán vliv biotopu (vymezen dle vláhových režimů) a fitness matečné rostliny na klíčivost semen v ex situ podmínkách. Na výsev semen bylo použito živné médium BM-1 Terrestrial Orchid Medium. Výsledky byly porovnány s klimatickými údaji ze sledovaných let. Dále byl vyhodnocen pokus klíčivosti semen v in situ podmínkách na lokalitě NPP Pastviště u Fínů a následně byly výsledky porovnány s klíčivostí semen z roku 2019 v ex situ podmínkách.

Nejvyšší klíčivost semen se střední hodnotou 28,9 % byla v ex situ podmínkách zaznamenána na lokalitě NPP Švařec v roce 2019. Nulová klíčivost byla zjištěna u semen z NPP Pastviště u Fínů odebraných v roce 2020, ve kterém nebyl proveden odběr semen z druhé lokality. Nejvyšší zaznamenaná klíčivost na lokalitě NPP Pastviště u Fínů byla taktéž v roce 2019 a dosahovala střední hodnoty 25,1 %. Rozdílnost klíčivosti semen v průběhu let mohlo ovlivnit více faktorů. Nebyl prokázán vliv biotopu či fitness matečné rostliny na klíčivost semen v ex situ podmínkách. V jednom případě vyšla závislost klíčivosti semen na výšce květonosného stvolu a závislost na počtu listových růžic. Tyto výsledky nebyly dalším sledováním potvrzeny. Semena v in situ podmínkách klíčila nejvíce na suchém stanovišti, na kterém průměrná hodnota klíčivosti semen dosahovala 19 %, na mezickém 15 % a na vyprahlém pouze 9 %. Rostliny z obou lokalit vykazovaly schopnost generativní reprodukce semeny.

Klíčová slova: cévnaté rostliny, červený seznam, ex situ, in situ, in vitro, klíčení semen, kultivace, *Orchidaceae*, *Spiranthes spiralis*

Abstract

Spiranthes spiralis (L.) Chevall is a critically endangered species (C1) of terrestrial orchids. It is one of the few species growing in Central European region and has overwintering leaf rosettes that dry in spring. It does not bloom until autumn, when its leaf rosettes grow from a newly formed bulb. The species is threatened with extinction due to climate change, natural habitats and changes in management. In the past it could be found in more than 100 locations in the Czech Republic. Currently it can only be found in 2 localities in the wild, namely the NPP Pastviště u Fínů in Pošumaví and the NPP Švařec in Českomoravská vrchovina (Bohemian-Moravian Highland).

The thesis deals with the germination of seeds originating from localities mentioned above in years 2019, 2020, 2021. Comparison of the influence of biotope (defined by moisture regimens) and fitness of mother plant on the germination of seeds in ex situ conditions was carried out. The BM-1 Terrestrial Orchid Medium was used to sow the seeds. The results were compared with climate data from the years studied. Furthermore, an in situ seed germination at the NPP Pastviště u Fínů in Pošumaví was evaluated and subsequently compared to the 2019 germination of seeds in ex situ conditions.

The highest germination rate with a median value of 28,9 % was recorded in the ex situ conditions at the NPP Švařec in Českomoravská vrchovina in 2019. Zero germination was found in seeds from the NPP Pastviště u Fínů collected in 2020, in which seeds from the other site were not collected. The highest recorded germination at the NPP Pastviště u Fínů in Pošumaví was also in 2019, reaching a median value of 25,1 %. Multiple factors may have influenced different germination rates of seeds over the years. The influence of the habitat or fitness of the mother plant on the germination rates of the seeds in ex situ conditions has not been demonstrated. In one case, the dependence of seed germination on the height of the flower-bearing stem and the dependence on the number of leaf rosettes was found. These results have not been confirmed by further monitoring. In situ seeds germinated the most in a dry habitat, where the average germination rate was 19 %, 15 % in the mesophile stand and only 9 % in the parched stand. Plants from both sites showed the ability of generative seed reproduction.

Keywords: cultivation, ex situ, in situ, in vitro, *Orchidaceae*, red list, seed germination, *Spiranthes spiralis*, vascular plants

Obsah

1. Úvod	19
2. Cíle	20
3. <i>Orchidaceae</i> – vstavačovité	21
3.1. Charakteristika	21
3.2. Morfologie	22
3.3. Vývoj semene.....	28
3.4. Mykorhiza	30
3.5. Stanoviště	34
4. <i>Spiranthes spiralis</i> (L.) Chevall. – švihlík krutiklas	36
4.1. Morfologie	36
4.2. Stanoviště	39
4.3. Rozšíření ve světě	40
4.4. Výskyt v České republice.....	42
4.5. NPP Pastviště u Fínů	43
4.5.1. Geologické a klimatické podmínky	44
4.5.2. Flóra	45
4.5.3. Fauna.....	46
4.5.4. Historický vývoj NPP	46
4.5.5. Monitoring <i>Spiranthes spiralis</i>	47
4.6. NPP Švařec	49
4.6.1. Geologické a klimatické podmínky	49
4.6.2. Flóra	50
4.6.3. Fauna.....	51
4.6.4. Historický vývoj NPP	51
4.6.5. Monitoring <i>Spiranthes spiralis</i>	52

5.	Metody ochrany pro zachování druhů	53
5.1.	In situ a ex situ ochrana.....	53
5.2.	Klíčení semen in situ.....	54
5.3.	Klíčení in vitro	55
5.3.1.	Skarifikace	56
5.3.2.	Světlo	57
5.3.3.	Teplota	58
5.3.4.	Zralost semen.....	58
5.3.5.	Klíčení semen <i>Spiranthes spiralis</i> v kultuře in vitro	59
6.	Metodika.....	61
6.1.	Odběry semeníků	61
6.2.	In situ – klíčení a přežívání semenáčků na lokalitě.....	62
6.3.	Ex situ – in vitro kultivace	63
6.4.	Klimatologické údaje	66
6.5.	Zpracování dat.....	67
6.6.	Vyhodnocení dat	68
7.	Výsledky	70
7.1.	In situ – klíčení a přežívání semenáčků na lokalitě.....	70
7.2.	Ex situ – in vitro kultivace	72
7.2.1.	NPP Pastviště u Fínů.....	72
7.2.1.1.	Vliv typu biotopu na klíčivost semen	72
7.2.1.2.	Vliv počtu květů na klíčivost semen.....	74
7.2.1.3.	Vliv počtu růžic na klíčivost semen.....	76
7.2.1.4.	Vliv výšky stvolu na klíčivost semen	78
7.2.1.5.	Porovnání klíčivosti semen během let	80
7.2.1.6.	Klimatologické údaje	80
7.2.2.	NPP Švařec	83

7.2.2.1.	Vliv počtu květů na klíčivost semen.....	83
7.2.2.2.	Vliv počtu listů na klíčivost semen.....	85
7.2.2.3.	Vliv počtu růžic na klíčivost semen.....	87
7.2.2.4.	Vliv výšky stvolu na klíčivost semen	89
7.2.2.5.	Porovnání klíčivosti semen během let	91
7.2.2.6.	Klimatologické údaje.....	91
7.2.2.7.	Porovnání klíčivosti semen na lokalitách	94
7.3.	Porovnání metod klíčivosti semen	95
8.	Diskuze	96
8.1.	In situ – klíčení a přežívání semenáčků na lokalitě.....	96
8.2.	Ex situ – in vitro kultivace	97
8.2.1.	Vliv typu biotopu na klíčivost semen	97
8.2.2.	Vliv počtu květů na klíčivost semen.....	98
8.2.3.	Vliv počtu růžic na klíčení semen.....	99
8.2.4.	Vliv výšky stvolu na klíčivost semen	100
8.2.5.	Vliv počtu listů na klíčivost semen.....	101
8.2.6.	Porovnání klíčivosti semen během let	102
8.2.7.	Klimatologické údaje.....	103
8.2.8.	Porovnání klíčivosti semen na lokalitách	105
8.3.	Porovnání metod klíčivosti semen	107
9.	Závěr.....	109
10.	Seznam literatury	110

Seznam grafů

- Graf. 1:** Počet kvetoucích exemplářů *Spiranthes spiralis* od začátku monitoringu (1986) a počet živých exemplářů *Spiranthes spiralis* od roku 1998 do roku 2021 v NPP Pastviště u Fínů (Brabec 2021). **48**
- Graf. 2:** Krabicový graf, ve kterém je porovnán typ biotopu s procentuální hodnotou klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* z lokality NPP Pastviště u Fínů v in situ podmínkách. Čára v grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Dále je zobrazen rozsah hodnot a pomocí trojúhelníku označená zdrojová data. **71**
- Graf. 3:** Krabicový graf zobrazuje vliv biotopu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* z lokality NPP Pastviště u Fínů z roku 2019. Čára grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Pomocí trojúhelníku jsou znázorněná zdrojová data. Také je zde zobrazen rozsah hodnot. **72**
- Graf. 4:** Krabicový graf zobrazuje vliv biotopu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2021 z NPP Pastviště u Fínů. Pomocí boxu je znázorněn první a třetí kvartil, čára v boxu znázorňuje medián. Dále je zobrazen rozsah hodnot, pomocí kolečka jsou zobrazeny odlehlé hodnoty a hvězdičkou extrémní hodnoty. **73**
- Graf. 5:** Bodový graf znázorňuje ovlivnění procentuální klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* z NPP Pastviště u Fínů z roku 2019 počtem květů. Body byla proložená regresní přímka (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. **74**
- Graf. 6:** Bodový graf zobrazuje závislost klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* z lokality Pastviště u Fínů z roku 2021 na počtu květů. Grafem byla proložená regresní přímka a pomocí ní vytvořená lineární regrese, testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. **75**
- Graf. 7:** Bodový graf znázorňuje vliv počtu listových růžic na klíčivost semen odebraných v roce 2019 z NPP Pastviště u Fínů. Body byla proložená regresní přímka (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. **76**

Graf. 8: Bodový graf znázorňuje závislost procentuální hodnoty klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* na počtu růžic ze semen odebraných v roce 2021. Do grafu byla vložena regresní přímka (lineární regrese). Testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu..... 77

Graf. 9: Bodový graf zobrazuje vliv výšky květonosného stvolu na procentuální klíčivost semen odebraných v roce 2019 na lokalitě Pastviště u Fínů. Grafem byla proložena regresní přímka znázorňující lineární regrese, jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. 78

Graf. 10: Bodový graf zobrazuje vliv výšky stvolu na klíčivost semen z NPP Pastviště u Fínů z roku 2021. Body grafu byla proložena regresní přímka. Testovaná kritéria lineární regrese jsou uvedena v pravé horní části grafu. 79

Graf. 11: Krabicový graf znázorňuje procentuální klíčivost semen *Spiranthes spiralis* v jednotlivých sledovaných letech na lokalitě NPP Pastviště u Fínů. Boxy znázorňují první a třetí kvartil, čára v těchto boxech znázorňuje medián. Dále je zde zobrazen rozsah hodnot, pomocí kolečka odlehlé hodnoty a pomocí hvězdy extrémní hodnoty. 80

Graf. 12: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–10.10.2019. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipky zobrazují, kdy byly odebrány semeníky (Hosnedl 2022). 81

Graf. 13: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–10.10.2020. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipka zobrazuje datum odběru semeníků (Hosnedl 2022). 82

Graf. 14: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–10.10.2021. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipky zobrazují, kdy byly provedeny odběry semeníků (Hosnedl 2022). 82

Graf. 15: Bodový graf znázorňuje vliv počtu květů na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* z lokality NPP Švařec z roku 2019. Body grafu byla proložená regresní přímka (lineární regrese), jejíž testová kritéria jsou uvedena v pravém horním rohu..... **83**

Graf. 16: Bodový graf znázorňuje vliv počtu květu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2021 na lokalitě Švařec. Body grafu byla proložená regresní přímka (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. **84**

Graf. 17: Bodový graf zobrazuje vliv počtu listů v růžici na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2019 v NPP Švařec. Body grafu byla proložená regresní přímka (lineární regrese). Testová kritéria lineární regrese jsou umístěná v pravé horní části grafu..... **85**

Graf. 18: Bodový graf zobrazuje závislost klíčivosti semen na počtu listů v listové růžici. Semena byla odebrána v roce 2021 na lokalitě NPP Švařec. Body byla proložená regresní přímka (lineární regrese) a její testová kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu..... **86**

Graf. 19: Bodový graf znázorňuje vliv počtu listových růžic na klíčivost semen odebraných v roce 2019 z lokality NPP Švařec. Body grafu byla proložená regresní přímky vyjadřující lineární regresi. Testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. **87**

Graf. 20: Bodový graf zobrazuje závislost klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* na počtu růžic na lokalitě NPP Švařec v roce 2021. Body grafu byla proložená regresní přímka (lineární regrese) a její testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. **88**

Graf. 21: Bodový graf znázorňující závislost klíčivosti semen na výšce květonosného stvolu. Semena *Spiranthes spiralis* byla odebrána v roce 2019 na lokalitě Švařec. Bodovým grafem byla proložená regresní přímka (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. **89**

Graf. 22: Bodový graf zobrazuje vliv výšky stvolu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2021 na lokalitě NPP Švařec. Body tohoto grafu byla proložena regresní přímkou znázorňující lineární regresi. Testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu. 90

Graf. 23: Krabicový graf znázorňuje procentuální klíčivost semen *Spiranthes spiralis* během roku 2019 a 2021 z lokality NPP Švařec. Čára grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Dále je zobrazen rozsah hodnot a pomocí kolečka jsou označeny odlehlé hodnoty. 91

Graf. 24: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–25.09.2019. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipka zobrazuje datum odběru semeníků (CHMÚ 2022). 92

Graf. 25: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–25.09.2021. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipka zobrazuje odběr semeníků (Horníček 2022). 93

Graf. 26: Krabicový graf zobrazuje klíčivost semen *Spiranthes spiralis* v jednotlivých letech na lokalitě NPP Švařec (zelená barva) a NPP Pastviště u Fínů (žlutá barva). Boxy vymezují první a třetí kvartil, čára v grafu zobrazuje medián. Dále je uveden rozsah hodnot, pomocí kolečka jsou vyznačeny odlehlé hodnoty a pomocí hvězdy extrém (pouze z lokality NPP Pastviště u Fínů). 94

Graf. 27: Krabicový graf porovnává metody zkoumání klíčivosti semen s procentuální hodnotou klíčivosti semen *Spiranthes spiralis*. Čára v grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Dále je zobrazen rozsah hodnot a pomocí kolečka odlehlé hodnoty. 95

Seznam obrázků

Obr. 1: Kvetoucí exemplář <i>Spiranthes spiralis</i> s vyrůstajícími listovými růžicemi (Brabec 2005).....	36
Obr. 2: Nákres fenologických fází <i>Spiranthes spiralis</i> během roku (Brabec et al. 2004).....	39
Obr. 3: Mapa areálu rozšíření <i>Spiranthes spiralis</i> na území Evropy (Brabec et al. 2004).....	41
Obr. 4: Současný přirozený výskyt <i>Spiranthes spiralis</i> na území České republiky (Ipser 2010).	43
Obr. 5: Pohled na severní část NPP Pastviště u Fínů směrem na místo s výskytem populace <i>Spiranthes spiralis</i> (Marková 2021).	44
Obr. 6: Pohled na svažité území v NPP Švařec (Broumová 2019).....	49
Obr. 7: Způsob aplikace metody pro zkoumání klíčivosti semen pomocí diapozitivů (Rasmussen & Whigham 1993).	54
Obr. 8: Jednotlivé fáze klíčení semen <i>Spiranthes spiralis</i> . (a) – semeno, (b–d) – fáze protokormu, (e) – stav rostliny při tvorbě prvních nadzemních orgánů, (f) – následný vývoj rostliny tvořící dvě kořenové hlízy (Ziegespeck 1936, cit. podle Ipser 2012). 60	
Obr. 9: Zralost semeníků těsně před jejich odběrem (Panská 2021).	61
Obr. 10: Rozmístění jednotlivých pokusných ploch v severní části NPP Pastviště u Fínů (Mapy.cz 2020).	63
Obr. 11: Příprava injekční stříkačky a semen před jejich výsevem (Panská 2021)..	66
Obr. 12: Výsev semen do Petriho misky (Panská 2021).....	66

Obr. 13: Označení stavu klíčících semen v in situ podmínkách. Zeleně označená klíčící semena, červeně neklíčící semena (Panská 2021).....	67
Obr. 14: Protokorm s houbovým myceliem (Panská 2021).....	67
Obr. 15: Znázornění rozdělení Petriho misky s klíčícími semeny 13 týdnů od výsevu (Panská 2019).....	68
Obr. 16: Označení stavu klíčících semen v ex situ podmínkách. Zeleně jsou označené klíčící semena a červeně neklíčící semena (Panská 2022).....	68

Seznam tabulek

Tab. 1: Počet odebraných semeníků z jednotlivých lokalit v jednotlivých letech. ... **62**

Tab. 2: Složení média BM – 1 Terrestrial Orchid Medium (HiMedia 2022). **64**

Tab. 3: Průměrná denní teplota a celkový úhrn srážek za sledované období v letech 2019, 2020 a 2021 pro NPP Pastviště u Fínů (Hosnedl 2022). Dále je zobrazen celkový roční úhrn srážek v letech 2019, 2020 a 2021 (CHMÚ 2022). **81**

Tab. 4: Průměrná denní teplota a celkový úhrn srážek za sledované období v letech 2019 a 2021 pro NPP Švařec (pro rok 2019 zdroj: CHMÚ 2022; pro rok 2021 zdroj: Horníček 2022). Dále je zobrazen celkový roční úhrn srážek (ČHMÚ 2022). **92**

1. Úvod

Čeď vstavačovitě (*Orchidaceae*) s 736 rody je druhá největší rostlinná čeď (Christenhusz & Byng 2016). Přibližně čtvrtina druhů je ohrožena vyhynutím z důvodu změny klimatu, změny přirozených stanovišť a změnou jejich obhospodařováním (Swarts & Dixon 2009).

V Evropě lze nalézt pouze terestrickou neboli pozemní životní formu orchidejí (Průša 2019). Většina těchto orchidejí vykvétá na začátku vegetačního období a nepříznivé zimní období přečkává v podzemních orgánech jako např. vemeníček zelený (*Coeloglossum viride*), prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*), pětiprstka žežulník (*Gymnadenia conopsea*), okrotice bílá (*Cephalanthera damasonium*). Lze zde najít výjimky, které mají nadzemní asimilační orgány produkční během zimního období, poté vykvétají a léto přečkávají v podzemních orgánech. Jsou to druhy např. vstavač kukačka (*Anacamptis morio*) nebo rudohlávek jehlancovitý (*Anacamptis pyramidalis*). Od této skupiny je odlišný švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis*), který vytváří květenství až na podzim (Jersáková & Kindlmann 2004).

Vstavačovitě tvoří velmi malá semena, a proto jsou minimálně v ranných vývojových stádiích závislé na mykorhizní symbióze (Rasmussen 1995; Smith & Read 2008). Z důvodu výše zmíněné velikosti semen je obtížné pozorovat jejich klíčení v přirozených podmínkách. Nejprve byla klíčivost semen pozorována v laboratorních podmínkách, kdy v Knudson (1922) zavedl asymbiotické živné médium a zjednodušil tím kultivační postupy (Arditti 2008). Pro zjištění klíčivosti semen přímo na lokalitě výskytu se nejčastěji používá metodika od Rasmussen & Whigham (1993) za pomoci semen uložených v nylonové síti a diapozitivu.

Tato diplomová práce se věnuje klíčivosti semen terestrické orchideje švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis*) v přirozených podmínkách na lokalitě NPP Pastviště u Fínů a v laboratorních podmínkách, kde byla porovnána klíčivost semen z lokality NPP Pastviště u Fínů a NPP Švařec v průběhu tří let. Na těchto dvou sledovaných lokalitách jsou zaznamenány poslední přirozeně se vyskytující populace švihlíku krutiklasu v České republice (Brabec et al. 2004). Cílem této práce je zjistit, zda je klíčivost semen v laboratorních podmínkách závislá na typu biotopu, výšce květonosného stvolu, počtu květů, počtu listových růžic a počtu listů. Dále zda mohl průběh klimatických podmínek ovlivnit vývoj a následnou klíčivost semen.

2. Cíle

- Porovnání klíčení semen v ex situ podmínkách během let 2019, 2020 a 2021 s fitness parametry rostlin (výška květonosného stvolu, počet květů, počet listových růžic, počet listů v listové růžici, typ biotopu stanoviště)
- Porovnání klíčení semen v ex situ podmínkách z lokalit NPP Pastviště u Fínů a NPP Švařec v letech 2019, 2020 a 2021
- Posouzení vlivu klimatických podmínek na klíčení semen v ex situ podmínkách z lokalit NPP Pastviště u Fínů a NPP Švařec v letech 2019, 2020 a 2021
- Vyhodnocení klíčivosti semen v in situ podmínkách z lokality NPP Pastviště u Fínů z roku 2019
- Porovnání klíčení semen z lokality NPP Pastviště u Fínů v ex situ a in situ podmínkách z roku 2019

3. *Orchidaceae* – vstavačovitě

3.1. Charakteristika

Čeď vstavačovitě (*Orchidaceae*) zahrnuje přibližně 736 rodů a asi 28 000 druhů rostlin. Díky tomu je, po čeledi hvězdnicovitě (*Asteraceae*), druhá největší (Christenhusz & Byng 2016). Zároveň *Orchidaceae* je po čeledi *Melanthiaceae* druhá čeď s nejrozmanitější variací velikosti genomu (Trávníček et al. 2019). Jedná se o vývojově nejmladší a zároveň druhově nejpestřejší čeď. Vstavačovitě jsou stále pod tlakem ontogenetického i fylogenetického vývoje (Dykyjová 2003). Vyskytují se téměř na celém povrchu Země, kromě pouštních a polárních oblastí. Největší zastoupení této čeledi je v tropech, kde se vyskytuje více než tři čtvrtiny známých druhů orchidejí (Zhang et al. 2018; Průša 2019). Ale i přesto je jejich výskyt spíše ojedinělý či vzácný (Zhang et al. 2018). Na území České republiky se vyskytuje 25 rodů a přibližně 64 druhů a poddruhů orchidejí (Průša 2019). Dle Dykyjové (2003) jsou dva druhy orchidejí v České republice již vyhynulé.

Vstavačovitě jsou převážně lysé a vytrvalé byliny. Z tropických oblastí známe epifytické druhy orchidejí. Geofytické orchideje se vyskytují především v mírném podnebním pásmu. Jak v České republice, tak i v celé Evropě rostou pouze terestrické druhy vstavačovitých. Orchideje se taktéž odlišují způsobem výživy. Některé druhy jsou autotrofní, další mixotrofní nebo obligátně heterotrofní (Průša 2019). Různorodost lze najít i v přirozených biotopech jednotlivých druhů orchidejí. Nejvíce našich orchidejí roste na stanovištích středně zásobených vodou neboli mezických stanovištích. Například vstavač vojenský (*Orchis militaris*) nebo pětiprstka vonná (*Gymnadenia odoratissima*) mají nejpříznivější podmínky pro život na suchých loukách, ale i na vlhkých slatinách (Jersáková & Kindlmann 2004). Pro čeď vstavačovitě je charakteristická odlišná diverzita ve tvaru i barvě květu, kterou u jiných čeledí lze najít obtížně. Diverzitu využívají k vazbě na specifické opylovače. Horní pysk neboli labellum je rozšířen a prodloužen. Labellum je barevně odlišeno od ostatních okvětních lístků a je otočeno dolů. Díky tomuto otočení funguje jako přistávací plocha pro hmyz (Dykyjová 2003).

Mnoho čeledí kvetoucích rostlin přijímají živiny pomocí mykorhizní symbiózy (Dykyjová 2003). Jedná se o mutualistický vztah rostliny a houby, ve kterém si navzájem vypomáhají v transportu organických a anorganických látek rozpuštěných

ve vodě (Pešková 2008). Výjimku netvoří ani čeleď vstavačovité. Spolu s mykorhizní houbou vytváří orchideoidní mykorhizu, která je považovaná za nejmladší typ endomykorhizní symbiózy, a je celosvětově rozšířená. Mykorhiza je pro orchideje důležitá především v raném věku. Klíčící semena orchidejí využívají mixotrofii do doby, než jsou schopna samy produkce asimilačních látek pomocí fotosyntézy. V dospělosti je většina rostlin autotrofních nebo kombinují fotosyntézu s mixotrofií (Smith & Read 2008).

3.2. Morfologie

V mírném pásmu lze nalézt terestrické druhy vstavačovitých. Nejčastěji zde rostou druhy, které nepříznivé období přečkávají v kořenových hlízách. Tato adaptace je způsobena jejich původem ze Středozeří s tím rozdílem, že pro ně nepříznivé období bylo suché a horké léto (Průša 2019). Tvar hlíz posloužil jako inspirace pro pojmenování některých druhů vstavačovitých ve vědeckém jazyce i mezi veřejností. Celá čeleď vstavačovitých získala jméno podle základního tvaru hlízy, která je obvykle kulovitá až vejčitá. Charakteristická pro rod *Orchis*, např. vstavač mužský (*Orchis mascula*), ale i pro rod *Ophrys* (Dykyjová 2003). Rod prstnateců (*Dactylorhiza*) má hlízy zploštělé, jejich spodní část je rozdělená do dvou, čtyř i více laloků, někdy je mohou mít rozdělené až k bazální části hlízy (Soó 1980). V tomto místě se zakládá obnovovací pupen příští nadzemní lodyhy. Hlíza rodu pětiprstka (*Gymnadenia*) je rozdělena do většího počtu laloků, jsou dlanitě zploštělé a tím připomínají dlaň s pěti, někdy i více prsty (vznik pojmenování). Druhy jako běloprstka bělavá (*Pseudorchis albida*) a prstnatec zelený (*Dactylorhiza viridis*) nemají typickou kořenovou hlízu, ale oddenkovou. Jejich oddenek se prodlužuje v několik částí. Vypadá jako ztloustlý kořen s obnovovacím pupenem příští lodyhy v úžlabí. Kromě těchto hlíz u vstavačovitých lze nalézt i pahlízy. Jedná se o hlízovitě ztloustlé bazální části lodyhy s velkým množstvím tenkých adventivních kořínků. Pahlízy najdeme nejčastěji u epifytických druhů orchidejí z tropických oblastí. V mírném pásmu je lze nalézt u měkčilký jednolisté (*Malaxis monophyllos*), měkkyně bažinné (*Hammarbya paludosa*) nebo hlízovce Loeselova (*Liparis loeselii*) (Dykyjová 2003; Průša 2019). Obvykle jsou zelené a vstavačovité je využívají pro ukládání zásobních látek a vody. Bazální část, která pochází ze stonku tloustne ve chvíli, kdy vytvoří listy a umožní to vznik nové pahlízy. Původní pahlíza na konci vegetačního období i s listy odumře (Sekerka et al. 2006). Hlízy obsahují salep (pro vstavačovité specifický glycid,

kvůli kterému byly jejich hlízy v minulosti vyhledávané) a škrob (Dykyjová 2003; Průša 2019). Hlízy obsahují 48 % slizu, 27 % škrobu, 15 % bílkovin a jedno procento glycidů (Procházka 2010).

Nepohlavní neboli vegetativní rozmnožování využívá značná část vstavačovitých. Například smrkovník plazivý upřednostňuje vegetativní rozmnožování před generativním (Procházka & Velísek 1983). K tomuto rozmnožování využívají podzemní rezervní orgány (oddenky, hlízy a kořeny). U některých druhů lze na lokalitě nalézt vyšší počet kvetoucích rostlin, které pocházejí z jedné matečné rostliny (Dykyjová 2003). Procházka & Velísek (1983) uvádějí způsob, jak lze podpořit vegetativní rozmnožování rostlin na přírodním stanovišti i v umělých podmínkách. Například u vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) je vhodné odstranit vyrůstající mladé květenství z listů a tím se podpoří vývoj nových hlíz. Další způsob uvádějí odstranění nových hlíz těsně po vytvoření, ošetřit ránu a ihned ji vysadit. Hlíza pokračuje ve vývoji stejně, jako kdyby došlo k odumření původní hlízy. Matečná rostlina, ze které byla hlíza odebraná, začne vytvářet další nové hlízy. Pro úspěšnost musí být hlíza odebraná včas, protože doba odběru je závislá na druhu rostliny. Metoda je úspěšná např. u prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*) nebo švihlíku krutiklas (*Spiranthes spiralis*) (Procházka & Velísek 1983). Vegetativní rozmnožování by mohlo být využito při přesazování vstavačovitých z ohrožených stanovišť na nová vhodná stanoviště (Dykyjová 2003).

Všichni zástupci vstavačovitých jsou minimálně v raném vývojovém stádiu zcela mykoheterotrofní (Gryndler et al. 2004). Po celý život jsou na ni odkázané heterotrofní druhy orchidejí (Dykyjová 2003; Rasmussen & Rasmussen 2014). Jedná se o rostliny, které obsahují malé nebo žádné procento chlorofylu ve svých nadzemních orgánech a nejsou schopné fotosyntetizovat. Ztrátou chlorofylu se rostliny adaptovaly na nedostatek slunečního záření v lesních porostech (Rasmussen & Rasmussen 2014). Jejich podzemní orgány jsou proto charakteristicky přeměněné. Například hlístník hnízdák (*Neottia nidus-avis*) má kořeny v zemi ve tvaru nahloučeného velkého hnízda, které jsou ztloustlé s obnovovacími pupeny a bohatě vybavené endomykorhizou. Příjem organických a anorganických látek rozpuštěných ve vodě zajišťují vlákna mykorhizních hub, protože hlístník nemá kořeny s kořenovými vlásky. I hnědenec zvrhlý (*Limodorum abortivum*) využívá endotrofní mykorhizu. Taktéž jsou jeho kořeny hnízdovitě nahloučené, dlouhé 10–15 cm a tlusté až 1 cm (Dykyjová 2003).

Listy terestrických orchidejí jsou celokrajné, čárkovité, obvejčité až vejčité s podélnou žilnatinou (Procházka & Velísek 1983). Výjimku tvoří smrkovník plazivý (*Goodyera repens*), který má síťnatou žilnatinu (Průša 2019). Zpravidla jsou tenké, jednoleté, nejčastěji vyvinuté v dolní části lodyhy, případně těsně nad zemí zformované do růžice (Procházka & Velísek 1983). Listy mohou být i střídavé, postavené ve spirále, nebo ve dvou řadách (Průša 2019). Směrem nahoru po lodyze se lístky rychle zmenšují a přecházejí v malé listenovité lístky. Nezelené druhy orchidejí mají zakrnělé listy v podobě nefunkčních drobných šupin (Procházka & Velísek 1983). Vstavačovitě, které obsahují chlorofyl, a i přesto jsou silně mykotrofní, mají všechny listy zakrnělé, např. krušík drobnolistý (*Epipactis microphylla*) (Průša 2019).

Květy orchidejí bývají nejčastěji sestavené do hroznovitěho květenství neboli klasu (Procházka & Velísek 1983). Klas je buď všestranný – vstavač (*Orchis*), pětiprstka (*Gymnadenia*), prstnatec (*Dactylorhiza*) nebo šroubovitě zakroucený, jako tomu je u rodu švihlík (*Spiranthes*). Méně často jsou jednotlivě – střečičník pantoflíček (*Cypripedium calceolus*) (Průša 2019). Květ na vrcholu je zakrnělý, i když se jedná o jediný květ na lodyze (Procházka & Velísek 1983). Díky přeměně okvětí, pohlavních orgánů, tyčinek a pestíků se stal květ vstavačovitých souměrný podle jedné osy to znamená, že se jedná o zygomorfní květ. Květy jsou téměř vždy monoklinické neboli oboupohlavní (Procházka & Velísek 1985; Dykyjová 2003). Celkem mají 6 okvětních lístků, které jsou barevně i tvarově rozlišeny. Labellum neboli pysk je přeměněný okvětní lístek, který má odlišný tvar než ostatní. Na spodní straně je trubkovitě srostlý a díky prodloužení má tvar ostruhy. Pysk v poupatech se nachází v horní části. Při rozkvétání dochází ke geotropickému otáčení o 180° celého semeníku nebo stopky, tento jev je nazýván jako resupinace. U tořičů (*Ophrys*) nebo střečičníku (*Cypripedium*) k resupinaci nedochází. Aby se pysk ocitnul ve spodní poloze, probíhá zde překlopení listenů. Jsou i druhy, kde pysk zůstává v horní poloze díky otočení květu až o 360°, např. měkčilka jednolistá (*Malaxis monophyllos*) nebo měkkyně bažinná (*Hammarbya paludosa*) (Dykyjová 2003; Průša 2019). Vnější okvětní lístky tvoří ochranu květu. Dva vnitřní lístky jsou barevně i tvarově identické (Procházka 2010).

U orchidejí jsou tyčinky a pestík jiné než u ostatních čeledí. V jejich květu se nachází pouze jedna tyčinka, která přirostla k pestíku. Dohromady tvoří

gynostemium, na jehož vrcholu se nachází zmíněná jediná tyčinka. Prašník této tyčinky je umístěn na vrchu gynostemia pod kápovitou čepičkou a je rozdělen ve dva prašné váčky. Posunutí blizny dopředu na vnitřní stranu květu umožnilo vznik osové souměrnosti s protilehlým pyskem (Dykyjová 2003). Z terestrických druhů vstavačovitých vyskytujících se v mírném pásmu má pouze střevíčník zachované dvě tyčinky (Procházka & Velíšek 1983). Semeník je srostlý ze tří plodolistů a je pokračováním stopky. Nachází se pod okvětím a při rozkvétání se spolu s poupětem otáčí o 180°. Orchideje nemají typická volná pylová zrna v podobě prachu, ale jsou seskupeny viscinovými vlákny v pollinium, které je připevněné k lepivému terčíku (Dykyjová 2003). Dohromady vytváří brylku neboli pollinarium uložený v přeměněném kapsičkovitém laloku na blizně. Pollinarium vstavačovité vytváří v důsledku malého množství opylovačů (Johnson & Nilsson 1999). Brylky jsou vcelku přenášeny na kořenu sosáku nebo hlavě opylovače, na který se přilepí pomocí terčíku. Aby k tomuto přenosu došlo, musí opylovač zavadit o pohyblivou kapsičku na blizně, ze které se následně uvolní lepivá tekutina. Tato tekutina slouží k přilepení brylek na tělo opylovače. Prodloužený pysk na spodní straně květu vytváří kornoutovitou až dlouze trubkovitou ostruhu, která vábí opylovače na nektar. Zde přichází klam, neboť ne vždycky se nektar v pysku nachází a tím květ opylovače šálí (Dykyjová 2003).

Pro orchideje je charakteristická tvarová i barevná různotvárnost okvětí. Nejenže nenajdeme květy, které by byly identické, ale kombinací tvaru a barvy mohou připomínat lidskou tvář, opice, ještěrky, ropuchy a další různé tvary. O různorodost květů se pravděpodobně postaral evoluční vývoj. Postupem času se orchideje snažily co nejvíce přizpůsobit hmyzím opylovačům. Květ tořiče hmyzonosného (*Ophrys insectifera*) připomíná tvarem, ochlupením, barvou a vůní samičky samotářských včel a vos a tím lákají samce na květ (Dykyjová 2003; Ježek 2003). Květ láká samce pro kopulaci pomocí silnějších lákadel než samičky, proto samci střídají květy tořice se samičkami svého druhu (Ježek 2003). Dalším přizpůsobením je například již zmíněný zvětšený dolní pysk sloužící jako přistávací dráha a navedení přímo ke sloupku, který nese tyčinku a bliznu. Hmyz přenáší pyl slepený v balíčcích a ty přenáší na bliznu jiného květu (Dykyjová 2003). Pylové balíčky jsou spojené lepivou hmotou, která se nazývá pollenkitt. S její pomocí hmyz přenese více pylu na svém těle a znesnadní mu si pyl z těla odstranit (Amador et al. 2017). Hlístník nebo okrotice

mají primitivnější stavbu květů. Pyl není slepen v brylkách (pollinarium), ale přilepí se přímo lepivým terčíkem, nebo jsou rozmazané jako pylová kaše (Dykyjová 2003). Například vstavač vojenský (*Orchis militaris*) tvoří hrudky spojené uvnitř pylových tetrad zvaných masulami (Procházka & Velíšek 1983). Darwin sledoval a zaznamenával dobu, která je nutná pro přelet hmyzu do jiného květu, než lepidlo pollinaria ztuhne. Vstavače mají terčíky s lepidlem umístěné v kapsičce, do které hmyz narazí čelem a terčíky se na něj přilepí. Lepidlo během 30 sekund začne tuhnout, tím se brylka dostane do polohy 90°. Mezitím opylovač přelétne do jiného květu a takto připravená brylka se přilepí na bliznu. Lepivé terčíky prstnatce zeleného (*Dactylorhiza viridis*) jsou vystavené vzduchu. Pro tuto skutečnost uzpůsobil dobu tuhnutí lepidla až na 20–30 minut, u vemeníku zelenavého (*Platanthera chlorantha*) je tato doba až 24 hodin. Většina medonosných orchidejí na nektar láká i motýly (Dykyjová 2003).

Pylová zrna již zmíněných okrotic nejsou spojena v pevnou brylku, ale jsou rozsypavá a přichytávají se na každý předmět. U okrotic pravděpodobně dochází k samoopylení, neboť své květy otvírá pouze částečně a tím chrání pylová zrna před větrem, navíc jejich květy neobsahují nektar. Mezi hlavní druhy opylovačů okrotic patří včely. Přizpůsobení opylovačům má nejzajímavější rod tořič (*Ophrys*). Květ taktéž neobsahuje nektar, pouze dva tmavé výběžky po stranách pysku připomínají kapičku nektaru (Dykyjová 2003). Morfologií květu připomíná samičku konkrétního opylovače. Šálí tím především samce samotářských včel a vos. Samečka květy lákají mnohem více než samotná samička. Pravděpodobně za to může lákavější vůně květu než kterou produkuje samička. Od tohoto přizpůsobení rostlin lze odvodit úzkou preferenci určitých druhů opylovačů, která vede k izolaci rostlinného druhu. Vzniká tím potenciální ohrožení existence určitých druhů, vázaných na nestálé populace opylovačů (Dykyjová 2003; Průša 2019). Evoluční vývoj mezi vstavačovými a jejich opylovači je jednostranný. Vstavačovitě se podřídily opylovačům, u kterých evolučně neproběhla žádná změna (Williams 1982).

Pokud k takovému vyhynutí opylovače dojde, jsou orchideje nucené k samoopylení. Může se jednat o náhodné samoopylení až o jev kleistogamie, kdy se květ neotevře, ale přesto se u něj vyvinou plodné tobolky (Dykyjová 2003). Některé druhy vyvinuly specifický způsob samoopylení. Například *Paphiopedilum parishii* kombinuje pohyb brylek k blizně a přeměnu pylu na kapalinu pro snadnější opylení

(Chen et al. 2012). Většina druhů orchidejí si postupem času vytvořily bariéry, které zabraňují samoopylení. Může se jednat o inkompatibilitu vlastního pylu nebo mechanické překážky (oddělení prašníku od blizny). Nejčastější variantou samoopylení dochází na povrchu lepkavé blizny, na kterém pyl vyklíčí. Toto přizpůsobení najdeme například u prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*), rudohlávkou jehlancovitého (*Anacamptis pyramidalis*), tořiče hmyzonosného (*Ophrys insectifera*) a dalších druhů (Dykyjová 2003).

Středoevropské druhy orchidejí nejčastěji opyluje hmyz z řádu blanokřídlí (*Hymenoptera*), dvoukřídlí (*Diptera*), motýli (*Lepidoptera*) a brouci (*Coleoptera*). Mezi nejdůležitější opylovače patří blanokřídlý hmyz (vosy, včely, čmeláci), kteří opylují největší procento druhů vstavačovitých. Motýli se adaptovali na květy navštěvované ve dne a v noci. Podle toho se rozdělují na denní a noční motýly, ke kterým patří například můrovití (*Noctuidae*) či lišajovití (*Sphingidae*). Přejít mezi těmito skupinami tvoří dlouhozobka (*Macroglossum*). Brouci opylují vstavačovitě příležitostně a nepatří k pravidelným opylovačům (Dykyjová 2003; Průša 2019). Orchideje tvoří také tzv. klamavé květy. Jedná se o květy, které napodobují květní signály, ale neobsahují nektar. Díky tomu jejich vytvoření není pro orchideje tak energeticky náročné (Jersáková et al. 2006). Klamné květy kvetou dříve než květy, které produkují nektar (Kindlmann & Jersáková 2006). Dále mohou klamat sexuálně, imitovat hnízdiště či úkryt. Šálivé květy podporují křížení rostlin, neboť hmyz se na květu, kde nenalezne žádnou odměnu zdrží kratší dobu než na květu s nektarem (Jersáková et al. 2006). Díky tomu se stihne polinium dostatečně ohnout pro opylení jiného květu a klesá pravděpodobnost opylením vlastním pylem (Vale et al. 2011). Přibližně 1/3 zástupců vstavačovitých využívá těchto šálivých květů (Jersáková et al. 2006).

Opylovaný květ začne krátce po opylení uvadat. Sloupek a blizna jsou recepčními orgány, které regulují inhibiční sloučeniny a tím zastavuje sekreci vonných silic a nektaru. A zabrání tím vstupu dalších opylovačů. Poté začnou prorůstat pylové láčky, které oplodní vajíčka v semeníku. Neopylovaný květ zůstává stále v plné kráse a láká hmyz ke svému opylení (Dykyjová 2003).

Jakmile jsou vajíčka oplozena, dochází v semeníku k vývoji semen. Orchideje produkují velké množství semen, které překračuje tisíce kusů. Okrotice bílá

(*Cephalanthera damasonium*) jich v jedné tobolce má až 6 020 semen, prstnatec plamatý (*Dactylorhiza maculata*) 6 200 semen. Tropické orchideje tvoří mnohem více semen než terestrické druhy. V jedné tobolce mohou mít statisíce až miliony semen (Dykyjová 2003; Průša 2019). Jejich kvalita je ovlivněna mnoha faktory. Velmi důležité je odkud pochází pyl. Pokud došlo k samoopylení, může dojít ke snížení kvality osiva. Další vliv může mít množství pylu na blizně nebo stáří květu při opylení. Velké množství produkovaných semen umožňuje hustě pokrýt okolí mateřské rostliny a tím nalézt vhodné místo, kde se vyskytují vhodné podmínky pro klíčení semen (např. hyfy mykotrofní houby) (Rasmussen 1995). I když orchideje tvoří mnoho semen, nelze je najít na každém stanovišti. Může za to mnoho faktorů omezující reprodukci orchidejí a dospělosti dosáhne pouze nepatrné množství, které je nutné k přežití druhu (Průša 2019). Výzkumy zjistily, že při vzdálenosti semen víc než 1,5 m od mateřské rostliny mají malou pravděpodobnost vyklíčit (Jacquemyn et al. 2007; Hamrick & Trapnell 2011). Semena orchidejí jsou velmi malá a lehká. Největší semena tvoří střevíčník pantoflíček (*Cypripedium calceolus*) s délkou 1–1,3 mm. Naopak nejmenší semena má švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis*), jejichž délka dosahuje pouze 0,32–0,38 mm. I jejich hmotnost je velmi nízká. Odhaduje se, že jedno semeno smrkovníku plazivého (*Goodyera repens*) dosahuje pouze 0,002 mg a semeno pětiprstky žežulníku (*Gymnadenia conopsea*) má 0,008 mg (Průša 2019).

3.3. Vývoj semene

Jak již bylo zmíněno, semena orchidejí jsou velmi malá. Následkem toho není vývoj semen dostatečně prozkoumán již od uvolnění semen z tobolek. Pozorování klíčení je znesnadněno i tím, že první fáze vývoje probíhá pod povrchem půdy a až po nějaké době od vyklíčení semen lze spatřit nové rostliny. K poznání a popisu fyziologie klíčení semen pomohl přenos tobolek do laboratorních podmínek pro pěstování in vitro kultur (Rasmussen 1995).

Semena orchidejí jsou z tobolek uvolněna v době, kdy panuje suché počasí a jsou ideální podmínky pro jejich rozptýlení pomocí větru. Malá velikost a nízká váha jim umožňuje cestovat desítky až stovky kilometrů daleko, např. vstavač vojenský (*Orchis militaris*) až 100 km, vstavač opička (*Orchis simia*) doletí až 250 km. Takováto vzdálenost rozptýlení semen není u jiných kvetoucích rostlin známá (Rasmussen 1995). Z jednoho květu může vzniknout od tisíců až po více než milion

semen a orchideje tak tvoří rekord v množství vytvořených semen mezi rostlinami (Ponert 2016).

Pro možnost klíčení musí semeno dolétnout na stanoviště, kde se nacházejí vhodné mikroklimatické podmínky. Orchideje žijí heterotrofním způsobem života. Nejsou tedy závislé na světle a nemusí vytvářet nadzemní části, jak je tomu u autotrofních organismů. Většina terestrických druhů orchidejí potřebuje pro úspěšné klíčení tmou a pomalou hydrataci semen. Obsah vody v semeni je ovlivněn vodoodpudivostí jeho obalu a tím ho ochraňuje před útoky mikroorganismů (Rasmussen 1995). Proniknutím vody k embryu semene započne klíčení tím, že buňky embrya začne zvětšovat svůj objem a dělit se (Yoder et al. 2000). U některých druhů orchidejí by částečný rozklad semenného obalu mohl podporovat klíčení semen, ale jsou druhy, které by mohly o svou populaci semen i přijít (Rasmussen 1995).

Většina druhů orchidejí klíčí na jaře. Jelikož během podzimu a zimy dochází ke stimulaci houbové aktivity přísunem odumřelé biomasy, vzniknou tak pro klíčení semen vhodné podmínky. Ukazuje to také na přítomnost dozrávajících mechanismů v semeni, které mu zabraňují v klíčení již po opuštění tobolky v létě nebo na podzim. Dormanci semen naruší potřebný teplotní cyklus, atmosférické vlivy, tma, dlouhé nasávání vody, chemický rozpad vnějšího obalu embrya apod. Semena obsahují málo rezervních živin, které by jim umožnily klíčit a vyprodukovat autotrofní rostliny. Zralá semena obsahují malé množství rozpustných cukrů, sacharózy a manózy. Charakteristickým znakem pro většinu orchidejí je absence škrobu. Aby úspěšně mohla vyklíčit, pomáhá jim k tomu symbióza s mykorrhizními houbami (Rasmussen 1995). Lze proto říct, že se v raných stádiích vývoje rostlin jedná o parazitismus rostliny na houbě (Wodrich 1997). Závislost orchidejí na těchto houbách je mezi druhy odlišná. To by mohlo znamenat, že houby potřebují ke klíčení z důvodu neschopnosti rychlého metabolizování zásoby živin, a ne nedostatkem jejich zásob. Po navázání mykorrhizní symbiózy může semeno pokračovat v růstu, embryo pokračuje v nasávání vody. Zároveň se neprodlužuje, ale zvětšuje se svůj obvod a obal semene začne postupně podélně praskat. Embryo se nejprve vyvine v bezlistý semenáč tzv. protokorm (Rasmussen 1995). Protokorm nemá energii na pokračování vývoje, ale pouze na protržení obalu (Yoder et al. 2000). Po nějaké době se teprve vyvine v semenáček s odlišujícími šupinovými listy (Rasmussen 1995).

Protokorm nemá kořen, neboť jeho suspenzorový neboli bazální konec tvoří mykotrofní tkáň a pomocí endoreduplikace zvětšuje obsah DNA. Protilehlý chalazální, tzv. apikální konec má funkční meristém, pomocí kterého se protokorm rozšiřuje a prodlužuje (Rasmussen 1995; Ponert 2016). Na tomto konci se také vytvoří zhuštěný nebo protáhlý mykorhizom (Rasmussen 1995). Jedná se o plně mykoheterotrofní podzemní oddenky. Tímto termínem jsou často nesprávně označovány i protokormy (Ponert 2016). Může to být zapříčiněno nezřetelnou hranicí mezi protokormem a mykorhizomem. Protokormem lze nazvat stádium od vyklíčení do vytvoření špičky s prvotními listy bez kořenů. Mykorhizomem se stává po prodlužování apikálního meristému a začátku vývoje kořenů (Rasmussen 1995). Vývoj embrya se zastavuje v časně, globulární fázi. Semena dozrávají bez meristému, ten se tvoří až delší dobu po vyklíčení pouze na apikálním konci a na bazálním konci se tvoří již zmíněná mykorhiza. Díky tomu orchideje nikdy nevytvoří pravý kořen, pouze kořeny adventivní. Protokorm bez prýtu a kořenů dosahuje okolo 2–6 mm, někdy i přes 10 mm. U terestrických druhů orchidejí jsou bez chlorofylu, bělavé, často s dlouhým vlášením tzv. rhizoidy a jsou závislé na mykorhizní výživě (Ponert 2016).

Po založení prvního meristému na protokormu je vývoj podobný ostatním rostlinám. Z tohoto meristému začne vyrůstat prýt, který na svém vrcholu vytvoří listy. Na bazální části se začnou vyvíjet adventivní kořeny. Terestrické orchideje tvoří nejprve podzemní stonek, ze kterého vyrůstají kořeny a až poté listy. Ve formě oddenku s kořeny mohou některé orchideje žít i několik let pod zemí (Ponert 2016).

3.4. Mykorhiza

Mykorhizní symbióza je v přírodě velmi rozšířený vztah mezi kořeny rostlin a houbami. Tyto organismy si navzájem vypomáhají v transportu organických a anorganických látek, které jsou rozpuštěné ve vodě (Gryndler et al. 2004; Pešková 2008). Někdy se tento vztah dá považovat za epiparazitismus nebo pouze o částečný epiparazitismus (Bailarote et al. 2012). Specifické útvary neboli mykorhizy vznikají spojením kořenů rostlin a houbových organismů (Pešková 2008). Pomocí houby rostlina snadněji přijímá minerální látky, především dusík a fosfor. Naopak rostlina houbě poskytuje uhlíkaté látky, které vytvořila pomocí fotosyntézy. Každý vztah mezi rostlinou a houbou nemusí být vždy prospěšný. Například mykoheterotrofní organismy získávají od houby i uhlíkaté látky, neboť nejsou schopné si je fotosyntézou vytvořit (Gryndler et al. 2004). Pokud rostlina vytvoří s houbou mykorhizu, mohou

být díky ní rezistentní vůči patogenům nebo těžkým kovům (Smith & Read 2008). Mykorhizní symbióza je známa u více než 95 % cévnatých rostlin (Pešková 2008). Tvoří ji houby z několik tříd, např. *Ascomycota*, *Basidiomycota* a *Glomeromycota* (Smith & Read 2008). Houby kolonizují pouze primární kůru, kořenovou kůru a rhizodermis (Gryndler et al. 2004).

Mykorhiza se rozděluje podle typu spojení kořenů rostlin nebo orgánů strukturou kořenů podobné a houbových vláken neboli hyf na ektomykorhizní a endomykorhizní symbiózu. Endomykorhizní symbióza se dělí na arbuskulární, erikoidní a orchideodní. Ektendomykorhizní symbióza je přechodové stádium mezi endomykorhizní a ektomykorhizní symbiózou (Gryndler et al. 2004; Pešková 2008). Mezi další přechodová stádia může být zařazena arbutoidní nebo monotropoidní mykorhiza (Gryndler et al. 2004).

Ektomykorhizní symbióza je typická pro kořeny dřevin v oblastech mírného pásma, kdy vytvářejí mykorhizu s konkrétními druhy hub. Vyskytují se na kořenech v nejsvrchnějších vrstvách půdy, ve kterých je vysoký obsah humusu. Ektomykorhiza vytvoří na povrchu kořenů hyfový plášť (Brundrett 2002; Pešková 2008) a kořen zduří (Gryndler et al. 2004). Dochází ke zpomalení růstu kořínků a k jejich charakteristickému větvení. Houbová vlákna prorůstají do mezibuněčných prostorů kořene, kde vzniká tzv. Hartigova síť, která může být jednovrstevná i vícevrstevná. Tato vlastnost umožnila vzniku rozsáhlé kontaktní plochy mezi rostlinou, houbou a prostředím. Díky tomu může docházet k velké výměně látek mezi organismy. Tvar větvení kořínků je ovlivněn hostitelskou dřevinou, ale druh houbového symbiota zde nemá vliv. Symbióza byla popsána u 2000 rostlinných druhů (Pešková 2008). Ektomykorhizu nejčastěji tvoří houby z oddělení *Basidiomycota* a *Ascomycota* (Brundrett 2002; Pešková 2008)

Endomykorhizní symbióza není pouhým okem na kořenech rostlin patrná, protože houbová vlákna pronikají nejen do mezibuněčných prostor, ale i do jednotlivých buněk vnitřní kůry. Při této symbióze se nevytváří hyfový plášť ani Hartigova síť a kořeny nejsou morfologicky pozmeněné. Nejčastější je arbuskulární mykorhiza, která vytváří arbuskuly (rozvětvené útvary), které vstřebávají živiny, později vytváří v buňkách vezikuly (kulovité útvary), které mají zásobní funkci (Pešková 2008). Arbuskulární mykorhizu tvoří cca 80 % rostlinných

druhů, především byliny s houbami z oddělení Glomeromycota (Buscot 2015). Houby arbuskulární mykorhizy jsou zcela závislé na hostitelských rostlinách v příjmu uhlíkatých látek, díky tomu se řadí mezi obligátní biotrofy. Mycelium mnohonásobně zvyšuje plochu pro možnost čerpání živin pro rostlinu (Gryndler et al. 2004). Po odumření a rozkladu arbuskulárních hub se do půdy uvolňuje glomalin, který má příznivý vliv na ukládání uhlíků v půdě, tvoří a stabilizuje půdní agregáty (slepjuje půdní částice k sobě), zvyšuje zadržování vody v půdě, zlepšuje pórovitost půdy, zvyšuje odolnost vůči erozi půdy a podporuje rozvoj kořenových systémů rostlin. Dále omezuje dostupnost a toxicitu škodlivých látek v půdě a nabízí se k zabránění degradaci půdy, především změnou obhospodařování půdy (Bečvářová 2020).

Dalším typem endomykorhizy je erikoidní mykorhiza, která je tvořena s rostlinami z čeledi *Ericaceae*. Typické jsou pro ni tenké vlasové kořínky. Prospěšná je především na stanovištích jako jsou rašeliniště a vřesoviště, které mají nízký obsah minerálních látek v půdě, obsahují vysoký poměr C:N, a nebo mají nízké pH. Rostliny tvořící erikoidní mykorhizu mají důležitou roli v primární sukcesi, žijí v extrémních teplotách, nebo patří mezi invazní druhy rostlin a ohrožují původní ekosystémy (Gryndler et al. 2004; Smith & Read 2008). Tuto symbiózu vytvářejí nejčastěji houby z rodu *Ascomycota* (Smith & Read 2008).

Orchideoidní mykorhizní symbióza je považována za nejmladší typ endomykorhizní symbiózy (Smith & Read 2008). Charakteristická je pro čeleď vstavačovitě (*Orchidaceae*) (Gryndler et al. 2004). Orchideoidní mykorhiza je celosvětově rozšířená, ale dodnes není známá jiná skupina rostlin, která je schopna tento typ mykorhizy vytvořit. Všechny druhy orchidejí jsou mykoheterotrofní minimálně v raných vývojových stádiích, během kterých nejsou schopny provozovat fotosyntézu (Smith & Read 2008). Míra závislosti dospělých rostlin je odlišná i mezi příbuznými druhy (Gryndler et al. 2004). Houby, tvořící orchideoidní mykorhizu, se řadí nejčastěji mezi *Basidiomycota* z čeledi *Ceratobasidiaceae*, *Sebacinaceae* a *Tullasnellaceae* (Smith & Read 2008).

Orchideoidní mykorhiza se podle uspořádání struktur rozděluje na dva druhy tolypofágní a ptyofágní typ. Tolypofágní typ je charakteristický tvorbou husté propletené struktury tzv. smotků hyf neboli pelotonů. Tento typ je nejběžnější a nejrozšířenější (Gryndler et al. 2004; Průša 2019). Hyfy proroste do primární kůry

kořene, rozvětví se a vytvoří hustou, spletenou strukturu. Pokud dojde k prorůstáním hyf do sousedních buněk nejsou v kontaktu s cytoplazmou buňky, neboť je obalená plazmatickou membránou hostitelské buňky. Pokud peloton zkolabuje, vytvoří se z něj shluk amorfní houbové tkáně (Průša 2019). Ptyofágní typ orchideoidní mykorhizy je méně rozšířený a je typický pro nezelené druhy tropických orchidejí (Gryndler et al. 2004; Průša 2019). Pronikající hyfy do primární kůry kořene nevytvoří pelotony, ale vrchol hyfy praská a její obsah vytéká do ptyozómů (měchýřků) nacházejících se v cytoplazmě buněk (Průša 2019). Kořenový systém orchidejí je velmi málo vyvinutý, proto je příjem vody a živin z půdy značně omezen (Smith & Read 2008). Aby rostliny lépe přijímaly tyto látky, využívají pro to houbové mycelium, které se nachází v těsné blízkosti kořenů. Fosfátové ionty rostlina z půdy získává obtížně a pro jejich získání rostlina využívá houbového mycelia. V momentě, kdy je rostlina schopná asimilace, naopak dodává uhlíkaté látky houbovému myceliu (Swarts & Dixon 2009; Průša 2019). Jednotlivé druhy orchidejí mohou tvořit symbiózu s více druhy hub, ale musí být pro konkrétní druh specifické (Dykyjová 2003). Některé druhy orchidejí mají v přírodních podmínkách vyšší specifitu houbových symbiontů, než je tomu v laboratorním prostředí (Rasmussen 2002). Například smrkovník plazivý (*Goodyera repens*) v laboratorních podmínkách vytvořil funkční mykorhizu s 8 z 32 použitých izolátů rhizoctonií, v přírodních podmínkách pouze s jedním (Hadley 1970). Hyfy napadají protokormy, kořeny a oddenky, ovšem nadzemní orgány ne (Rasmussen 1995).

Zkoumání orchideoidní mykorhizy je velmi obtížné, protože i nepatrná změna podmínek stačí k tomu, aby houba začala na rostlině parazitovat. Mnoho vědců se orchideoidní mykorhizou zabývá již od 19. století. Ale až díky pokusům klíčení semen *in vitro*, kde rostliny byly živeny pomocí hyf, se vědcům povedlo zjistit, že po porušení tohoto spojení rostliny zahynuly. Uvědomili si tím, že houbové mycelium přijímá živiny z okolního prostředí a pomocí hyf je dodá klíčícímu semenu, které se jinak nedokáže vyvíjet, neboť má v semeni malou zásobu živin (Rasmussen 1995).

Orchideje pomocí chemických látek jako je např. orchinol, loroglossol nebo hircinol regulují růst houbových hyf. Tyto látky jsou obsažené nejen v kořenech, ale i v nadzemních orgánech rostlin a vytvoří se při poranění nebo napadený jinými patogeny a parazity. Mezi fyzické zábrany patří tloušťnutí buněčných stěn a ukládání fenolových sloučenin v rhizodermis kořene (Rasmussen 1995). Některé druhy hub

vytvářejí zároveň s kořeny okolních stromů ektomykorhizu a vytváří mezi stromy a orchidejí spojnicí. Strom provozuje fotosyntézu a houba pomocí svých hyf přenáší vytvořené živiny do orchidejí. Z kořenů stromů houba převádí cukry na mannitol nebo trehalózu, které není strom schopen metabolizovat, ale orchideje ano. Ty je poté přemění na vlastní sacharózu a dále ji čerpají v metabolických procesech (Průša 2019).

Podle závislosti na výživě lze orchideje rozdělit do tří skupin. Do první skupiny patří nezelené orchideje, které nemají vyvinuté listy, jsou zakrslé nebo částečně či úplně postrádají chlorofyl. Jejich listy bývají přeměněné pouze v bezbarvé šupiny. Z těchto důvodů jsou rostliny zcela závislé na příjmu látek houbovým myceliem (Dykyjová 2003; Průša 2019). Tyto druhy jsou po celý život obligátně mykotrofní, což znamená, že nemohou produkovat fotosyntézu. Do této skupiny se řadí 10 % druhů vstavačovitých (Cameron et al. 2007), mezi které patří hlístník hnízdák (*Neottia nidus-avis*), sklenobýl bezlistý (*Epipogium aphyllum*) a korállice trojkланá (*Corallorhiza trifida*). Druhou skupinu tvoří zelené druhy orchidejí, které osidlují lesní stanoviště a jsou závislé na fykobiontovi po celou dobu ontogeneze. Přesto, že rostliny jsou schopné provozovat fotosyntézu, díky stinnému lesnímu prostředí nevytvoří dostatečné množství živin, které by uspokojilo jejich potřeby metabolismu. Z tohoto důvodu rostliny potřebují část uhlíkatých látek doplnit prostřednictvím fykobionta (Dykyjová 2003; Průša 2019). Lze tedy hovořit, že rostliny jsou částečně autotrofní a částečně mykotrofní (Procházka 1980). Typické druhy pro tuto skupinu jsou např. kruštík širolistý (*Epipactis helleborine*) nebo okrotice červená (*Cephalanthera rubra*). Do třetí skupiny jsou zařazené orchideje rostoucí na otevřených stanovištích. Na mykorhize jsou závislé pouze v ranných stádiích ontogeneze. Rostlina, která dospěje do stádia zelených listů, přestává být závislá na mykorhizní houbě, je schopná produkovat vlastní uhlíkaté látky a začne se vyživovat autotrofním způsobem. Patří sem vstavač mužský (*Orchis mascula*), střevíčník pantoflíček (*Cypripedium calceolus*) nebo prstnatec májový (*Dactylorhiza majalis*). Skupiny nejsou striktně oddělené a může mezi nimi docházet k přechodu (Dykyjová 2003; Průša 2019).

3.5. Stanoviště

Vstavačovité jsou rozšířené po celém světě, nacházejí se od rovníku až po polární kruhy. Přibližně 85 % druhů roste v tropickém a subtropickém pásmu všech světadílů (Dykyjová 2003). Během fylogenetického vývoje se vstavačovité musely

přizpůsobovat nejen podmínkám různých zeměpisných šířek, ale i různorodým biotopům. V dnešní době na území střední Evropy není mnoho míst, kde by byly původní přirozené biotopy orchidejí. Většinu těchto stanovišť člověk ovlivnil intenzivním obhospodařováním a rozvojem infrastruktury. Orchideje se buď na tuto změnu prostředí adaptovaly, anebo došlo k jejich úhynu (Dykyjová 2003; Průša 2019).

Biotopy, které nebyly tolik člověkem narušené, jsou charakteristické hromadným výskytem více druhů vstavačovitých, které mají podobné ekologické nároky. Základní podmínka je, že na této lokalitě musí být hyfy nebo alespoň spory symbiotických hub (Jersáková & Kindlmann 2004; Pešková 2008). Sundermann stanovil několik typů stanovišť, která obecně odpovídají podmínkám stanovišť ve střední Evropě. Jednotlivá stanoviště rozlišil podle nadmořské výšky, vláhových poměrů, půdních reakcí a výskytem typických druhů orchidejí. Například biotop suchých travnatých luk v pahorkatinách na alkalických půdách osidlují teplomilné druhy orchidejí, především tořiče (*Ophrys*), vstavač mužský (*Orchis mascula*) nebo pětiprstka žežulník (*Gymnadenia conopsea*). Vlhké louky podhůří s bohatými srážkami, ale bez stagnující vody osidluje, např. prstnatec plamatý (*Dactylorhiza maculata*), vstavač kukačka (*Anacamptis morio*) nebo vstavač osmahlý (*Neotinea ustulata*). Rašelinný jehličnatý les s rašelínkem je charakteristický pro bradáček srdčitý (*Listera cordata*) a prstnatec Fuchsův (*Dactylorhiza fuchsii*) (Dykyjová 2003; Jersáková & Kindlmann 2004; Průša 2019). Jersáková & Kindlmann (2004) ve svém díle detailně popisují vhodné biotopy vstavačovitých a uvádějí konkrétní druhy vstavačovitých s jejich preferencí vhodných stanovišť.

Vstavačovitě lze nalézt kromě stručného výčtu stanovišť i podél lesních cest, v příkopech, vypuštěných vodních nádrží či na skládkách dřeva. Pokud se na stanovišti vyskytnou vhodné druhy mykorhizní houby, dokážou osídlit narušené prostředí v první sukcesní fázi. Tato populace není stabilní, neboť je zde velmi silný konkurenční tlak od silnějších bylin a později i dřevin, které se zde začnou vyvíjet. Vyšší stabilitu mají populace na původních stanovištích, ale k jejich rozrůstání nedochází. Tento fakt lze změnit vhodným managementem pro jednotlivý biotop a jeho druhy (Průša 2019).

4. *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. – švihlík krutiklas

4.1. Morfologie

Spiranthes spiralis (L.) Chevall. je zařazen do čeledi vstavačovitě *Orchidaceae*. Rod *Spiranthes* obsahuje přibližně 40 druhů. Nejvíce je zastoupen v Severní Americe, dále ve Střední Americe a v severní části Jižní Ameriky. V Evropě se rozprostírá na celém území kromě nejsevernějších oblastí. Centrum rozšíření švihlíku krutiklas je ve Středozeří (Brabec et al. 2004). Jedná se o vytrvalou, vzpřímenou, polykarpickou bylinu, která nemá kořeny, ale řepovité hlízy (Jacquemyn & Hutchings 2010; Procházka 2010). Hlízy jsou vejčité, oválné či vřetenovité, někdy jsou tupě špičaté, podlouhlé a jsou světle hnědé.



Obr. 1: Kvetoucí exemplář *Spiranthes spiralis* s vyrůstajícími listovými růžicemi (Brabec 2005).

Dosahují délky 1–3 cm, nejvíce 5 cm a šířky od 0,3 cm do 2 cm. Obvykle lze nalézt hlízy v počtu 2–4, výjimečně 5–6 kusů (Dykyjová 2003; Jacquemyn & Hutchings 2010). Vývoj hlíz probíhá během zimního období, Ipsier (2012) odhaduje, že se jedná o období prosince až února. V lednu jsou staré hlízy již rozložené (Ipsier 2012). *Spiranthes spiralis* se často rozmnožuje vegetativně. Z jedné hlízy se vyvine více nových hlíz a díky tomu vzniknou skupiny více rostlin (Procházka & Velíšek 1983). Průměrná doba přežití jednotlivých rostlin je 6,9 roku. Výjimečně se mohou rostliny dožít i více než 9 let (Jersáková & Kindlmann 2004). Průměrná doba přežívání jednotlivých rostlin na Pastvišti u Fínů je 4,7 roků. Celkem devět rostlin přežilo celou dobu sledování, tj. 13 let (1997–2010) (Brabec et al. 2011).

Švihlík krutiklas tvoří přizemní listové růžice, které jsou složeny ze 3–10 listů. Tyto listy jsou krátce řapíkaté modrozelené, velmi lesklé a mají vejčitou čepel s podélnou žilnatinou. Dosahují délky 1,8–5,5 cm a šířky 0,6–1,8 cm (Jacquemyn & Hutchings 2010; Procházka 2010). Růžice se objevují spolu s květní lodyhou nebo později v postranní bazální růžici, která může příští rok vykvést. Pravděpodobně

se adaptovali na suché období tím, že listové růžice jsou produktivní během zimního období a na jaře zasychají. Tím přečkají nepříznivé období léta v podzemních orgánech (Rasmussen 1995; Brabec et al. 2004; Jacquemyn & Hutchings 2010). Přezimující růžice zelených listů je mezi středoevropskými orchidejemi vzácný jev. Mimo švihlíku krutiklasu má tuto vlastnost například vstavač kukačka (*Anacamptis morio*), rudohlávek jehlancovitý (*Anacamptis pyramidalis*) nebo jazýček jadranský (*Himantoglossum adriaticum*) (Brabec et al. 2011). Vliv na velikost růžic mají srážky během listopadu, prosince, února a března. Sněhová pokrývka na ni vliv nemá (Ipser 2012). Velikost asimilační listové plochy na jaře ovlivňuje vitalitu rostliny v následujícím období. Rostliny, které měly na jaře větší listovou plochu, na podzim kvetly. Naopak rostliny s menší listovou plochou byly buď sterilní nebo uhynuly. Podobný vliv má i počet jednotlivých listů růžice (Brabec et al. 2011).

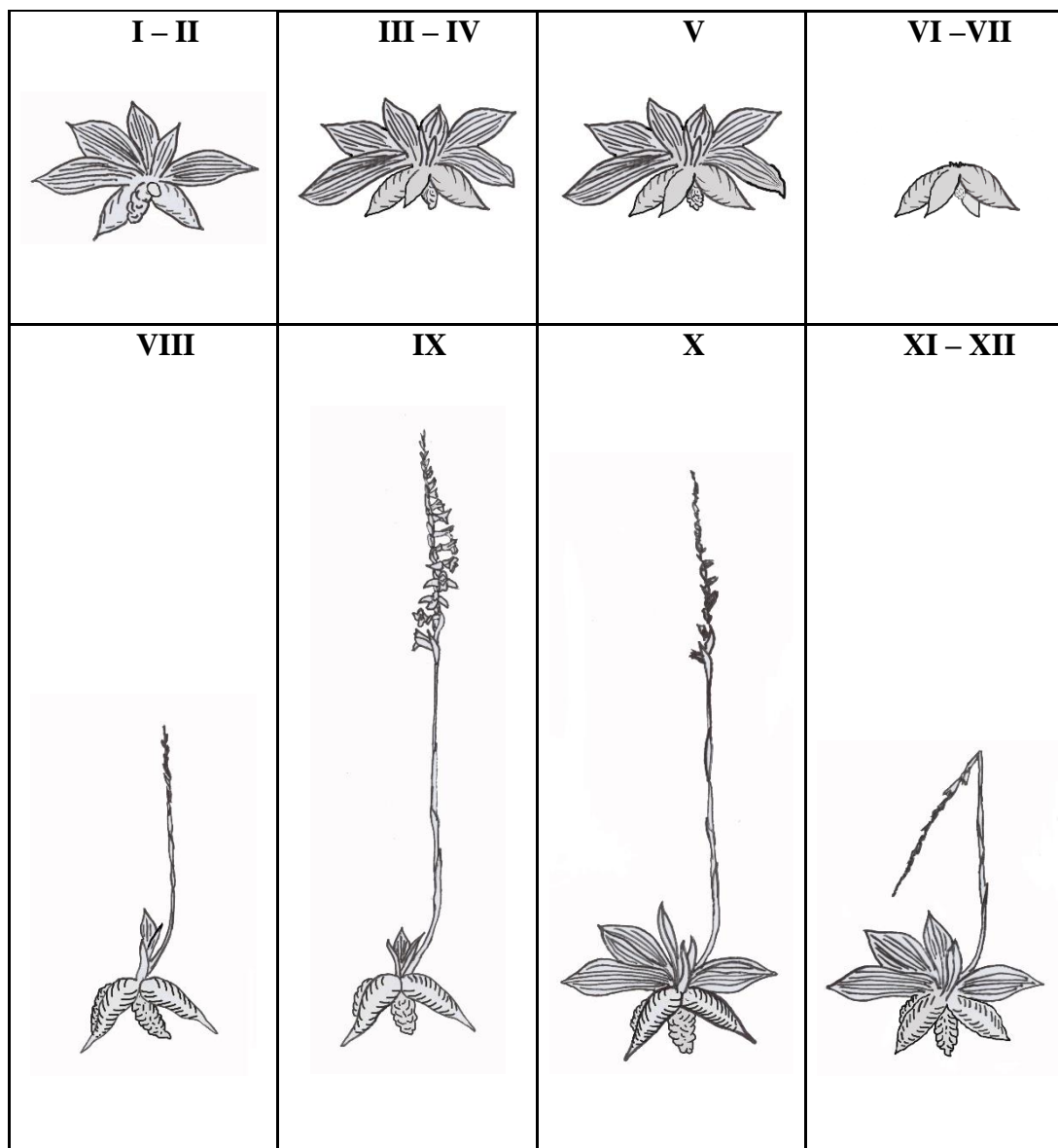
Květonosné lodyhy dosahují výšky 7–22 cm, populace rostoucí v Turecku dosahují výšky až 40 cm (Brabec et al. 2004; Procházka 2010; Brabec et al. 2011). Modrozelená lodyha je tenká a v horní části žláznatě pýřitá. U této orchideje v porovnání s ostatními druhy je neobvyklá doba kvetení. Lodyha se vyvíjí během pozdního léta a vykvétá v srpnu a kvete do října. Květonosné lodyhy vyrůstají mimo listové růžice z důvodu, že lodyha vyrůstá z hlízy, která má již zaschlou listovou růžici z jarního období. Růžice nacházející se v těsné blízkosti lodyhy, pochází z nové hlízy, která zakládá asimilační aparát na nadcházející produkční sezónu. Tato růžice může v příštím roce nést květonosnou lodyhu, opět po odumření asimilačního aparátu. Klas květenství je dlouhý 3–12, někdy až 20 cm, jednostranný, hustě chlupatý a podélně šroubovicovitě stočený. Jednotlivé květy rostou obvykle po 10–25 výjimečně mají až 30 kusů, jsou drobné a na lodyze uspořádané spirálovitě v jedné řadě ve směru nebo protisměru hodinových ručiček kolem osy (Procházka & Velíšek 1983; Jacquemyn & Hutchings 2010; Procházka 2010).

Květy jsou bílé nebo nazelenale bílé s nažloutle zeleným středem. Korunní lístky dosahují délky maximálně 3–7 mm a šířky 1,5–2 mm. Květ, který je plně vyvinut, má maximálně 10 cm, špičky mají zahnuté ven a na vnější straně chlupaté (Jacquemyn & Hutchings 2010; Procházka 2010). Jednotlivé květy v květenství se otevírají od spodu ve skupinách po 3–5 (Willems 1989; Brabec et al. 2004). Pysk je dlouhý 5 až 6 mm a široký 3,5–4 mm, obvejčitý, na okraji zvlňný, bez ostruhy. Spojení horního vnějšího a vnitřního segmentu okvětí, tvoří pysk trubkovitou trubku, která obsahuje

žlázy vylučující nektar (Jacquemyn & Hutchings 2010). Žlázy nektar vylučují ještě předtím, než se otevřou poupata (Dykyjová 2003).

Hlavní opylovači švihlíku krutiklas jsou především čmeláci nebo včely (Dykyjová 2003). Dle pozorování autorů Willems & Lahtinen (1997) navštěvují nizozemské populace *Spiranthes spiralis* původní druhy čmeláků *Bombus lapidarius* a *Bombus pascuorum* (Willems & Lahtinen 1997). Chování opylovačů pozoroval již v roce 1877 přírodovědec Charles Darwin. Ten zjistil, že opylovači postupují od spodního květu nahoru, přitom se jim lepí brylky na sosák. Díky tomuto postupu přemístí brylky z nejmladších květů na další rostlinu, jinak by je ztratili hned v prvním květu, který by měl dozrálou lepidivou bliznu (Dykyjová 2003). U květů se lze setkat i se spontánní autogamií, kdy pyl samovolně vypadává na bliznu, případně i s apomixií (Dykyjová 2003; Brabec et al. 2004), kdy vývoj embrya probíhá i bez splynutí pohlavních buněk (Brabec et al. 2004).

Plodem je tobolka dlouhá 5,5–9 mm a široká 2–5 mm, vejčitá, nejprve zelená, později hnědná. Obsahuje velké množství malých semen, která patří k nejmenším semenům u středoevropských orchidejí se svou délkou 0,32–0,38 mm a šířkou 0,1–0,15 mm. Jedna tobolka obsahuje i přes 1 000 semen (Brabec et al. 2004; Jacquemyn & Hutchings 2010). Semena dozrávají od října do listopadu, poté jsou rozšiřovány pomocí větru (Machon et al. 2003; Jacquemyn & Hutchings 2010). I přesto, že jsou semena rozšiřována větrem, veškerá semena dopadnou do bezprostřední blízkosti matečné rostliny (Machon et al. 2003). Jedinec, který vznikne generativním množením, vytváří pod zemí mykorhizom, který pomalu vyvíjí po dobu 8 let. Mykorhizom odumírá, když se na konci osmého roku objeví první kořenová hlíza. Právě listy z kořenové hlízy se začnou vytvářet až 11. rok od začátku klíčení. Rostlina se skládá z dvou až pěti listů. Květonosnou lodyhu vytvoří až ve 13. či 14. roce od vyklíčení semene. Rostliny, které jsou kultivované v asymbiotické kultuře mohou vytvořit listy do 6 měsíců od výsevu semen a do 5 let mohou kvést (Wells & Kretz 1986). Semena obsahují $2n = 30$ chromozomů (Procházka 2010).



Obr. 2: Nákres fenologických fází *Spiranthes spiralis* během roku (Brabec et al. 2004).

4.2. Stanoviště

Spiranthes spiralis lze nalézt nejčastěji na krátkostébelných loukách a chudých pastvinách. Může se vyskytnout i na poněkud vlhčích až rašelinných a slatinných loukách, v xerothermních a semixerothermních trávnicích, na suchých pastvinách, písčinách a vřesovištích. Vyhovuje mu pH 8–9, ale osidluje acidofilní i bazické půdy a nesnáší tlak okolní konkurence. Jeho areál rozšíření se pohybuje od nížin až do hor (Rasmussen 1995; Jacquemyn & Hutchings 2010; Procházka 2010). Osidluje nenarušené pastviny a srázy, vrcholky skal, okraje silnic, hráze toků a staré zahradní trávničky. Také dokážou osídlit holou půdu v nefunkčních lomech, uhelných dolech, u železničních tratí, ale také kolonizuje opuštěnou ornou půdu a okraje lesů (Jacquemyn & Hutchings 2010). Nejčastější biotop výskytu jsou mezofilní ovsíkové

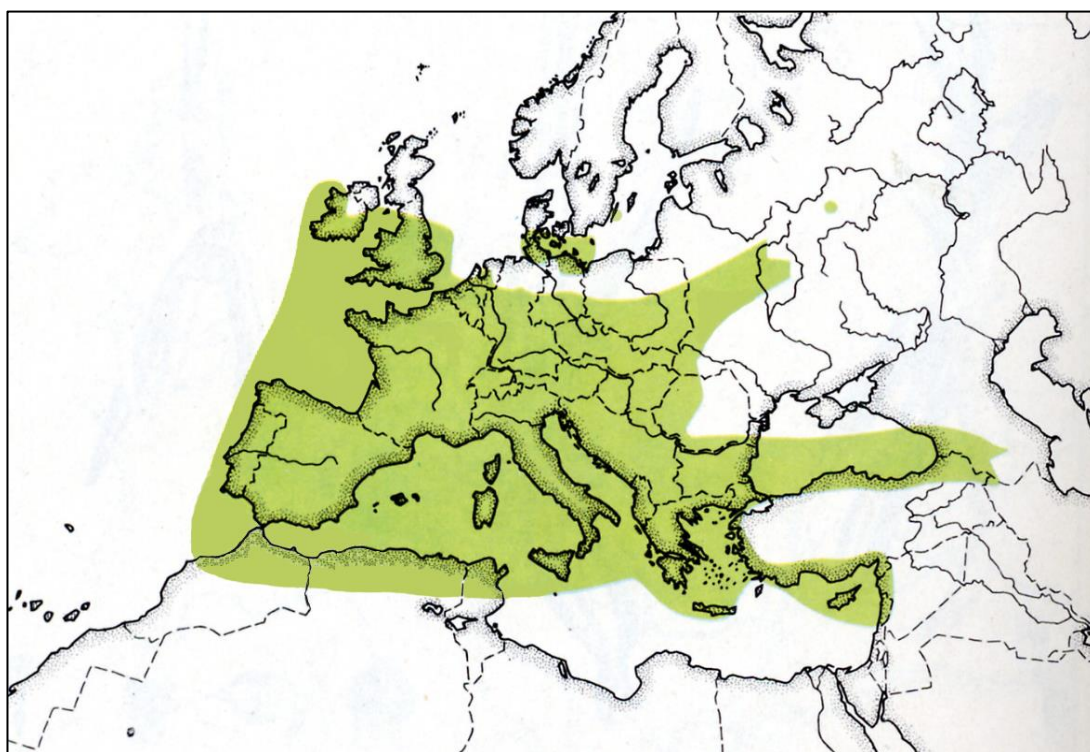
louky (T1.1) svazu *Arrhenatherion* (asociace *Trifolio-Festucetum rubrae*) a biotop podhorských a horských smilkových trávníků (T2.3) svazu *Violion caninae* (asociace *Hyperico-Polygaletum*). Biotop zaniklých lokalit v Beskydech a Bílých Karpatech byl pravděpodobně pohánkových pastvin svazu *Cynosurion* (Jersáková & Kindlmann 2004; Jacquemyn & Hutchings 2010). Roste od mělkých křídových půd přes vápenité, písčité až po štěrkové půdy, výjimečně i na jílovitých substrátech. Vyhovují mu půdy, které jsou chudé na dusík a fosfor, preferuje suchá místa a neroste v zasolených oblastech (Jacquemyn & Hutchings 2010).

V národní přírodní památce Pastviště u Finů, v nizozemské rezervaci Berghofweide v Jižním Limbursku a na pár lokalitách na Slovensku je dlouhodobě sledován vliv managementu na populaci *Spiranthes spiralis*. Těžištěm výskytu tohoto druhu jsou ovčí pastviny. Z výsledku pozorování bylo zjištěno, že pastva ovcí je pro zachování druhu velmi zásadní. Ovce spásají okolní vegetaci, která zastíňuje jednotlivé rostliny a pomáhá jim k dalšímu rozvoji. Umožňuje to různým zůstat přitisknuté k zemi a tím odolávat sešlapu, okusu či seči. Nezastíněné růžice jsou větší a sytější. Oproti tomu zastíněné rostliny mají úzké, vytažené a světle zelené listy. Pohyb ovcí redukuje hustotu okolní vegetace a vytváří v ní drobné mezery, které umožňují lepší uchycování semen. I z tohoto důvodu by náhrada pastvy ovcí kosením nemusela být dostatečná. V době květu a při vývoji semen by pastva neměla být prováděna. Ideální je pastvu provádět dvakrát do roka, nejlépe v pozdním jaře a pozdním podzimu. Pastva hovězím dobyt看em je pro rostliny nevhodná (Jersáková & Kindlmann 2004).

4.3. Rozšíření ve světě

Jak již bylo zmíněno, rod *Spiranthes* obsahuje cca 40 druhů rostlin a je zastoupen v Severní a Střední Americe, s několika druhy v Asii, Evropě a severní Africe (Rasmussen 1995; Jacquemyn & Hutchings 2010). V Severní Americe se vyskytují druhy s listy, ale i bez listů, např. *Spiranthes parasitica*. Postrádá chlorofyl, proto má bledý stvol a rozmnožuje se pomocí kořenů či oddenků. Druhy s listovými růžicemi tvoří hlízy, pomocí kterých se reprodukuje, jedná se například o *Spiranthes aestivalis* nebo *Spiranthes sinensis* (Rasmussen 1995). V Evropě se vyskytují čtyři zástupci rodu *Spiranthes*: *Spiranthes aestivalis*, *Spiranthes romanzoffiana*, *Spiranthes sinensis* a *Spiranthes spiralis* (Jacquemyn & Hutchings 2010).

Švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis*) je považován za primárně oceánický a atlantsko-mediteránní druh. Kromě Skotska je rozšířen po Britských ostrovech a většině Středomoří, kde je jeho populace početná a díky tomu se jedná o běžný druh flóry (Brabec et al. 2004). Na jihu Francie je tento druh běžný, ale na severu je na některých lokalitách ohrožen vyhynutím (Machon et al. 2003). Vzácný je ve střední a východní Evropě, kde je známo jen několik jednotek lokalit, především v Belgii, České republice, Německu, Nizozemsku, Slovensku a Švýcarsku (Jacquemyn & Hutchings 2010). V Nizozemsku bylo dříve známo 36 lokalit, dnes švihlík krutiklas roste pouze na třech z nich (Willems 2006). Severní hranice výskytu této orchideje prochází přes Benelux, Německo, Dánsko, Polsko, Slovensko až do evropského Ruska (Stroh 2014; Průša 2019).



Obr. 3: Mapa areálu rozšíření *Spiranthes spiralis* na území Evropy (Brabec et al. 2004).

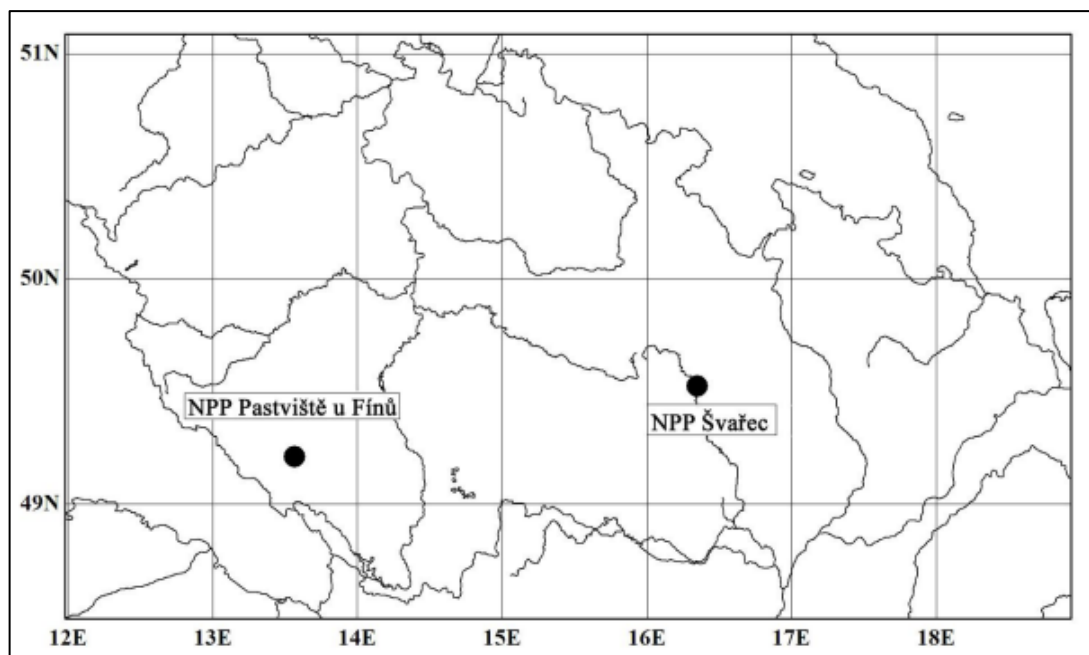
Hlavním důvodem úbytku tohoto druhu je zejména změna způsobu obhospodařování jeho přirozených lokalit či likvidace vhodných stanovišť. Velmi zřídka jsou zachované krátkostébelné louky a pastviny, které tomuto druhu vyhovují. Švihlík krutiklas je schopen osídlit celou škálu travinných porostů, kde se nevyskytuje silná konkurence (Brabec et al. 2004). V Británii roste hlavně v nížinách maximálně do 180 m n.m., ale v Rakousku lze nalézt lokality i v nadmořské výšce 900 m n.m. Šíření rostliny do horských a severních poloh je omezeno díky pozdnímu kvetení a možnosti brzkého výskytu sněhové pokrývky, která zabraňuje rozšiřování semen

(Jacquemyn & Hutchings 2010). Rozšíření této rostliny je omezeno na oblasti, ve kterých spadne většina srážek na jaře a na podzim, kdy jsou aktivní vhodné mykorrhizní houby (Tyteca 2000).

4.4. Výskyt v České republice

Švihlík krutiklas byl na území České republiky rozšířen přibližně na 237 lokalitách, z toho 105 lokalit zaniklo ještě před rokem 1900 (Štípková & Kindlmann 2021). Těžiště jeho rozšíření bylo hlavně v mezofytiku, vzácněji v termofytiku a v orefytiku byl ojedinělý. Rozprostíral se od kolinního po montánní stupeň, v nejnižší nadmořské výšce 250 m n.m. se vyskytoval u Kunětic u Pardubic, a naopak v nejvyšší na Lysé hoře v Beskydech ve výšce 1 100 m n.m. V Čechách se vyskytoval např. na Benešovsku, v Blanském lese, Podkrkonoší, Prachaticku, Průhonicích, Ralsku, Sychrovu, Vimperku atd., na Moravě např. Beskydy, Bílé Karpaty, Hostýnské vrchy, Vysočina atd. (Procházka 2010). Významnou roli v ubývání nejen orchidejí, ale i dalších rostlinných druhů bylo následkem poskytnutí dotací na používání hnojiv v zemědělství a spojení polí do obrovských celků (Adams & Adams 1971). V roce 1989 došlo k pozastavení dotací k používání hnojiv a došlo ke snížení jejich použití (Reif et al. 2008).

V současnosti se tento druh přirozeně vyskytuje již pouze na dvou lokalitách. První lokalita se nachází v Pošumaví v NPP Pastviště u Fínů, nedaleko Albrechtic u Sušice, v okrese Klatovy a druhá lokalita je na Českomoravské vrchovině v NPP Švařec (Brabec et al. 2004; Průša 2019). V roce 2011 byla objevena třetí lokalita výskytu v Hostýnských vrších na Moravě (Průša 2019; Šmiták – ústní sdělení). Na malé ploše o několika arech se vyskytují ohromné množství rostlin (v roce 2014 1 800–2 000 rostlin). Jelikož rostliny byly nalezené na soukromé zahradě, nelze s naprostou jistotou určit, že se jedná o přirozený výskyt. Na přání majitelky pozemku zde není prováděn intenzivní monitoring. Z přilehlého okolí této třetí lokality pocházejí historické záznamy z 20. století, kde je uvedeno 13 lokalit s výskytem švihlíku krutiklasu (Šmiták – ústní sdělení). V současnosti v České republice zaujímá *Spiranthes spiralis* pouze 6 % z původních lokalit výskytu (Štípková & Kindlmann 2021).



Obr. 4: Současný přirozený výskyt *Spiranthes spiralis* na území České republiky (Ipser 2010).

V historických záznamech z jihovýchodní Moravy je zaznamenán výskyt švihlíku letního (*Spiranthes aestivalis*). Dle záznamů se měl v roce 1946 vyskytovat na slatinných loukách u Bzence a Rohatce, ale jeho výskyt není doložen. *Spiranthes aestivalis* se od švihlíku krutiklas liší lodyhou, která vyrůstá z plně vyvinutých listových růžic a dřívějším kvetení od června do srpna (Procházka 2010).

4.5. NPP Pastviště u Fínů

Národní přírodní památka Pastviště u Fínů se nachází přibližně 1 km severovýchodně od obce Albrechtice u Sušice, v okrese Klatovy, v nadmořské výšce 580–646 m n.m. Za zvláště chráněné území byla lokalita vyhlášena 30. 04. 1985 (AOPK ČR 2022a). V roce 1980 zde našel místní ornitolog Ladislav Kučera populaci vzácné orchideje švihlíku krutiklas. Následný botanický průzkum ukázal, že se jedná o mimořádně cennou lokalitu s bohatým výskytem ohrožených a vzácných druhů flóry, která se zde udržela díky zachování tradičního obhospodařování lokality (Nesvadbová et al. 1987; Brabec et al. 2004).

Chráněné území se rozprostírá na 4,13 ha a jeho ochranné pásmo zaujímá další necelé 3 ha. V současnosti lokalita spadá pod orgán ochrany AOPK ČR – RP SCHKO Český les. Lokalita z geologického hlediska je řazena do bioregionu Sušický (1.42), dle fytogeografického členění do Volyňského Předšumaví (37e), a je zařazena do geomorfologické jednotky Šumavského podhůří (IB2). Z klimatického hlediska se jedná o mírně teplou oblast 3 (MT3) a je zařazena do přírodní lesní oblasti Předhoří

Šumavy a Novohradských hor (12) (MZCHÚ 2022a). Předmětem ochrany je ekosystém podhorských a horských smilkových trávníků (T2.3B), nevápnitá mechová slatiniště (R2.2), mezofilní ovsíkové louky (T1.1) a vlhké pcháčové louky (T1.5). V rámci druhů se jedná o hořeček mnohotvarý český (*Gentianella praecox* subsp. *bohemica*) a švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis*) (Anonymous 2014a).



Obr. 5: Pohled na severní část NPP Pastviště u Finů směrem na místo s výskytem populace *Spiranthes spiralis* (Marková 2021).

4.5.1. Geologické a klimatické podmínky

Území lze geomorfologicky začlenit do celku Šumavské podhůří, podcelku Svatoborská vrchovina a okrsku Sušická vrchovina. Lokalita patří k jižní části Českého masivu a moldanubiku, jehož geologický podklad tvoří injikované ruly, pararuly a arterity moldanubika. Výjimečně lze zde nalézt vložky krystalických vápenců. Na povrchu se vyskytují kvartérní hlinité a hlinitokamenité sutě. Půdní pokryv je tvořen kyselou a dystrickou kambizemí. Zamokřené a vlhké biotopy jsou tvořené ostrůvky pseudoglejové kambizemě, pseudoglejů, glejů až organozemí. Hlavní dominanta území jsou středně sklonité severovýchodní a jihovýchodní svahy erozně denudačního původu se zvětralinami podloží s částečně přemístěnými svahovými pohyby. Okolní svahy mají sklon 10–12° (Anonymous 2014a; AOPK ČR 2022a). V terénních sníženinách se vyskytují drobná slatinná výronišť a luční prameniště (Matějková 2019).

Dešťové srážky jsou odváděné pravostranným bezejmenným přítokem Podmokelského potoka. Území patří do klimaticky mírně teplé oblasti a mírně teplého a velmi vlhkého, vrchovinného okrsku B 10. Průměrná roční teplota dosahuje 7 °C, během vegetačního období se jedná o 13 °C. Průměrný roční úhrn srážek činí 700 mm, během vegetačního období 450 mm (Anonymous 2014a; AOPK ČR 2022a).

4.5.2. Flóra

Pastviště u Fínů a jeho nejbližší okolí patří mezi jedny botanicky nejcennější lokality v Plzeňském kraji. Jsou zde pestrá společenstva rostlin od pastvin s výskytem vzácných druhů rostlin, přes rašelinné slatinné louky, luční prameniště až k vlhkým koseným loukám. V NPP se nachází přes 260 druhů rostlin, z nichž je řada ohrožená. Kromě již výše zmíněného hořečku mnohotvarého českého (*Gentianella praecox* subsp. *bohemica*) a švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*) se zde vyskytuje např. vratička heřmánkolistá (*Botrychium matricariifolium*), vstavač kukačka (*Anacamptis morio*), vstavač osmahlý (*Neotinea ustulata*) nebo rosnatka okrouhloolistá (*Drosera rotundifolia*). Z mechorostů se zde vyskytuje 68 druhů včetně 7 druhů játrovek. Během mykologického průzkumu zde byly nalezeny druhy, které jsou ohrožené, téměř ohrožené nebo vzácné (Anonymous 2014a; AOPK ČR 2022a).

Švihlík krutiklas se nachází v severní části území zvané také jako švihlíkoviště v biotopu smilkových luk a pastvin, v sušší, horní části svahu (Anonymous 2014a). Rozprostírá se na ploše 1 ha na svazích orientovaných k jihovýchodu se sklonem 3 až 20° (Nesvadbová et al. 1989). Vyskytuje se v mozaice krátkostébelných porostů ze svazů *Arrhenatherion* (as. *Trifolio-Festucetum rubrae* subas. *nardetosum*), *Violion caninae* (as. *Polygalo-Nardetum* a as. *Thymo-Festucetum ovinae*). V místech, kde vystupuje skalní podloží se nachází ve společenstvech svazu *Hypericoperforati-Scleranthion perennis* (as. *Jasiono montanae-Festucetum ovinae*) (Nesvadbová et al. 2003). Při floristickém inventarizačním průzkumu v roce 2018 byl objeven ve vlhčích místech lokality vzácnější chlupáček myší ouško (*Pilosella lactucella*), který nebyl v předešlých průzkumech uveden (Matějková 2019). V roce 1991 byl na této lokalitě v místech výskytu švihlíku krutiklasu proveden půdní rozbor. Hodnota pH/KCl dosahovala hodnoty 4,0. Vápník a fosfor je zde zastoupen ve velmi malém množství, draslíku je také málo a zastoupení hořčíku je zde dobré. Z prvků je zde nejvíce zastoupeno železo (Nesvadbová & Pivoňková 1996).

4.5.3. Fauna

Na území se vyskytují bezobratlí živočichové, kteří se řadí na červený seznam a druhy, které jsou vázány na přirozená otevřená mokřadní nebo luční stanoviště. Bylo zde nalezeno mnoho druhů měkkýšů rodu vrkoč (vrkoč útlý, vrkoč mnohozubý, ...) a kuželík tmavý (*Euconulus trochiformis*). Z obratlovců zde žije zmije obecná (*Vipera berus*), ještěrka obecná (*Lacerta agilis*), ještěrka živorodá (*Zootoca viviparia*), ropucha obecná (*Bufo bufo*), rosnička zelená (*Hyla arborea*) nebo chřástal polní (*Crex crex*) (Anonymous 2014a; AOPK ČR 2022a).

4.5.4. Historický vývoj NPP

Před více než 100 lety byly pozemky s dnešním výskytem švihlíku krutiklasu vedené v parcelních listech jako orná půda. Pravděpodobně ještě v padesátých letech, minulého století zde probíhala orba. Díky této činnosti mohl být ovlivněn vývoj lokality a zvýšená eroze půdy. V dalších letech byly pozemky původním majitelům odebrány a vystřídal se zde několik státních či družstevních organizací. V 80. letech docházelo k reorganizacím zemědělských podniků a došlo tak k přerušení hospodaření na této lokalitě, neboť nikdo neměl zájem zde hospodařit. Ojedinele zde byl pasen hovězí dobytek nebo ovce, kozy, či jalovice majitelky sousedních pozemků Marie Prinzové (Nesvadbová et al. 1989; Nesvadbová & Pivoňková 1996). Dne 21.09.1980 byla lokalita objevena Ladislavem Kučerou, který na ploše 50 × 100 m našel více než 100 kvetoucích exemplářů vzácné orchideje *Spiranthes spiralis*. V té době to byla jediná známá lokalita jeho výskytu v tehdejší ČSR (Nesvadbová et al. 1989). Státní statky Sušice (dříve Hartmanice), kteří tyto pozemky spravovali, neměli zájem louky obhospodařovat a ty zůstaly ladem. Podobný přístup k pozemkům mělo i JZD Žihobce. Díky tomu začala stoupat pokryvnost bylin na 80–90 % a zároveň lokalitu ohrožovali nálety břízy, osiky a borovice (Nesvadbová et al. 1989; Nesvadbová & Pivoňková 1996; Matějková et al. 2015).

I když se vědělo o vzácnosti lokality, nebyla pravidelně sledovaná a udržovaná. Po objevení *Spiranthes spiralis* v roce 1980 začalo být usilováno o uznání chráněné oblasti. To se povedlo až po 5 letech, kdy v 30.04.1985 začala být lokalita oficiálně chráněná. V roce 1986 byla provedena inventarizace vegetace a zjistilo se, že došlo k úbytku jedinců, vlivem nevhodného obhospodařování travnaté plochy během zajišťování ochrany území (Nesvadbová et al. 1989). Při této inventarizaci byly

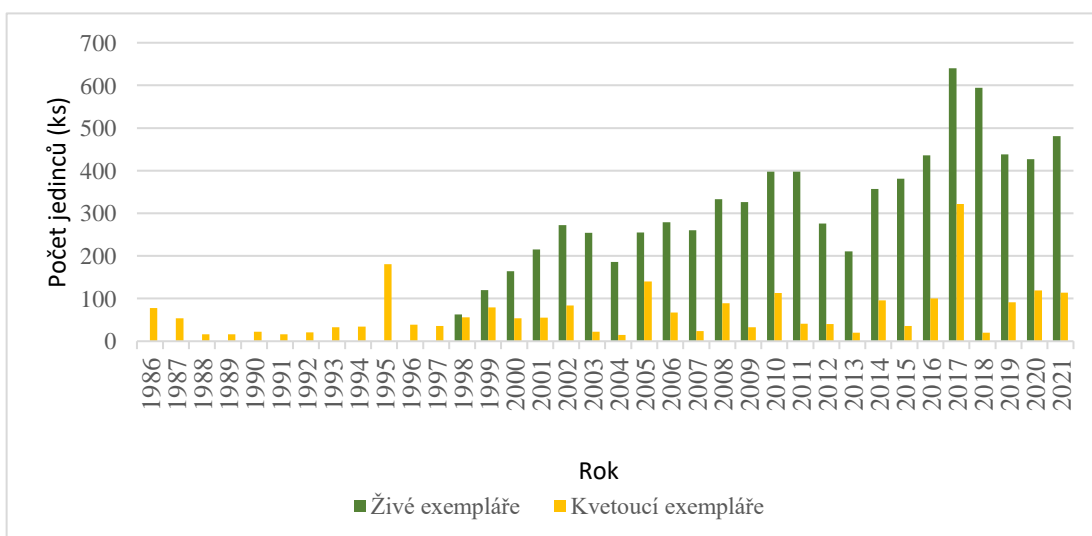
zároveň vytýčené tři trvalé plochy o velikosti 10 × 10 m zahrnující většinu kvetoucích exemplářů (Hostička & Nesvadbová 1990). Na lokalitě od roku 1986 až do začátku platnosti nového plánu péče byl zaveden tzv. Ochranařský plán. Tento plán stanovil nutná opatření, která vedla k zachování a obnovení obhospodařování území (Nesvadbová et al. 1989; Nesvadbová & Pivoňková 1996). V roce 1988 začal pastvu ovcí obstarávat Jozef Šlapka z nedalekých Nezdic na Šumavě a to až do roku 1992. Podmáčené části území byly jednou ročně ručně sečeny od poloviny června do konce července. Vegetační průzkum pro porovnání vlivu obhospodařování území byl proveden v roce 1997. Výsledek ukazuje na zvýšení druhové pestrosti na lokalitě. V novém plánu péče byl navýšen počet ovcí na 40 ks a bylo změněno období jejich pasení od 01.06. do 15.08. a od 15.10. do 30.04. následujícího roku (Matějková et al. 2015).

Současný plán péče je platný od roku 2015 do 2024. Tento plán plánuje vylepšit zázemí pro ovce, odstranit ovčí trus, který obohacoval půdu a podporoval v růstu ruderalní druhy rostlin. Stanovuje ideální počet ovcí v rozmezí 20–30 ks, maximálně do 50 ks a období pro pastvu ovcí navrhuje od 15.05. do 31.07. a druhou pastvu po odkvětu švihlíku krutiklasu v období 15.10–31.10. V případě nedostatečného spásání travní vegetace, doporučují pokosení buď v druhé polovině července nebo po odkvětu švihlíku krutiklasu v druhé polovině října. Pokud bude seč probíhat v období květu jiných chráněných rostlin, nutno vyznačit místo výskytu a ze seče ho vynechat. Dále plán počítá s opravou oplocení, dřevěných přelezů a s údržbou odvodňovací strouhy (Anonymous 2014a).

4.5.5. Monitoring *Spiranthes spiralis*

Monitoring na lokalitě probíhá nepřetržitě již od roku 1985, ale až v roce 1995 byla prohledána celá pastvina, což může mít za následek mírně podhodnocené údaje z předchozích let. Od roku 1998 dochází k řádnému označování všech nalezených exemplářů švihlíku krutiklasu. K označení se používají dva způsoby. První způsob se rostliny přímo označují hřebíkem s číslem, v přesně definované vzdálenosti a směru. Druhým způsobem se zaměřují jednotlivé rostliny s přesností na 0,5 cm k pevně fixovaným liniím či plochám. Tento způsob se používá v místech s nejhustším výskytem rostlin. První způsob označování rostlin se postupně využívá méně než druhý způsob. Monitoring probíhá dvakrát ročně, nejprve počátkem května, kdy končí vegetační sezóna nadzemních růžic a na přelomu srpna a září, kdy rostliny kvetou

a začínají vyrůstat nové listové růžice. Fotodokumentace je prováděná v jarní části monitoringu, kdy se označí jednotlivé rostliny a vyfotí se spolu s kalibračním rámečkem o velikosti 1 cm². V této části monitoringu se zaznamenává prezence či absence listových růžic, jejich počet a plocha půdorysu pomocí fotografií. Při podzimní části monitoringu se zaznamenává prezence či absence květonosných stonků, jejich výška a počet květů. Dále se zaznamenávají počet nově vyrůstajících růžic (Brabec 2021). Data z mnohaletého monitoringu odhalila, že na lokalitě NPP Pastviště u Fínů je zastoupeno více kvetoucích exemplářů, které vykvétají i v dalším roce, než tomu je v Nizozemí. Dále byly zjištěné obdobné informace o minimálním množství dormance rostlin, kterou procházelo pouze osm rostlin. Reagovaly tak na suchý rok anebo následující rok po suchém roce (Brabec et al. 2011). Do konce října 2021 bylo zaměřeno celkem 975 výskytů švihlíku krutiklasu. Od roku 1998 bylo celkem zaznamenáno 1 662 rostlin, z toho v roce 2021 se jednalo o 481 živých rostlin. Dlouholetý monitoring umožňuje pozorovat výkyvy během několika let. Nejvyšší úbytek díky nepříznivým vodním poměrům a poškození divokými prasaty byl v letech 2012 a 2013. Procento živých exemplářů pokleslo až na 53 % z předchozích let. Naopak již v roce 2017 počet živých exemplářů dosáhl nejvyššího počtu 640 kusů. Ale následující extrémně suchý rok 2018 přinesl 594 živých rostlin, z toho pouze 20 kvetoucích. Živé exempláře poklesl ještě výrazněji v roce 2019 na 438 a v roce 2020 pouze na 427 živých rostlin. V roce 2021 bylo nalezeno celkem 481 živých rostlin, z toho 114 exemplářů kvetlo (Brabec 2021).



Graf. 1: Počet kvetoucích exemplářů *Spiranthes spiralis* od začátku monitoringu (1986) a počet živých exemplářů *Spiranthes spiralis* od roku 1998 do roku 2021 v NPP Pastviště u Fínů (Brabec 2021).

4.6. NPP Švařec

Národní přírodní památka Švařec se nachází přibližně 0,5 km severovýchodně od obce Švařec v okrese Žďár nad Sázavou v nadmořské výšce 376–468 m n.m. Za zvláště chráněné území byl vyhlášen 25.07.1985. Chráněné území se rozprostírá na ploše 13,96 ha a spravuje ho AOPK ČR – RP SCHKO Žďárské vrchy (AOPK ČR 2022b). Předmětem ochrany jsou společenstva suchých trávníků s jalovci a vstavačovými, mezofilních ovsíkových luk a mezofilních bylinných lemů, ochrana silně ohrožených druhů vstavače kukačky (*Anacamptis morio*), švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*) a druhu modrásek černoskvřinný (*Maculinea arion*) a jejich přirozené biotopy (Anonymous 2009). Území je zařazeno do bioregionu Sýkořský (1.51), fytogeograficky spadá do Moravského podhůří Vysočiny (68), pod geomorfologickou jednotku Nedvědícká vrchovina (IIC4B). Klimaticky se jedná o mírně teplou oblast 3 (MT3) a je zařazeno do přírodní lesní oblasti Předhoří Českomoravské vrchoviny (33) (MZCHÚ 2022b).



Obr. 6: Pohled na svazité území v NPP Švařec (Broumová 2019).

4.6.1. Geologické a klimatické podmínky

Území je tvořeno proterozoickými horninami moravika svratecké klenby olešnické skupiny. Je tvořeno drobnozrnnými biotitickými a biotit-muskovitickými pararulami, místy se vyskytuje granát a granátické pararuly, muskovitické a muskovit-biotitické kvarcity a kvarcitické ruly, svory až fylity, převážně grafitické. Místy se zde nalézají

kvarcity, grafity a krystalické vápence. Horniny se ve směru od severu k jihu střídají v úzkých pásích. Sprašové půdy se vyskytují v podloží jižního svahu. Půdním typem zde převažuje kambizem typická, která na celém území mění svou mocnost půdního profilu. NPP se nachází na pravém příkrém údolním svahu Brťovského potoka, který byl v minulosti pozměněn těžbou nerostů (Čech et al. 2002; AOPK ČR 2022b). Těžební činnost zde probíhala v 18. století. Průměrná roční teplota se na území pohybuje nad 7 °C a průměrný roční úhrn srážek dosahuje cca 600 mm. Odvodňování lokality zajišťuje Zásalský potok, který patří do povodí Svratky (Anonymous 2009).

4.6.2. Flóra

Převládající složkou vegetace na lokalitě jsou semixerotermní travinobylinná společenstva třídy *Festuco-Brometea*. Jižní svahy s mělkou půdou osidlují krátkostébelné kostřavové trávníky, ve kterých se vyskytuje kostřava žlábkovitá (*Festuca rupicola*), chrpa latnatá (*Centaurea stoebe*), rmen barvířský (*Anthemis tinctoria*), ale také se zde vyskytuje početná populace vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) a vzácně koniklec velkokvětý (*Pulsatilla grandis*). Na hlubších půdách případně místech, kde se vyskytuje krystalický vápenec rostou náročnější druhy rostlin jako je válečka prapořitá (*Brachypodium pinnatum*), pětiprstka žežulník (*Gymnadenia conopsea*), vítod chocholatý (*Polygala comosa*) nebo hořec brvitý (*Gentianopsis ciliata*). Střední část území jsou ovsíkové louky svazu *Arrhenatherion* s typickými druhy např. ovsíkem vyvýšeným (*Arrhenatherum elatius*) nebo zvonkem rozkladitým (*Campanula patula*). Ve společenstvech travinobylinných lemů roste například ohrožená sasanka lesní (*Anemone sylvestris*). V podrostu dřevinné vegetace se nachází původní hájové druhy jako orlíček obecný (*Aquilegia vulgaris*), lýkovec jedovatý (*Daphne mezereum*), lilie zlatohlavá (*Lilium martagon*), samorostlík klasnatý (*Actaea spicata*) a další (Čech et al. 2002; AOPK ČR 2022b). Celkový charakter území tvoří velmi početná populace jalovce obecného (*Juniperus communis*). Nedávno zde byl objeven kriticky ohrožený čistec německý (*Stachys germanica*) a ohrožený čistec roční (*Stachys annua*). Ze zajímavých druhů makromycet zde roste např. hvězdovka smrková (*Geastrum quadrifidum*) nebo š'avnatka papouščí (*Hygrocybe psittacina*) (Anonymous 2009).

Spiranthes spiralis se především vyskytuje ve východní části území, v suchých mezofilních trávnících (Anonymous 2009). V dnešní době se zde nacházejí pouze dvě místa, kde se švihlík krutiklas každý rok vyskytuje. Jedná se o nízkostébelné, obvykle

mírně zastíněné a poněkud vlhčí porosty při okraji lesních porostů a křovin (Čech et al. 2002; AOPK ČR 2022b). Švihlík krutiklas se sporadicky objeví ještě na dalších dvou místech, ale jeho výskyt je ovlivněn průběhem počasím a správností provádění managementu lokality (Šmiták-ústní sdělení). V místech, kde se švihlík krutiklas hojně vyskytuje, bylo změřeno pH/KCl 6,7–6,8. Půdní analýzy prokázaly velmi vysoký obsah hořčíku, vysoký obsah vápníku, střední hodnoty draslíku a velmi nízký obsah fosforu (Anonymous 2009).

4.6.3. Fauna

Vyskytují se zde převážně teplomilné druhy stepi, lesostepi a xerothermních trávníků. Z řádu motýlů se zde vyskytují vřetenušky (*Zygaena carniolica*, *Zygaena loti*), hnědásek květelový (*Melitaea didyma*) nebo vzácný modrásek černoskrvný (*Maculinea arion*). Z řádu brouků se zde vyskytuje střevlíček (*Licinus depressus*), kozlíček písečný (*Dorcadion pedestre*), nosatec (*Mecaspis alternans*). Vyskytují se zde teplomilné druhy mravenců např. *Messor muticus* nebo *Tapinoma ambiguum*. Také se zde objevila populace kudlanky nábožné (*Mantis religiosa*). Dále se zde vyskytuje ještěrka obecná (*Lacerta agilis*), užovka hladká (*Coronella austriaca*) nebo slepýš křehký (*Anguis fragilis*) (Anonymous 2009; AOPK ČR 2022b).

4.6.4. Historický vývoj NPP

V minulosti v okolí území probíhala těžba a zpracování nejen železných rud, ale i drahých kovů. Jako památka na hornickou činnost se v dolní části NPP nachází hornická kaple Nejsvětější Trojice, která pravděpodobně pochází z 16. století. Počátkem 20. století byla značná část plochy území využívána jako orná půda. Střední část území byla orbou obhospodařována pravděpodobně ještě v druhé polovině 20. století. Pouze nejstrmější části svahů byly využívány pro pastvu hospodářských zvířat. Na tomto území neproběhla kolektivizace zemědělství především z důvodu nepříznivé terénní situace. V té době pozemky obhospodařovalo JZD Prosetín, které zde zřídilo ovčín a pastevní prostor. Na pozemcích se páslo několik set kusů dobytka, ale přesto část dnešního NPP byla ponechána samovolné sukcesy. Pastva ovci zde roku 1989 byla ukončena a značná část území byla ponechána ladem. Pouze vlastníci či nájemci pravidelně kosili mezofilní louky v centrální části území. Vlivem tohoto počínání docházelo k velmi rychlým nežádoucím sukcesním změnám a ústupu ohrožených druhů. Po zřízení zvláště chráněného území byla zahájena péče

o území. Byl odstraněn nálet borovic a dalších dřevin, zajištěno pravidelné kosení zapojených porostů třtiny křovištní (Anonymous 2009).

V roce 1998 byla zajištěna pastva ovcí v části lokality s výskytem *Spiranthes spiralis*. Díky tomuto opatření v roce 1999 švihlík bohatě kvetl. Současný plán péče platil od roku 2011 do roku 2021. Tento plán navrhoval pokračovat v pastvě ovcí na přelomu jara a léta, odstraňování náletů a výmladků křovin, kosení třtiny křovištní, na zachovalých místech suchomilných trávníků a mezofilních lemů řízeně vynechávat pastvu či kosení pro možnost vývoje a přežívání dospělců ohrožených druhů hmyzu. Dále doporučuje, aby pastva byla prováděná cca 40 ks ovcí tak, aby bylo do 15 ovcí/ha v termínu od 15.05. do 15.07. Ve východní části území by pastva měla být ukončena do 30.06 (Anonymous 2009).

4.6.5. Monitoring *Spiranthes spiralis*

Lokalita je monitorována od roku 1984 po nalezení výskytu kriticky ohrožené orchideje švihlíku krutiklas. Monitoringu se od té doby pravidelně věnuje Jindřich Šmiták, předseda Orchidea klubu Brno. Nejprve byl sám nebo byli maximálně ve dvou. Později v 90. letech vytvořil s několika jeho přáteli z Orchidea klubu sledovací skupinu. Od roku 2000 se jejich pravidelné návštěvy staly klubovou akcí na ukončení orchidejové sezóny. V dnešní době se monitoringu účastní 25–35 členů Orchidea klubu Brno z celé České republiky (Šmiták – ústní sdělení). Monitoring na lokalitě NPP Švařec pravděpodobně není prováděn tak podrobně se zaměřením jednotlivých rostlin, tak jako je tomu v NPP Pastviště u Fínů.

V 80.–90. letech se počty jedinců pohybovaly v rozmezí jednotek až desítek kusů. První záznamy pochází až z roku 1999, kdy se na lokalitě nacházelo 180 kvetoucích exemplářů. V roce 2002 byla provedena pastva v nevhodnou dobu a ovlivnila počet kvetoucích exemplářů, kterých bylo pouze 40 ks. Nejbohatší rok na počet kvetoucích rostlin byl rok 2017, kdy kvetlo přes 500 ks rostlin. Naopak hned následující rok 2018 nekvetla ani jedna rostlina, pravděpodobně z důvodu horkého a suchého léta (Šmiták – ústní sdělení).

5. Metody ochrany pro zachování druhů

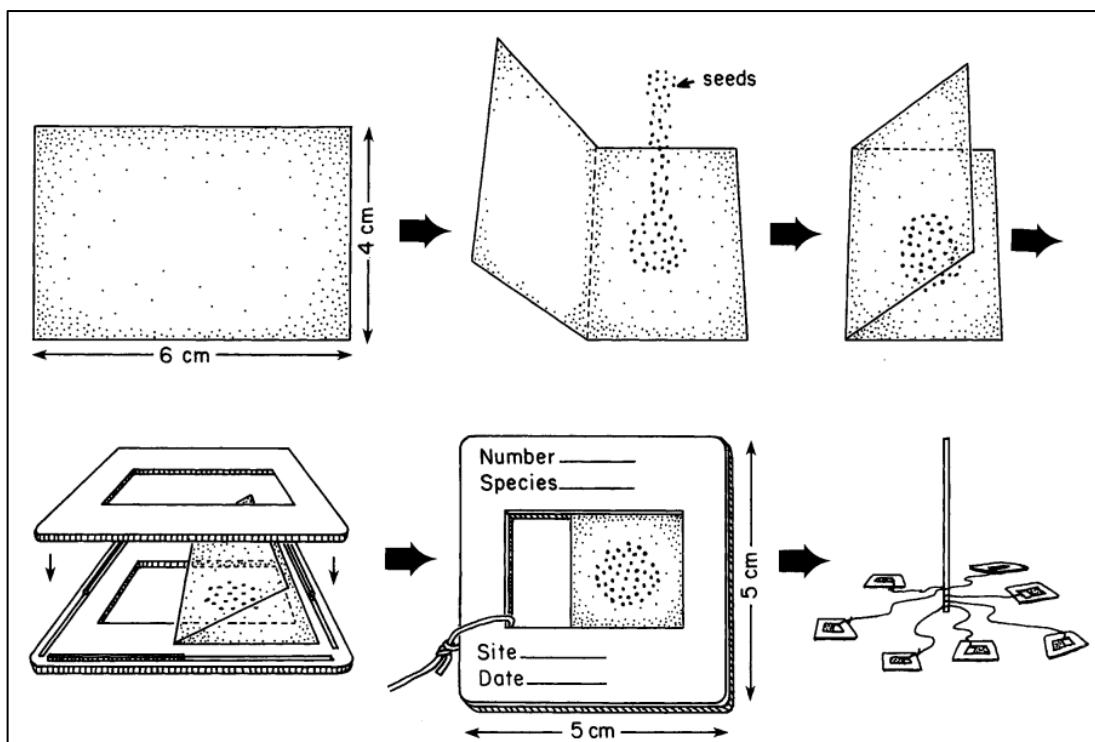
5.1. In situ a ex situ ochrana

Pro zachování genetické rozmanitosti existují dva způsoby ochrany. Jedná se o in situ a ex situ ochranu. In situ ochrana se zabývá ochranou ekosystému a přírodních biotopů, především se zabývá zachováním a obnovou životaschopných populací druhů flóry a fauny. Tento způsob ochrany probíhá přímo na lokalitě výskytu druhů (Maxted 2001). Díky tomu mohou organismy na lokalitě pokračovat v jejich přirozeném procesu evoluce (Maunder et al. 2004).

Ex situ ochrana znamená ochranu biologické rozmanitosti mimo jejich přirozené stanoviště. Využívá se v případě, kdy není možné zajistit vývoj populace v jejím místě výskytu, nebo v případě poškození přirozeného stanoviště, kde nelze využít ochranu in situ (Hoban & Schlarbaum 2014). Cílem ex situ ochrany je zabránit vyhynutí druhů organismů a doplnit ochranu in situ (Maunder et al. 2004). Sbírkují různé rostliny nebo zvířata. K této ochraně patří také zoologické zahrady, botanické zahrady, zařízení pro volně žijící živočichy (obory) a sbírky zárodečných plazm divokých a domestikovaných taxonů (IUCN 2002). Genetické informace jsou zachovány uchováním v semenných bankách, skladováním pylu, tkání, vegetativním klonováním a udržováním celých rostlin (Sarasan et al. 2006). Rostlinné druhy jejichž semena okamžitě klíčí, nebo jejich klíčivost je velmi nízká, nelze uchovávat v semenných bankách. Pro tyto rostliny je vhodnější zachování v podobě živých exemplářů nebo v kulturách in vitro (Maunder et al. 2004). Tyto sbírky umožňují zachovat biologickou diverzitu rostlin a návrat na jejich přirozená stanoviště (Hoban & Schlarbaum 2014). Kvalitní genetický materiál z ex situ ochrany lze přesunout z umělých podmínek, např. pomocí reintrodukce. Jedná se o vysazení populace druhu v místech, které druh v minulosti osidloval a vyhynul na nich. Dále lze posilovat populaci zabráněním vyhynutí druhů rostlin a zvýšit početnost populace. Pokud nelze v původním místě výskytu populaci obnovit, lze pomocí introdukce na vhodném stanovišti vytvořit novou populaci (Anonymous 2014b). Nevýhodou ochrany ex situ je narušení přirozeného vývoje a evoluce rostlin, neboť člověk svým zásahem vývoj ovlivňuje (Prance et al. 2004).

5.2. Klíčení semen in situ

Z důvodu malé velikosti semen orchidejí je velmi obtížné pozorovat jejich klíčení v in situ podmínkách. Většina informací o průběhu klíčení pochází z ex situ podmínek, především in vitro experimentů. Pro zkoumání klíčivosti semen v in situ podmínkách se nejčastěji používá metoda s použitím diapozitivů od autorů Rasmussen & Whigham (1993). Autoři do diapozitivů vložili nylonovou síťovinu o rozměrech 40 mm × 60 mm, s velikostí ok 35 μm. Síťovinu přeložili, vložili do ní semena orchidejí a umístili ji do diarámečku. Velikost pórů síťoviny zvolili tak, aby zadržela semena a zároveň umožnila průchod drobným půdními bakteriím, organismům a houbovým hyfám (Rasmussen & Whigham 1993). Diarámečky se do půdy umístí buď horizontálně (Rasmussen & Whigham 1998) či vertikálně (Whigham et al. 2002) a pomocí vlasce se přivážou ke kovové tyči či kolíku. Takto umístěné diarámečky lze postupně odebírat a umožní se tím dlouhodobé zkoumání plochy (Rasmussen & Whigham 1993). Po vyjmutí diapozitivu umyli vodou a vyhodnotili stav semen pomocí mikroskopu nebo binokuláru (Whigham et al. 2002).



Obr. 7: Způsob aplikace metody pro zkoumání klíčivosti semen pomocí diapozitivů (Rasmussen & Whigham 1993).

5.3. Klíčení in vitro

In vitro klíčení probíhá v umělých a kontrolovaných podmínkách. Jsou přesně definované postupy a podmínky klíčení, dále jsou určeny druhy kultivačních médií, výše teploty, určené hodnoty světelných a vlhkostních podmínek. Prostředí musí být vždy sterilní kvůli zabránění kontaminace médií houbovými patogeny (Procházka & Šebánek 1997). Pokusy s klíčením semen orchidejí začaly již v roce 1800. Nejprve semena vysévali na mech, kůru nebo listy (Arditti 1967). Symbiotické klíčení semen vzniklo díky pokusu klíčení semen v květináčích s mateřskými rostlinami, kde se nacházely i symbiotické houby (Burgeff 1909). Symbiotické klíčení se používá pro konzervování a obnovu orchidejí (Kauth et al. 2008). Toto klíčení může být výhodnější u druhů, které za nepřítomnosti mykorhizní houby neklíčí. Nevýhodou se jeví obtížné nalezení optimálního mykobionta, neboť orchideje tvoří mykorhizu často s obtížně kultivovanými druhy hub (Rasmussen 1995). Na možnosti klíčení semen bez mykorhizní houby neboli tzv. asymbiotické klíčení, přišel Knudson (1922) pomocí živných roztoků doplněných 1% sacharózou. Pro semena, která neklíčila snadno, vyvinul médium označované jako Knudson C Medium (Knudson 1946). Asymbiotické klíčení semen slouží ke zkoumání klíčivosti semen (Kauth et al. 2008). Výhodou asymbiotického klíčení je dosažení vyšších počtů zdravých sazenic, než je tomu v přírodních nebo symbiotických podmínkách a využití jednodušších kultivačních postupů (Arditti 2008).

Aby semena v přírodě klíčila potřebují mít vhodně provzdušněnou půdu, vhodnou teplotu a přístup k vodě. Kromě těchto faktorů vstupují do klíčení i vnější podmínky, jako je přítomnost vhodné mykorhizní houby (Rasmussen 1995). Jak již bylo zmíněno, kultivace in vitro probíhá na speciálních médiích, např. Mo2, Michl-15, Michl-16, bez přítomnosti symbiózních hub (u asymbiotického klíčení) (Ponert et al. 2011). Média obsahují kromě agaru i glyciny (fruktózu, glukózu a sacharózu), které slouží jako zdroj uhlíku pro klíčící semena. Dále může médium obsahovat vitamíny thiamín, pyridoxin, biotin, fytohormony nebo různé organické doplňky, jako je ananasový džus, rajčatová šťáva nebo živočišné uhlí a další látky (Procházka & Velísek 1983; Ponert et al. 2013). Hlavním úkolem živného média je zajistit dostatečnou výživu klíčícího embrya, jeho růst a vývoj i na delší období. Živné médium obsahuje kromě zmíněných látek i regulátory růstu. Mezi ně patří auxiny pro stimulaci růstu buněk, indukci somatické embryogeneze a stimuluje růst apikálního meristému (Rout 2006).

Cytokiny slouží ke stimulaci buněčného dělení, k indukci tvorby prýtlů a inhibici tvorby kořenů (Mercier et al. 2003). Aby semena orchidejí mohla začít klíčit, je třeba překonat jejich dormanci, kterou způsobují fyzikální nebo chemické vlastnosti osemení (Rasmussen 1995). Dormance může být morfologická, fyziologická nebo morfofyziologická. Morfologická dormance se projevuje zpožděním klíčení kvůli nediferencovanému embryu. Fyziologická dormance se projevuje nedostatečnou energií embrya k prasknutí osemení a embryo pouze přijímá vodu (Baskin & Baskin 2001). Fyzická dormance se podobá předešlé fyziologické s rozdílem, že semena nejsou schopná přijímat vodu vlivem neporušeného osemení (Baskin & Baskin 2004). Dormance může být překonána teplotním režimem, chemickým rozpuštěním osemení neboli skarifikací, dlouhodobým smáčením, světelným režimem nebo chemickými signály od mykorhizní houby (Rasmussen 1995).

5.3.1. Skarifikace

Skarifikace semen odstraňuje inhibující látky ze zralých semen, které by bránily v úspěšném generativním rozmnožování (Vejsadová 2006). Pomocí povrchové sterilizace dojde k rozpuštění suberinové bariéry embrya, a to umožní snadnější příjem vody a zvýší se procento semen, která vyklíčí (Harvais & Hadley 1967). Optimální doba sterilizace je obvykle delší než doba, při které dojde k dekontaminaci semen (Rasmussen 1995). Obvykle se semena ponechají ve sterilizačním roztoku do doby, dokud nedojde k jejich vybělení z hnědé barvy na barvu slonovinové kosti (Vejsadová 2006).

Nejčastěji se pro narušení osemení používají chlornany, a to především chlornan vápenatý ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Jedná se o hlavní složku chlorového vápna, jeho pomocí lze dosáhnout lepších výsledků než při použití chlornanu sodného (NaOCl), který mnohem častěji poškodí embryo (Rasmussen 1995; Vejsadová 2006). Tyto chlornany jsou oxidační činidla. Chlornan vápenatý se používá převážně v nasyceném cca 7,5% nebo mírně slabším 5% roztoku. Chlornan sodný je použit v slabších koncentracích v rozmezí od 0,2 % do 5 %. Jedná se o velmi silně zásadité roztoky. Oxidační činidla jako alkoholy neovlivní klíčivost. Hydroxid sodný (NaOH) je silná zásada, která ovšem klíčivost podporuje a může mít podobné účinky jako chlornany. Vhodnou alternativou sterilizačního a oxidačního činidla lze použít i peroxid vodíku (H_2O_2). Sice se jedná o slabší činidlo, ale v účinných koncentracích může být pro semena škodlivější (Rasmussen 1995). Pokud je roztok připraven delší

dobu, dochází k uvolňování chloru a tím se snižuje jeho sterilizační účinek. Ke snížení tohoto účinku může dojít i při použití velkého počtu semen na malý objem roztoku (Harvais 1980; Rasmussen 1995).

Pro zvýšení kontaktu mezi roztokem a nesmáčivým povrchem osemení je lepší do sterilizačního roztoku přidat detergent. Nejčastěji používaný detergent je Tween 80 (Rasmussen 1995). Před tím, než je započatá vlastní sterilizace semen, dochází k máčení semen v roztoku ethanolu o koncentraci 70 %, nebo přidáním ethanolu do sterilizačního roztoku. Dojde tím ke zvýšení sterilizačního účinku (Vejsadová 2006).

Vliv skarifikace na semena lze otestovat pomocí testu jejich životaschopnosti. Pro tento test se používá nejčastěji barvivo trifenylnitrazolium chlorid (TTC). Za normálních okolností se jedná o bezbarvou látku, ale po kontaktu s embryem je živými buňkami redukován na stabilní nerozpustné červenobarevné sloučeniny. Fluorescein diacetát (FDA) je další používané barvivo, které hydrolyzováním v buňkách vytvoří fluorescenční barvivo, tzv. fluorescein (Rasmussen 1995).

Ponert et al. (2013) nejprve semena vydezinfikovali v 70 % roztoku ethanolu, a to pomocí injekční stříkačky, do které umístili semena s nylonovou látkou. Ethanol nechali působit 1–5 minut a následně semena třikrát promyli destilovanou vodou. Následně do injekční stříkačky nasáli 2% roztok H_2SO_4 na 10 minut. Dalším jejich krokem byla aplikace dezinfekčního roztoku chlornanu sodného nebo vápenatého, který nechali působit 3–30 minut. Po uplynutí této doby opět byla semena třikrát promyta destilovanou vodou. Injekční jehlu vyměnili za větší průměr, semena protřepali a pomocí destilované vody je vyseli na pevné médium v Petriho misce. Tu pomocí parafilmu uzavřeli a vložili do tmy se stálou teplotu dle konkrétního druhu orchideje (Ponert et al. 2011; Ponert et al. 2013).

5.3.2. Světlo

Vliv světelných podmínek na klíčení semen není dostatečně prozkoumán. Rozdíly jsou jak v jednotlivých druzích, tak i v tom, v jakých přirozených prostředích se nacházejí (Rasmussen 1995). Intenzita světla negativně ovlivňuje procento klíčivosti. Pokud je intenzita vysoká, klíčivost semen je minimální nebo žádná. Pro optimální klíčení semen je doporučována nepřetržitá tma, neboť i nízká intenzita světla snížila procento klíčivosti (Harvais & Hadley 1967). Počátek klíčení semen

může být v určitém světelném prostředí vyšší. Naproti tomu stádiu protokormu může vyhovovat jiný fotoperiodický režim než pro začátek klíčení semen. Pro volbu světelných podmínek je vhodné zohlednit přirozené podmínky, při kterých semena určitých druhů klíčí (Kauth et al. 2008).

5.3.3. Teplota

Rychlost a procento klíčivosti semen závisí na teplotě během kultivace. Optimální teplota pro terestrické orchideje se pohybuje v rozpětí 22–25 °C (Rasmussen 1995). Dříve byla považována fotoperioda za důležitější než teplota při klíčení semen. Mnoho rostlinných druhů potřebuje určitou teplotu, aby mohlo dojít k přerušení fyziologické dormance semen. Některé výzkumy doporučovaly střídavé teplotní režimy, které simulují střídání teplot během ročního období. Přitom semena orchidejí častěji v in vitro podmínkách klíčí při konstantní teplotě. Například optimální rozpětí teplot pro klíčení prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) se pohybuje v rozmezí 23–24,5 °C (Rasmussen et al. 1990). Tolerance semen vůči širokému rozmezí teplot, umožňuje vyklíčení semen po určitou dobu a díky tomu nevyklíčí všechna semena ve stejnou dobu (Rasmussen 1995). Při in vitro kultivaci semena klíčí při konstantní teplotě, která pro ně není přirozená. Z tohoto důvodu je vhodnější zvolit střídání teplotních režimů a simulovat tak přirozené procesy (Baskin et al. 2006). Některé druhy orchidejí i přes optimální teplotu klíčí obtížně, nebo není překonána jejich dormance. Pro její překonání je využita stratifikace chladem, která spočívá v ponechání semen více než 8 týdnů při teplotách, které sahají blízko k bodu mrazu. Díky tomu semeno dokáže absorbovat vodu, naváže kontakt s mykorrhizní houbou a dozraje (Rasmussen 1995).

5.3.4. Zralost semen

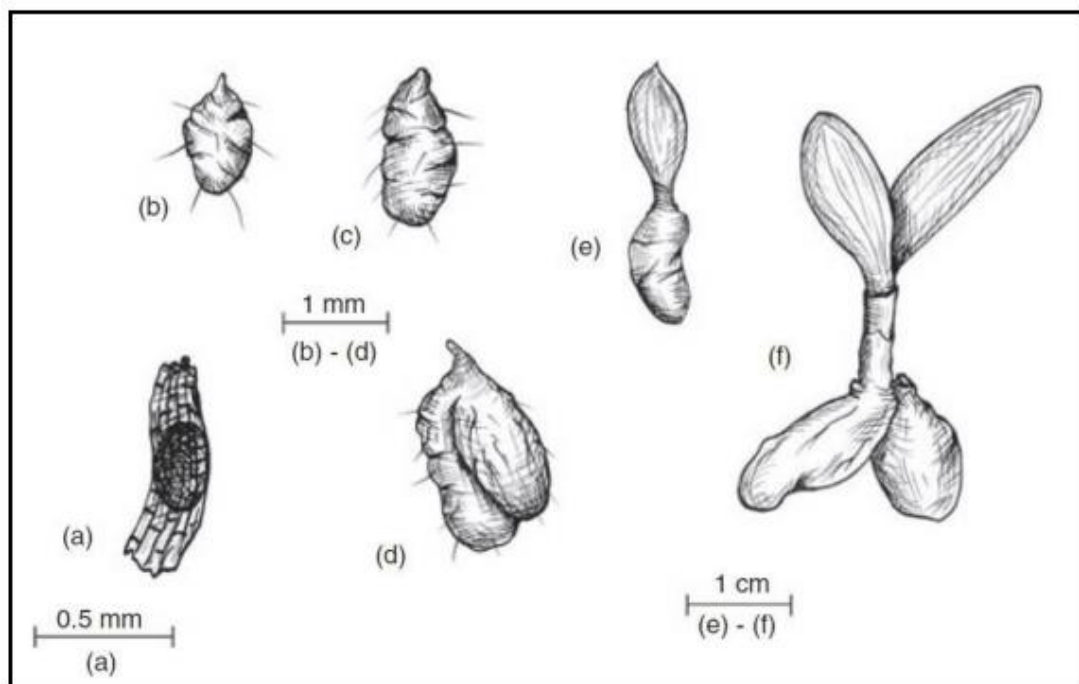
Zralost semen ovlivňuje schopnost klíčení semen v in vitro podmínkách. Zralá semena představují plně vyztárlá embrya semen, kdy při konci zrání dochází k dehydrataci a semena mají 11% vlhkost. Embryo je obaleno hydrofobní tenkou vrstvou, která zabraňuje pronikání vody k embryu semene. Barva semene je ovlivněna fází zralosti. Obvykle bývají zbarvená od pískové barvy, přes hnědou až téměř černou barvu. Nezralá semena orchidejí v in vitro kultuře často klíčí snadněji než zralá semena (Lindén 1992; Rasmussen 1995). Jedná se například o druhy vemeníku (*Plantathera* spp.), jejichž zralá semena nedokážou v in vitro kultuře vyklíčit

(Rasmussen 1995). Další výhodou použití semen z nezralých semeníků je zajištění jejich sterility. Při výsevu není tudíž nutno sterilizovat samotná semena, ale pouze povrch tobolky. Pro jejich sterilizaci se používají stejné sterilizační roztoky, jako když se sterilizují semena, jedná se o již zmíněné chlornany a další roztoky. Jelikož jsou nezralé tobolky odebrány předtím, než dojde k vytvoření dormančních mechanismů, které se v semeni vytvářejí při dozrávání, není třeba je před výsevem překonávat (Kitsaki et al. 2004). Další výhodou u nezralých semen může být snadnější přijímání vody než u zralých semen. (van Waes & Debergh 1986a). Velká nevýhoda nezralých semen je nutnost správně načasovaného odběru a co nejdříve po sklizni provést jejich výsev. Doba vhodnosti odběru nezralých tobolek se liší podle druhu orchideje. Ve sterilním prostředí dojde k rozřezání semeníku pomocí skalpelu a semena jsou vyseta na kultivační médium (Kitsaki et al. 2004). Hydrofobní vrstva, kterou je embryo obaleno, umožňuje zralým semenům terestrických druhů orchidejí setrávat v půdě měsíce či roky. Tato vlastnost jim umožňuje vytvořit semennou banku a vyčkat na vhodné podmínky pro klíčení (Rasmussen 1995).

5.3.5. Klíčení semen *Spiranthes spiralis* v kultuře in vitro

Semena severoamerických druhů rodu *Spiranthes* po uskladnění v lednici jsou životaschopná po dobu tří let (Curtis 1936). Nejlepší výsledky klíčivosti semen jsou dosaženy, pokud byl výsev proveden co nejdříve po odebrání tobolek (Anderson 1990). Sterilizace semen v 5% roztoku Ca (OCl)₂ po dobu 10 minut je dostačující k dekontaminaci semen, ale působení roztoku 30 minut zvýšilo procento klíčivosti ze 4 % na 60 % (van Waes & Debergh 1986a). Mezi jednotlivými druhy rodu *Spiranthes* jsou odlišnosti v různé době sterilizace semen (Rasmussen 1995). Druhy tohoto rodu jsou tolerantní vůči použitým substrátům pro klíčení (Anderson 1991). Zvýšení klíčivosti *Spiranthes spiralis* lze dosáhnout nahrazením anorganického dusíku za organický dusík v substrátu (van Waes & Debergh 1986b). Švihlík krutiklas klíčí ve tmě (Stephan 1988, cit. podle Rasmussen 1995) a také při 16hodinové fotoperiodě (Wells & Kretz 1987, cit. podle Rasmussen 1995). Semena po vystavení světlu klíčila mnohem méně, než při klíčení za tmy (van Waes 1984). Dulić et al. (2019) zkoumali vliv médií a fotoperiody na klíčení semen *Spiranthes spiralis*. V tomto výzkumu zjistili opačné výsledky. Semena lépe klíčila při 16hodinové fotoperiodě. Nejlepší pro klíčení semen bylo médium, které bylo doplněné 6-(γ,γ -dimethylallylamino) purinem a také na médiu, které obsahovalo

anorganický dusík, pepton a kokosovou vodu (Dulić et al. 2019). Přesazení švihlíku krutiklasu je vhodné po 13 týdnech od klíčení a snížení teploty na 12–14 °C podpořilo vývoj výhonů. Po 7 měsících od výsevu vzcházejí první listy a kořeny. V kultuře začal kvést po 5 letech od počátku klíčení (Rasmussen 1995).



Obr. 8: Jednotlivé fáze klíčení semen *Spiranthes spiralis*. (a) – semeno, (b–d) – fáze protokormu, (e) – stav rostliny při tvorbě prvních nadzemních orgánů, (f) – následný vývoj rostliny tvořící dvě kořenové hlízy (Ziegespeck 1936, cit. podle Ipsier 2012).

6. Metodika

6.1. Odběry semeníků

Odběry zralých semeníků v NPP Pastviště u Fínů probíhaly v letech 2019, 2020 a 2021. V roce 2019 byly provedeny dva odběry, neboť nepříznivé počasí na konci září opozdilo fenologický vývoj rostlin. První odběr se uskutečnil 23.09.2019 při polojasné až oblačné obloze, s vyšší vlhkostí vzduchu, mírného vánku a teplotě 19 °C. Druhý odběr probíhal 03.10.2019 po dešti se zataženou oblohou a teplotou 10 °C. Během tohoto odběru byly odebrány zralé semeníky, které byly určeny na pokus v in situ podmínkách. Celkem bylo odebráno 35 semeníků. V následujícím roce 2020 byl odběr proveden až 03.10.2020, jelikož průběh počasí druhé poloviny září byl deštivý a chladný. Odběr proběhl těsně před dešťovou přeháňkou, při zatažené obloze, mírném vánku a teplotě 18 °C. Při tomto odběru bylo odebráno 27 semeníků. V roce 2021 byly díky zpomalenému fenologickému vývoji opět provedeny dva odběry. První odběr probíhal 04.10.2021 při oblačné obloze, po dešťové přeháňce a teplotě 18 °C. Druhý odběr proběhl 09.10.2021 při skoro jasné obloze, 12 °C a 99% vlhkosti vzduchu. Dohromady bylo odebráno 41 semeníků.

Odběry zralých semeníků v NPP Švařec byly odebrány v roce 2019 a 2021. Semeníky z roku 2020 nemohly být z důvodu nemoci odebrány. V roce 2019 probíhal odběr na této lokalitě 14.09.2019 při skoro jasné obloze a 17 °C. Celkem bylo odebráno 36 semeníků. A v roce 2021 odběr proběhl 11.09.2021. Tento odběr proběhl při oblačné obloze při 24 °C a 95% vlhkosti vzduchu. Odebráno bylo 30 semeníků.

Zralé semeníky byly odebrány ve fázi vývoje, kdy již změnily svou barvu a byly těsně před puknutím nebo se nacházely přímo nad již otevřeným semeníkem. Pomocí pinzety byl semeník obezřetně uchopen a malými nůžkami odstříhnut od stvolu. Semeníky byly poté uloženy do papírové obálky, která byla umístěna přímo pod semeníkem. Tím se zajistila bezpečnost, kdyby se při odběru semena ze semeníku uvolnila. Z každé



Obr. 9: Zralost semeníků těsně před jejich odběrem (Panská 2021).

rostliny byly odebrány jeden až tři semeníky podle možností jednotlivých rostlin. Obálky se semeníky byly uloženy v papírové krabici, která musela zajišťovat prodyšnost a chránila semena proti vyfouknutí z papírových obálek. Tato krabice byla uložena v suchu a ve tmě, kde došlo k dozrání semeníků (Ponert et al. 2011).

Tab. 1: Počet odebraných semeníků z jednotlivých lokalit v jednotlivých letech.

Lokalita	2019	2020	2021
Pastviště u Fínů	35	27	41
Švařec	36	–	30

6.2. In situ – klíčení a přežívání semenáčků na lokalitě

V NPP Pastviště u Fínů byl proveden pokus klíčení semen v in situ podmínkách. Na výsev byla použita semena, která byla odebrána den předem (03.10.2019) z náhodně vybraných semeníků z lokality. Pomocí binokulární lupy byla semena spočítána a rozdělena. Semena o počtu 500 ± 50 ks byla umístěna do síťoviny uhelon s velikostí ok 42 μm , která zabraňovala semenům uvolnění ze síťoviny, ale zároveň umožňovala průnik půdním bakteriím, organismům a houbovým hyfám (Rasmussen & Whigham 1993). Následně byla síťovina přeložena a připevněná do diapozitivu podle metodiky Rasmussen & Whigham (1993).

Dne 04.10.2019 byly na lokalitě založené tři pokusné plochy o velikosti 4×4 m. Tyto plochy se nacházely v místech nejhojnějšího výskytu jedinců *Spiranthes spiralis*, které je během monitoringu pracovně nazývané švihlíkoviště.

- Pokusná plocha č. 1 se nacházela ve střední části švihlíkoviště na suchém stanovišti s hojným výskytem *Spiranthes spiralis*. Této ploše dominuje nízkostébelný květnatý porost svazu *Violion canine* s celkovou půdní pokryvností 95 %. S převahou trav a velmi hojným výskytem mateřídoušky vejčité (*Thymus pulegioides*). Hodnota pH na této ploše činí 5,14.
- Pokusná plocha č. 2 byla umístěná v dolní části švihlíkoviště v mezickém biotopu se svazem *Violion canine* s výskytem nízkých otav (5–11 cm), hojným zastoupením trav, jetele a mateřídoušky vejčité (*Thymus pulegioides*) s nejvyšší celkovou půdní pokryvností 98 % a s hodnotou pH 5,13.
- Pokusná plocha č. 3 se nacházela v horní části švihlíkoviště na vyprahlém stanovišti s výskytem krátkostébelného porostu a převahou kostřavy ovčí (*Festuca ovina*) a psinečku obecného (*Agrostis capillaris*) s celkovou půdní

pokryvností pouze 60 % a hodnotou pH 5,19. Tato plocha jako jediná obsahuje fosfor v hodnotách, které jsou pro přístroj měřitelné. Dále obsahuje více než dvojnásobné hodnoty draslíku a vápníku a jako jediná neobsahuje množství uranu, který dokáže přístroj změřit (Panská 2020).



Obr. 10: Rozmístění jednotlivých pokusných ploch v severní části NPP Pastviště u Finů (Mapy.cz 2020).

Každý diarámeček byl označen číslem plochy a umístil se na něj vlasec. Na lokalitě se vlasec navléknul na neoznačený hřeb s podložkou a zapravil se do půdy pomocí ploché motyčky ve vzdálenosti 45–188 cm od jedinců *Spiranthes spiralis*. Na jednotlivé plochy byly rozmístěny celkem čtyři diarámečky v párech naproti sobě přibližně pod úhlem 75°. Semena v síťovině byla přibližně 4 cm hluboko pod zemí (Ipser 2012). Celkem na lokalitě bylo umístěno 12 diapozitivů. Všechny diarámečky byly hromadně odebrány 13.05.2021.

6.3. Ex situ – in vitro kultivace

Výsev semen byl proveden na kultivační médium v Petriho miskách o průměru 90 mm. Před samotným výsevem bylo třeba připravit kultivační médium. Jeho hlavním základem bylo použito BM-1 Terrestrial Orchid Medium (složení viz tab.2.) z PhytoTechnology Laboratories. Toto živné médium bylo speciálně vytvořeno pro terestrické orchideje a obsahuje hydrolyzát kaseinu, který umožňuje lepší klíčení a vývoj protokormů a semenáčků (HiMedia 2022). Toto médium bylo doplněno o 0,5 mg/l kinetinu podporující buněčné dělení, 1 g/l MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic Acid Monohydrate) jako pufr, 5 g/l gerlitu pro zpevnění média a 20 g/l sacharózy.

Tab. 2: Složení média BM – 1 Terrestrial Orchid Medium (HiMedia 2022).

Makroprvky		
dihydrogenfosforečnan draselný	KH_2PO_4	300 mg/l
síran hořečnatý	MgSO_4	100 mg/l
Mikroprvky		
dihydrát EDTA disodný	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{10}$	37,25 mg/l
heptahydrát síranu železnatého	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,85 mg/l
monohydrát síranu manganatého	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	25 mg/l
kyselina boritá	H_3BO_3	10 mg/l
heptahydrát síranu zinečnatého	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
dihydrát molybdenanu sodného	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,213 mg/l
hexahydrát chloridu kobaltnatého	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg/l
pentahydrát síranu měďnatého	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg/l
Vitamíny		
myo-Inositol		100 mg/l
niacin		5 mg/l
kyselina listová		0,5 mg/l
pyridoxin (B6)		0,5 mg/l
thiamin		0,5 mg/l
biotin		0,05 mg/l
Aminokyseliny		
glutamin		100 mg/l
glycin		2 mg/l
Ostatní prvky		
sacharóza		20 000 mg/l
kasein		500 mg/l

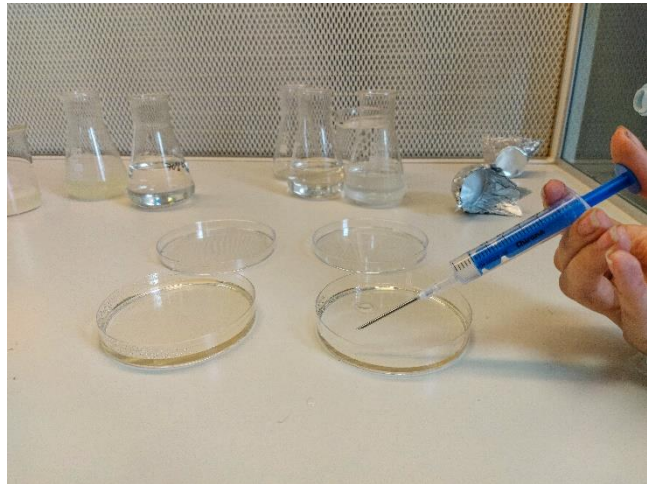
Hodnota pH roztoku byla snížena pomocí hydroxidu draselného (KHO, 1-molární roztok) nebo zvýšena pomocí chloridu draselného (KCl, 0,1-molární roztok) tak, aby pH dosahovalo hodnot 5,70–5,75. Roztok živného média byl přelit do uzavíratelných skleněných lahví o objemu 500 ml. Obsah média v jednotlivých lahví dosahoval 400 ml. Tyto skleněné lahve byly uzavřeny a vloženy do parního sterilizačního přístroje, kde při teplotě 121 °C po dobu 25 minut proběhla sterilizace roztoku. Po uplynutí této doby byl roztok kultivačního média přelit do Petriho misek. Do každé misky přišlo 25 ml roztoku. Pro zajištění sterility prostředí rozlévání probíhalo v laminárním boxu s horizontálním prouděním vzduchu. Poté, co živné

médium v Petriho miskách vychladlo, byly misky buď použity k výsevu, nebo se vložily do polyethylenových sáčků a nechaly se uložené ve tmě až do doby, než byly využité pro výsev semen (Ponert et al. 2013).

Výsevy semen z lokality Pastviště u Fínů probíhaly 21.11.2019, 21.07.2021 a 16.11.2021. Semena z oblasti Švařec byla vyseta 25.09.2019 a 17.11.2021. K výsevu byly použité injekční stříkačky o objemu 5 ml, které byly opatřené nylonovým filtrem s okem 0,42 μm a injekční jehlou o velikosti 1,2 \times 40 mm s odejmutým pístem. Do takto připravené injekční stříkačky byly pomocí složeného papíru nasypána semena, která byla uvolněná ze semeníků a vyčištěná od nežádoucích organických nečistot. Pokud bylo z matečné rostliny odebráno více semeníků, byl v Petriho misce vytvořen homogenizovaný vzorek, který byl následně přesypán na složený papír. Po vysypání semen do injekční stříkačky byl navrácen a zatlačen její píst. Nejprve byl do injekční stříkačky nasát 1 ml 70% lihu, který se nechal působit jednu minutu. Při každé aplikaci roztoku byla semena protřepána. Po uplynutí této doby byl líh ze stříkačky odstraněn a semena byla třikrát promyta v 1 ml demineralizované vody. Poté byl do injekční stříkačky nasát 1 ml roztoku chlornanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), který obsahoval 10 g chlorového vápna na 50 ml demineralizované vody. Tento roztok byl po uplynutí 20 minut přefiltrován pomocí filtračního papíru do nové baňky. Roztok chlornanu vápenatého se nechal na semena působit po dobu 5 minut. Po této době byla semena opět třikrát promyta 1 ml demineralizované vody. Následně byl opět (počtvrté) nasát 1–1,5 ml demineralizované vody, který se v injekční stříkačce ponechal. Ihned následovalo sejmutí injekční jehly s nylonovým filtrem a došlo k jejímu nahrazení větší, sterilní injekční jehlou o rozměrech 1,6 \times 40 mm. Pomocí pístu stříkačky byla semena s opatrností rovnoměrně vytlačena na živná média ve sterilních Petriho miskách. Přebytná voda byla vstřebána živným médiem (Ponert et al. 2011; Ponert et al. 2013). Z každé rostliny byly vyšetě tři Petriho misky. Pokud množství semen nebylo dostatečné, výsev proběhl pouze na dvě misky. Tyto misky se uzavřely a byly utěsněny pomocí dvojité vrstvy parafínové pásky Parafilm M, která je propustná pro vzduch (Ponert et al. 2013). Petriho misky s vyšetými semeny byly umístěné do kultivačních boxů s teplotou 22 ± 1 $^\circ\text{C}$ a byly udržované 24 hodin ve tmě. Celý výsev probíhal sterilně ve flow-boxu s laminárním prouděním vzduchu (Ponert et al. 2011).



Obr. 11: Příprava injekční stříkačky a semen před jejich výsevem (Panská 2021).



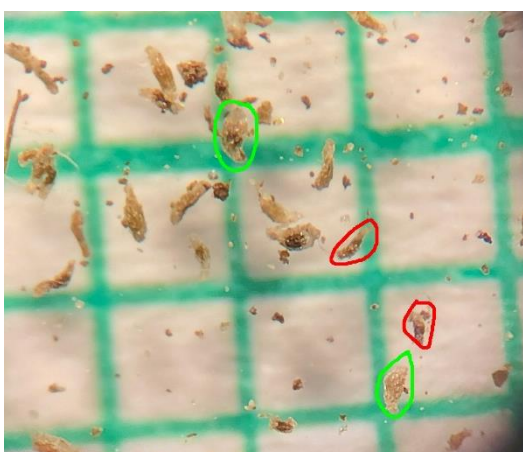
Obr. 12: Výsev semen do Petriho misky (Panská 2021).

6.4. Klimatologické údaje

Ke zpracování byly použity údaje o minimální, průměrné a maximální denní teplotě a denní úhrny srážek od 19.08 do 25.09. pro NPP Švařec a do 10.10. pro NPP Pastviště u Fínů. Pro lokalitu Pastviště u Fínů byla použita data amatérské meteorologické stanice Chotěšov nacházející se v 700 m n. m. (Hosnedl 2022). Od lokality je vzdušnou čarou vzdálená 16,5 km. Celkový roční úhrn srážek byl převzat z dat Českého hydrometeorologického ústavu z meteorologické stanice Sušice, nacházející se 484 m n. m. (ČHMÚ 2022a), která je od lokality vzdálená vzdušnou čarou 4,5 km. Pro lokalitu Švařec byly za rok 2019 použity volně dostupné údaje z Českého hydrometeorologického ústavu. Tato data pocházela z meteorologické stanice Bystřice nad Pernštejnem z nadmořské výšky 553 m n. m. (ČHMÚ 2022b). Klimatická data z roku 2021 byla použité z amatérské meteostanice Bystřice nad Pernštejnem. Meteostanice je umístěná v 534 m n. m. (Horníček 2022) a od lokality NPP Švařec je vzdušnou čarou vzdálená necelých 7 km. Celkový roční úhrn srážek pro lokalitu Švařec byl taktéž převzat z dat meteorologické stanice ČHMÚ Bystřice nad Pernštejnem (ČHMÚ 2022a).

6.5. Zpracování dat

Diarámečky byly 14.05.2021 po vyjmutí z půdy promyty vodou a nechaly se volně na vzduchu uschnout. Následně došlo k rozebrání jednotlivých diarámečků a vyčištění síťoviny pomocí pinzety od organických a větších anorganických zbytků. Poté byla semena štětečkem přemístěna na Petriho misku. Miska byla umístěna na milimetrový papír pod binokulární lupu. Po přiblížení 1× byly počítané a vyhodnocené počty klíčících, neklíčících semen a zaznamenané případné protokormy do celkového počtu 200 semen.



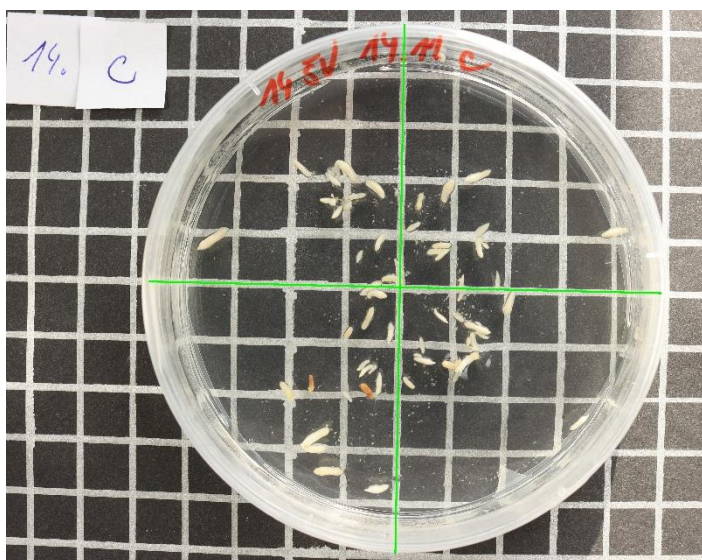
Obr. 13: Označení stavu klíčících semen v in situ podmínkách. Zeleně označená klíčící semena, červeně neklíčící semena (Panská 2021).



Obr. 14: Protokorm s houbovým myceliem (Panská 2021).

Fotodokumentace Petriho misek s klíčícími semeny probíhala v rozmezí 12–14 týdnů od výsevu semen. Konkrétně se jednalo o dny 03.12.2019, 26.02.2020 a 15.02.2022. K první a druhé fotodokumentaci byl využit fotoaparát Olympus při nejvyšším rozlišení 12 Mpx, při poslední fotodokumentaci byl použit fotoaparát Canon EOS 90D s rozlišením 32,5 Mpx a ohniskovou vzdáleností 35 mm. Jednotlivé Petriho misky byly položeny na černý papír se čtvercovou sítí, kde jeden čtverec představoval 1 cm². Pomocí programu IrfanView 64 byly jednotlivé Petriho misky rozděleny na čtyři pravidelné části. Následně byla každá část zvětšena o 165 % za účelem detailního rozpoznání stavu klíčení jednotlivých semen. V jednotlivém kvadrantu se postupovalo od středu Petriho misky a postupně se spočítala a označila klíčící semena zelenou barvou a neklíčící semena červenou barvou. Takto se v jednotlivém kvadrantu postupovalo dále až do celkového součtu 100 semen. Údaje o stavu a počtech semen v určitém kvadrantu se ručně zaznamenaly do programu Microsoft Excel s označením rostlin. V Petriho misce se tímto způsobem pokračovalo i ve zbylých kvadrantech. Následně ze zjištěných hodnot byly

vyhodnoceny průměrné hodnoty klíčících a neklíčících semen pro konkrétní rostliny. Poté byly doplněny hodnoty fitness parametrů z příslušného monitoringu (Pastviště u Fínů) nebo z terénního šetření při odběru semeníků (Švařec). Mezi fitness parametry se zahrnuje výška stvolu, počet květů a počet nově tvořících růžic. Na lokalitě Pastviště u Fínů je navíc posuzován typ biotopu výskytu rostlin dle vlhkostních poměrů stanoviště (mezické, suché, vyprahlé) a z lokality Švařec počet listů v listové růžici.



Obr. 15: Znárodnění rozdělení Petriho misky s klíčovými semeny 13 týdnů od výsevu (Panská 2019).



Obr. 16: Označení stavu klíčících semen v ex situ podmínkách. Zeleně jsou označena klíčící semena a červeně neklíčící semena (Panská 2022).

6.6. Vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení jednotlivých proměnných bylo provedeno v programu Statistica. V této práci byla porovnávána závislost klíčivosti semen v rozmezí 12–14 týdnů od výsevu na typ biotopu, výšku stvolu, počtu květů, počtu růžic a počtu listů z lokality NPP Pastviště u Fínů a NPP Švařec. Porovnány byly roky 2019 a 2021. A následně byly porovnány i obě lokality mezi sebou. Data z roku 2020 nebyla statisticky vyhodnocována, neboť žádná semena nevyklíčila. Pouze byla použita k porovnání klíčivosti semen na lokalitě Pastviště u Fínů v průběhu sledovaných let. Data týkající se výšky stvolu, počtu květů, počtu růžic a počtu listů byla porovnávána využitím regresní a korelační analýzy (regresní přímka, p-hodnota, R^2). Z těchto proměnných byly vytvořeny bodové grafy. K porovnání vlivu biotopu a vyhodnocení in situ výsevu byla použita vícefaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Pro znázornění rozdílů byly z proměnných vytvořené krabicové grafy. Rozdíly mezi jednotlivými lety a lokalitami byly taktéž znázorněny pomocí krabicových grafů.

Klimatologické údaje byly zpracovány pomocí kombinovaného grafu. Tento graf zahrnoval sloupcový a spojnicový graf. Pomocí sloupcového grafu byl znázorněn denní úhrn srážek a pomocí spojnicového grafu průběžná teplota během dne. Dále byly z dostupných hodnot zjištěny průměrné denní teploty a celkový úhrn srážek za sledované období a celkový roční úhrn srážek.

7. Výsledky

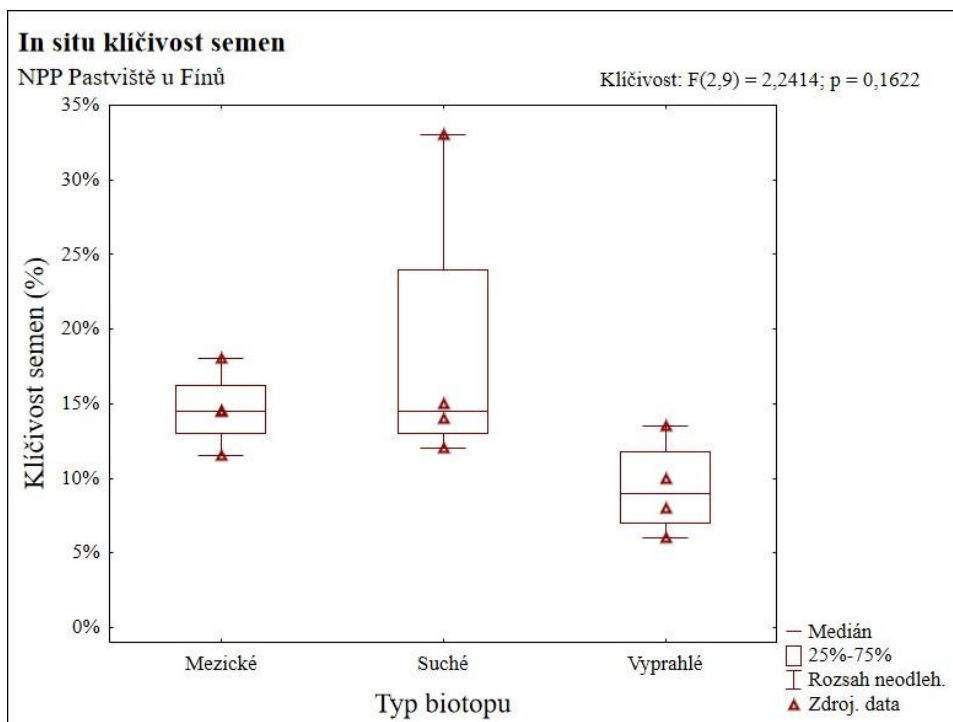
Ke zjištění statistické závislosti procentuální hodnoty klíčivosti semen na fitness matečné rostliny a jejího biotopu byla stanovena hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Tato hodnota potvrzuje výsledek s 95% pravděpodobností.

Stanovené hypotézy:

- H0: klíčivost nezávisí na fitness matečné rostliny (či typu biotopu)
- H1: klíčivost závisí na fitness matečné rostliny (či typu biotopu)

7.1. In situ – klíčení a přežívání semenáčků na lokalitě

Testovanou závisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen 1,5 roku od výsevu na lokalitě NPP Pastviště u Fínů, nezávisle proměnnou byla zvolena pokusná plocha, která byla rozdělena dle typu biotopu (mezické, suché a vyprahlé). Mezi jednotlivými biotopy nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v klíčivosti semen (ANOVA $F(2;9) = 2,2414$; p-hodnota = 0,1622). Nejméně klíčících semen bylo na vyprahlém stanovišti, kde byla maximální klíčivost zjištěna 13,5 % (medián = 9 %), průměrná hodnota klíčících semen dosahovala 9 %. Naopak nejvíce klíčících semen se vyskytovalo na suchém stanovišti, kde byla maximální klíčivost 33 % (medián = 14,5 %), průměrná hodnota dosahovala 19 %. Nepatrně méně jich klíčilo na mezickém biotopu, kde byla zjištěna maximální klíčivost 18 % (medián = 14,5 %), průměrná hodnota 15 %. Každý biotop má pouhá čtyři opakování (viz graf č. 2).



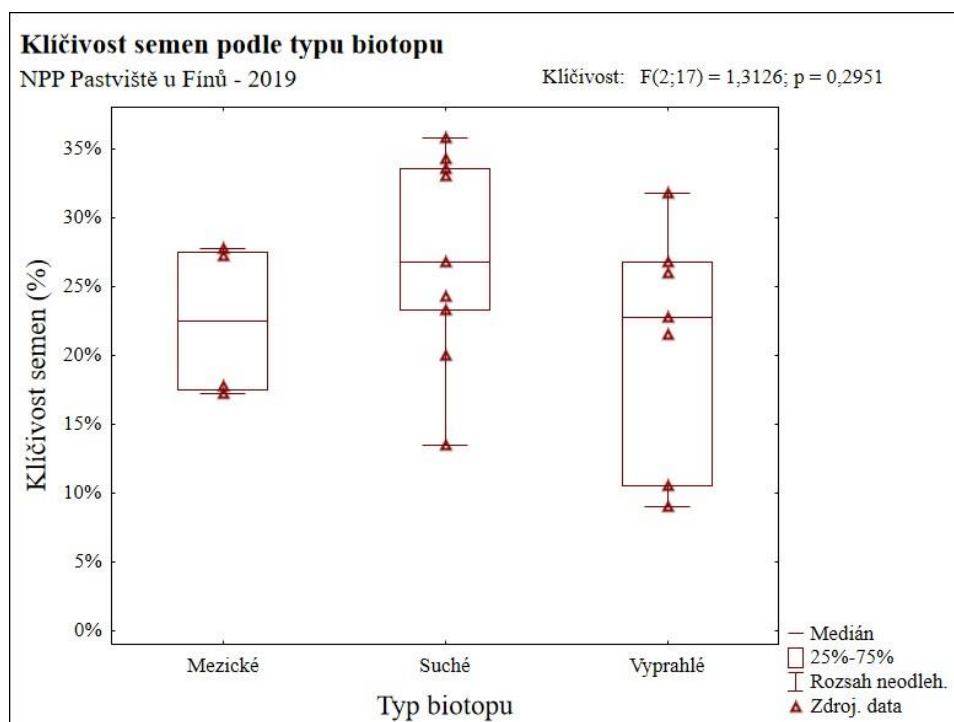
Graf. 2: Krabicový graf, ve kterém je porovnán typ biotopu s procentuální hodnotou klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* z lokality NPP Pastviště u Finů v in situ podmínkách. Čára v grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Dále je zobrazen rozsah hodnot a pomocí trojúhelníku označená zdrojová data.

7.2. Ex situ – in vitro kultivace

7.2.1. NPP Pastviště u Fínů

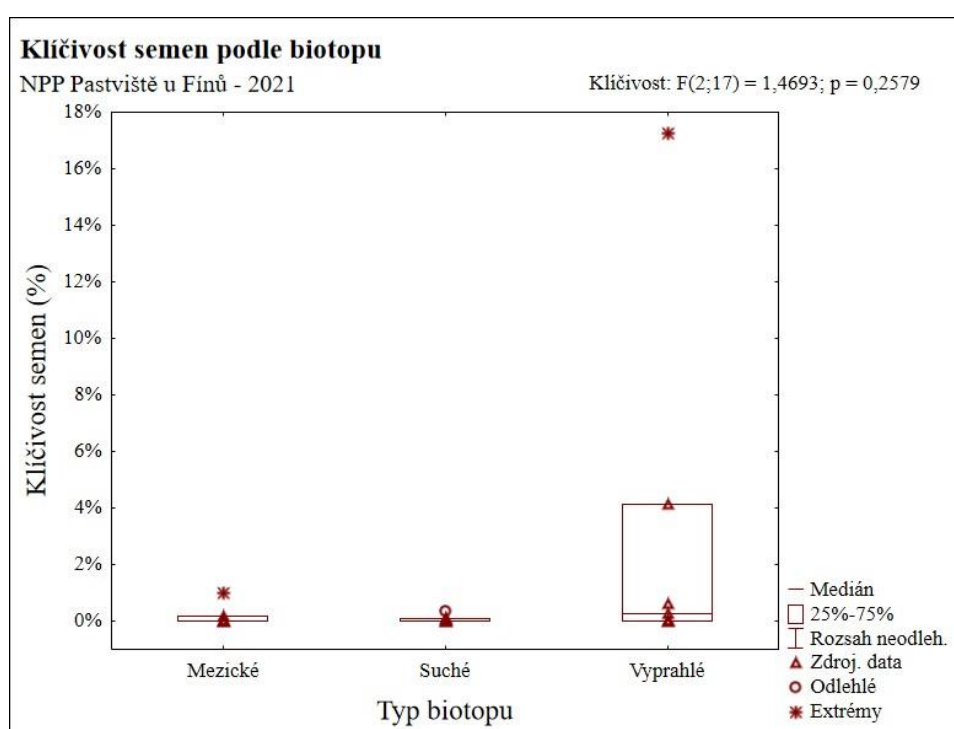
7.2.1.1. Vliv typu biotopu na klíčivost semen

Testovanou závisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen z roku 2019 po 12 týdnech od výsevu, nezávisle proměnnou byl zvolen typ biotopu. Mezi jednotlivými biotopy nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v klíčivosti semen (ANOVA $F(2;17) = 1,3126$; p -hodnota = 0,2951). Nejvíce klíčících semen se vyskytovalo na suchém stanovišti, kde byla maximální klíčivost zjištěna 35,8 % (medián = 26,8 %) a průměrná hodnota činila 23 %. Méně klíčících semen se vyskytovalo na vyprahlém stanovišti, kde byla maximální klíčivost zjištěna 31,8 % (medián = 22,8 %) a průměrná hodnota 22 %. Nejméně klíčících semen se vyskytovalo na mezickém stanovišti, kde byla maximální klíčivost zjištěna 27,8 % (medián = 22,5 %) a průměrná hodnota činila 25,25 %. Ačkoliv minimální a maximální hodnoty klíčivosti semen na jednotlivých biotopech byly rozdílné, mediánové hodnoty byly zjištěny obdobné. Hodnoty mohou být zkreslené z důvodu rozdílného počtu opakování (graf č. 3).



Graf. 3: Krabicový graf zobrazuje vliv biotopu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* z lokality NPP Pastviště u Fínů z roku 2019. Čára grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Pomocí trojúhelníků jsou znázorněná zdrojová data. Také je zde zobrazen rozsah hodnot.

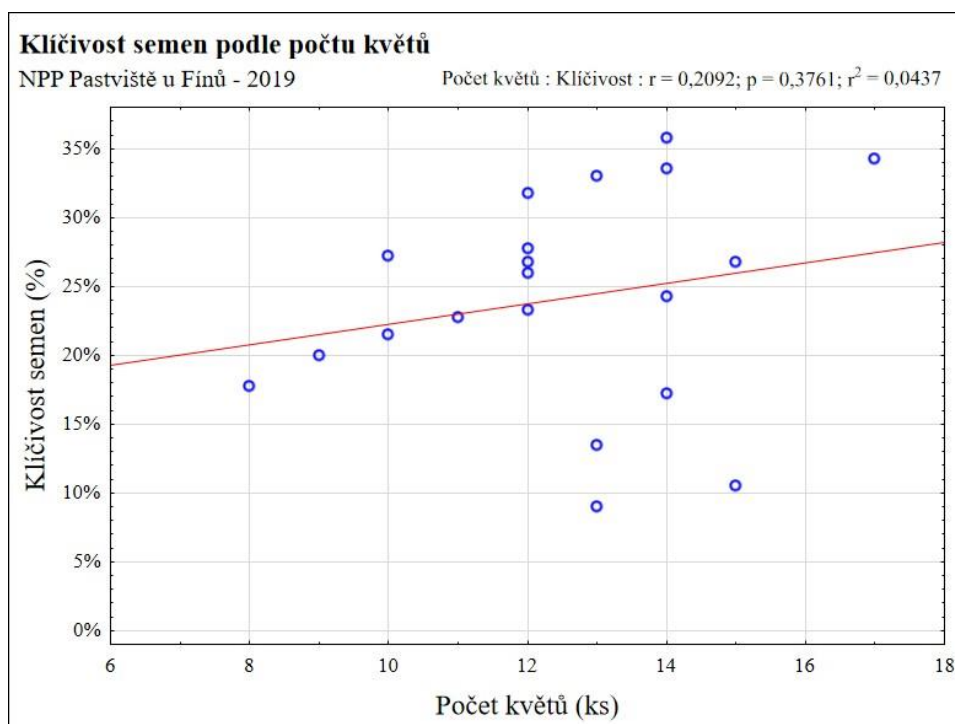
Testovanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2021 po 13 týdnech od výsevu, nezávisle proměnnou byl zvolen typ biotopu. Mezi jednotlivými druhy biotopů nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly ($F(2;17) = 1,4693$; p -hodnota = 0,2579). Na všech biotopech semena téměř neklíčila (viz graf č. 4). Nejvyšší podíl zastoupení klíčících semen se vyskytoval na vyprahlém biotopu, kde byla maximální hodnota klíčivosti zjištěna 4,1 % (medián = 0,3 %). Nejnižší podíl zastoupení klíčících semen se vyskytoval na suchém stanovišti, kde byla maximální hodnota klíčivosti semen zjištěna 0,08 % (medián = 0 %). Na mezickém stanovišti dosahovala maximální klíčivost 0,2 % (medián = 0 %).



Graf. 4: Krabicový graf zobrazuje vliv biotopu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2021 z NPP Pastviště u Finů. Pomocí boxu je znázorněn první a třetí kvartil, čára v boxu znázorňuje medián. Dále je zobrazen rozsah hodnot, pomocí kolečka jsou zobrazeny odlehle hodnoty a hvězdičkou extrémní hodnoty.

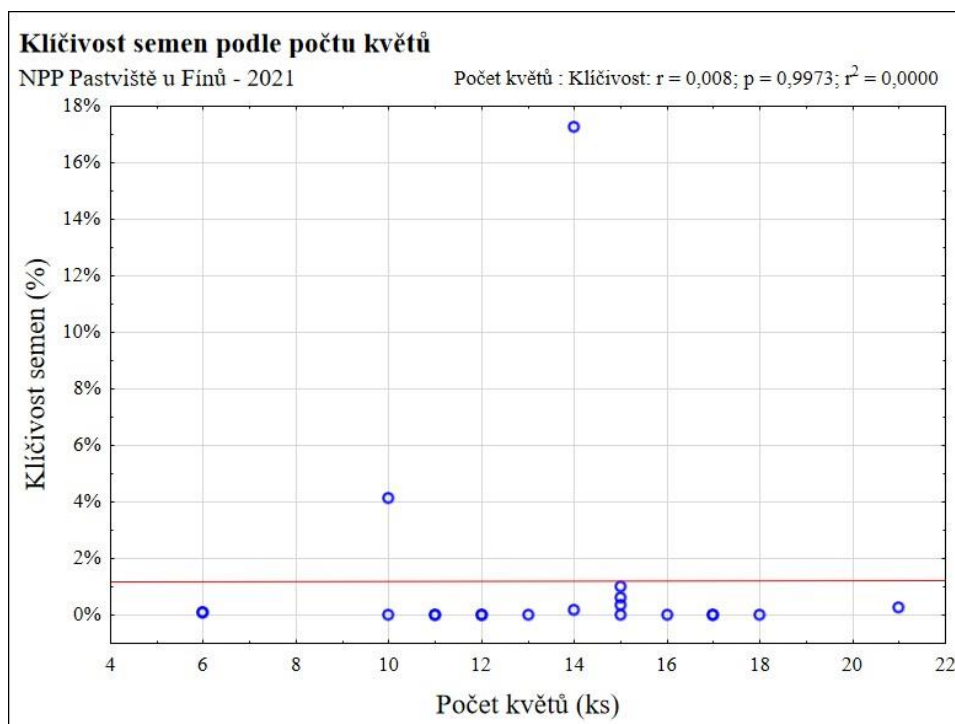
7.2.1.2. Vliv počtu květů na klíčivost semen

Statisticky vyhodnocovanou závisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen z roku 2019 a nezávisle proměnnou byl zvolen počet květů matečné rostliny. Testování závislosti bylo provedeno využitím regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že počet květů nemá významný vliv na klíčení semen (p -hodnota = 0,3761; $R^2 = 0,0437$). Nejvyšší četnost klíčících semen byla u 12 a 14 květů, u kterých byla zaznamenána i nejvyšší klíčivost (36 %).



Graf. 5: Bodový graf znázorňuje ovlivnění procentuální klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* z NPP Pastviště u Finů z roku 2019 počtem květů. Body byla proložena regresní přímkou (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

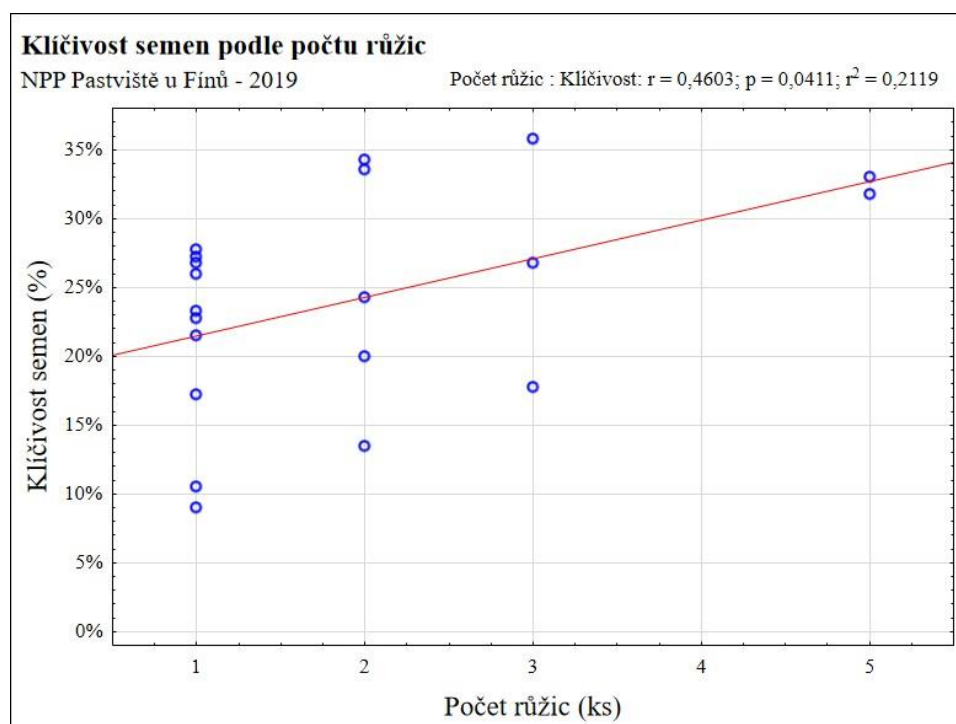
Statisticky testovanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální klíčivost semen z roku 2021 a nezávisle proměnnou byl zvolen počet květů. Testování závislosti bylo provedeno využitím regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že počet květů nemá významný vliv na klíčení semen (p -hodnota = 0,9973; $R^2 = 0,0000$). Většina hodnot se pohybuje v těsné blízkosti nuly (graf č. 6). Nejvyšší četnost klíčících semen byla u patnácti květů na stvolu, nejvyšší hodnota byla zaznamenána u 14 květů (17 %).



Graf. 6: Bodový graf zobrazuje závislost klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* z lokality Pastviště u Finů z roku 2021 na počtu květů. Grafem byla proložena regresní přímka a pomocí ní vytvořena lineární regrese, testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

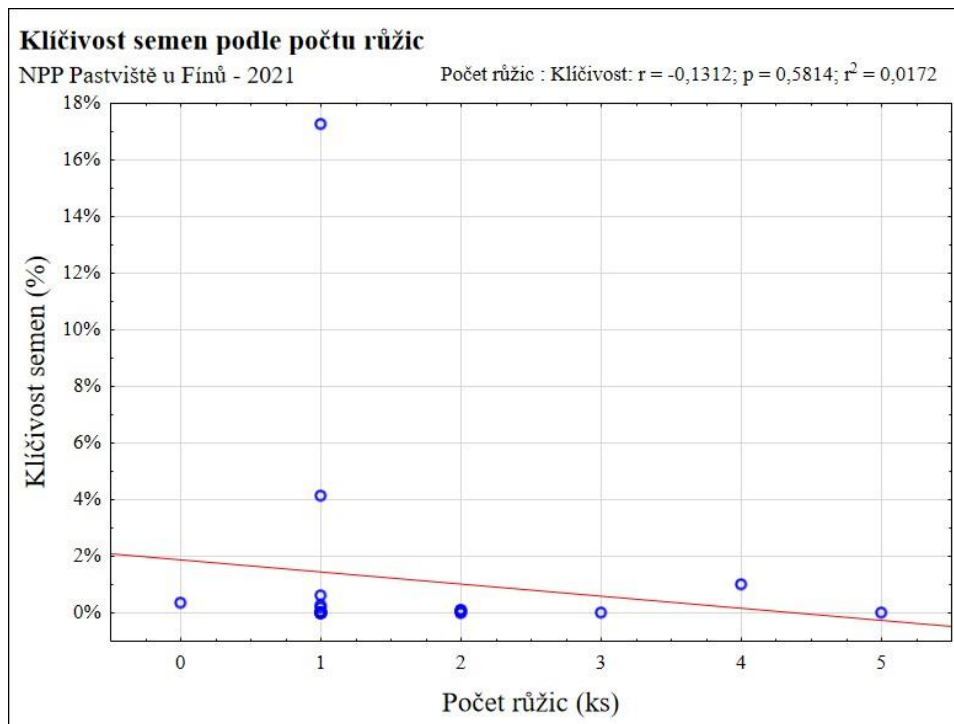
7.2.1.3. Vliv počtu růžic na klíčivost semen

Ke statistickému vyhodnocení byla jako závisle proměnnou zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2019 a nezávisle proměnnou byl zvolen počet listových růžic. Využitím regresní a korelační analýzy byla na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ prokázána lineární závislost klíčivosti semen na počtu růžic (p-hodnota = 0,0411; $R^2 = 0,2119$). S 95% pravděpodobností lze tvrdit, že klíčivost semen je z 21,19 % ovlivněna počtem růžic matečné rostliny. Rostliny se třemi růžicemi mají vyšší podíl klíčících semen, než má jedna růžice. Dvě růžice taktéž vykazují vyšší hodnoty klíčivosti než jedna růžice (viz. graf č. 7).



Graf. 7: Bodový graf znázorňuje vliv počtu listových růžic na klíčivost semen odebraných v roce 2019 z NPP Pastviště u Finů. Body byla proložena regresní přímkou (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

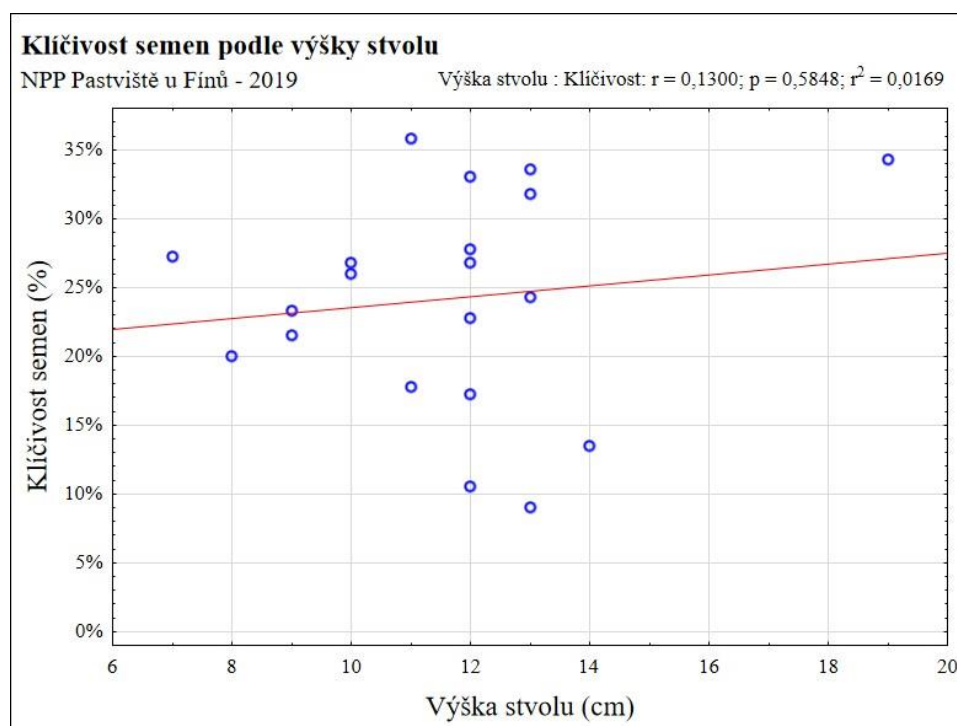
Statisticky vyhodnocovanou závisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen z roku 2021 a nezávisle proměnnou byl zvolen počet listových růžic. Testování závislosti bylo provedeno pomocí regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že počet listových růžic nemá významný vliv na klíčení semen (p -hodnota = 0,5814; $R^2 = 0,0172$). Nejvyšší četnost a zároveň i nejvyšší klíčivost semen byla zaznamenána u rostlin s jednou listovou růžicí (viz. graf č. 8).



Graf. 8: Bodový graf znázorňuje závislost procentuální hodnoty klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* na počtu růžic ze semen odebraných v roce 2021. Do grafu byla vložena regresní přímka (lineární regrese). Testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

7.2.1.4. Vliv výšky stvolu na klíčivost semen

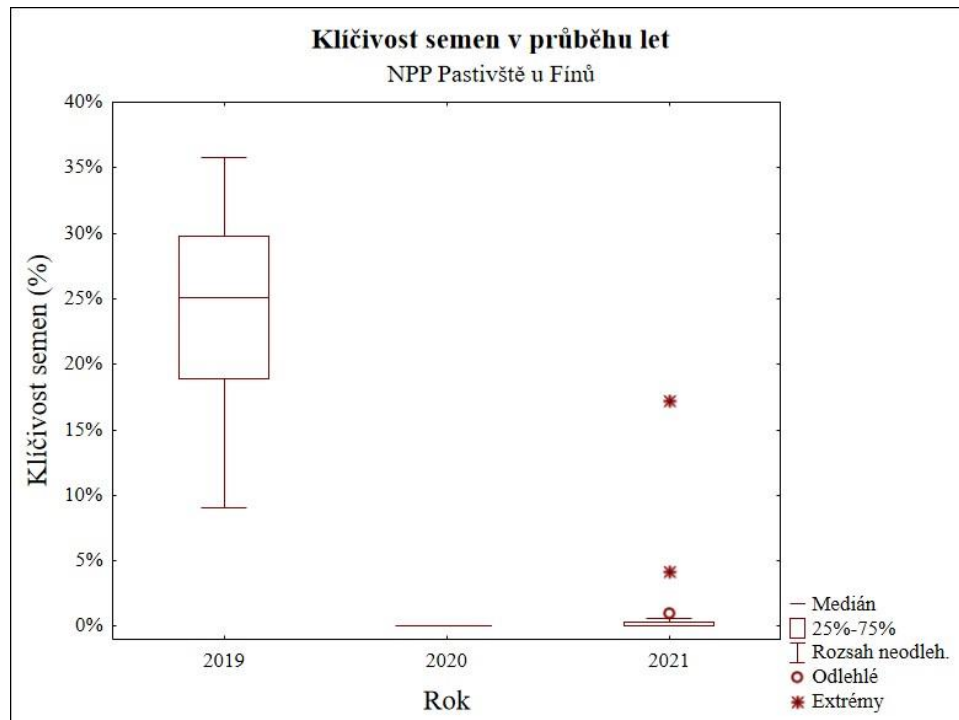
Testovanou závisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen z roku 2019, nezávisle proměnnou byla zvolena výška květonosného stvolu matečné rostliny. Testování závislosti bylo provedeno využitím regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že výška stvolu nemá významný vliv na klíčení semen (p -hodnota = 0,5848; $R^2 = 0,0169$). Nejvyšší četnost klíčících semen byla u výšky 12 cm. Nejvyšší hodnota klíčivosti semen 36 % byla zaznamenána u výšky 11 cm (graf č. 9).



Graf. 9: Bodový graf zobrazuje vliv výšky květonosného stvolu na procentuální klíčivost semen odebraných v roce 2019 na lokalitě Pastviště u Finů. Grafem byla proložena regresní přímka znázorňující lineární regresy, jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

7.2.1.5. Porovnání klíčivosti semen během let

Porovnanou závisle proměnnou byla procentuální hodnota klíčivosti semen a nezávisle proměnnou byly zvoleny hodnoty klíčivosti semen z let 2019, 2020 a 2021. Bylo zjištěno, že nejvyšší klíčivost semen byla zaznamenána v roce 2019, kdy maximální klíčivost semen byla 35,8 % (medián = 25,1 %). V roce 2020 byla po 14 týdnech od výsevu zjištěna nulová klíčivost semen. Maximální hodnota klíčivosti semen v roce 2021 byla zjištěna 0,6 % (medián = 0 %) (graf č. 11).



Graf. 11: Krabicový graf znázorňuje procentuální klíčivost semen *Spiranthes spiralis* v jednotlivých sledovaných letech na lokalitě NPP Pastviště u Finů. Boxy znázorňují první a třetí kvartil, čára v těchto boxech znázorňuje medián. Dále je zde zobrazen rozsah hodnot, pomocí kolečka odlehle hodnoty a pomocí hvězdy extrémní hodnoty.

7.2.1.6. Klimatologické údaje

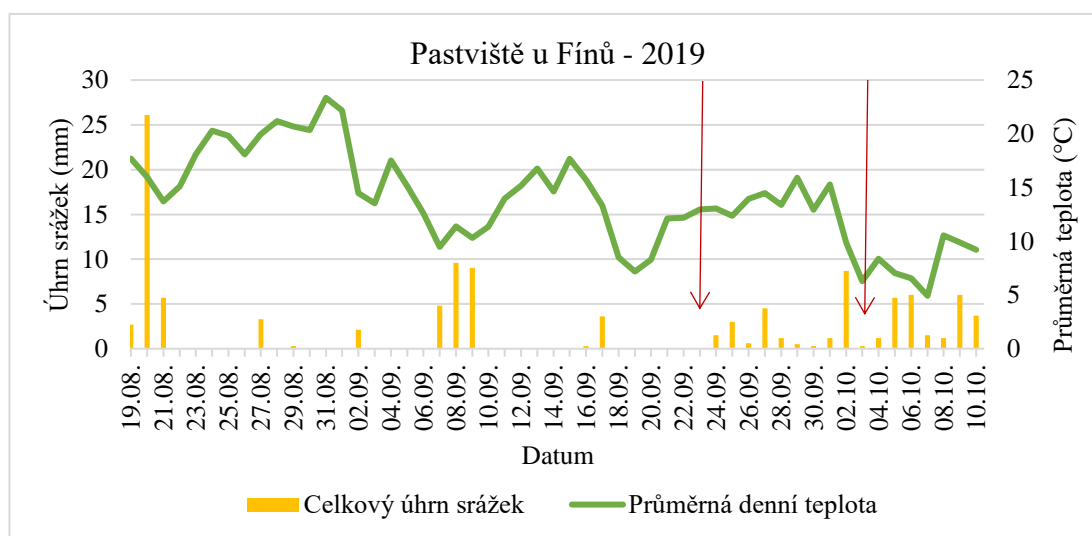
Průběh průměrné denní teploty a celkového úhrnu srážek od 19.08. do 10.10. v letech 2019, 2020 a 2021, které byly zaznamenány meteorologickou stanicí Chotěšov, jsou zobrazeny pomocí kombinovaného sloupcového a spojnicového grafu. Pomocí sloupcového grafu byl znázorněn denní úhrn srážek a pomocí spojnicového grafu byla znázorněna průměrná denní teplota za sledované období. Tabulka č. 3 přehledně zobrazuje průměrnou denní teplotu a celkový úhrn srážek za období 19.08.–10.10. v letech 2019, 2020 a 2021. Nejvyšší průměrná denní teplota byla naměřena v roce 2020, zároveň úhrn srážek byl v tomto roce nejnižší. Nejnižší denní teplota byla

naměřená v roce 2021 a nejvyšší celkový úhrn srážek byl v roce 2019. Rozdíly mezi naměřenými teplotami nejsou příliš významné. Nejvyšší roční úhrn srážek byl zaznamenán v roce 2020, nejnižší v roce 2019.

Tab. 3: Průměrná denní teplota a celkový úhrn srážek za sledované období v letech 2019, 2020 a 2021 pro NPP Pastviště u Fínů (Hosnedl 2022). Dále je zobrazen celkový roční úhrn srážek v letech 2019, 2020 a 2021 (CHMÚ 2022).

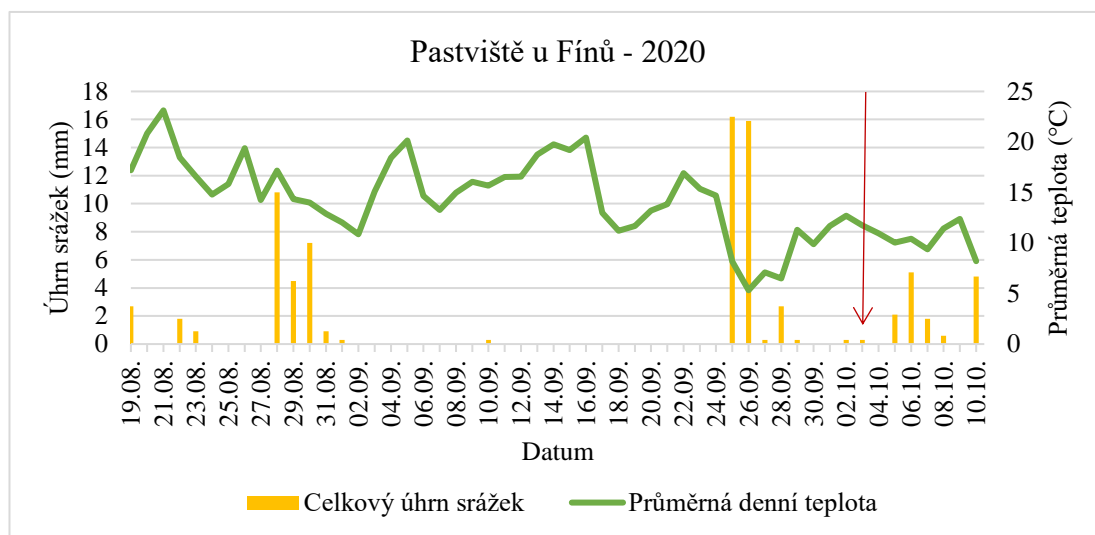
	2019	2020	2021
Průměrná denní teplota (srpen–říjen)	13,86 °C	14,12 °C	13,38 °C
Celkový úhrn srážek	114,6 mm	79,8 mm	90,6 mm
Celkový úhrn srážek za rok	517,8 mm	729,4 mm	687,6 mm

V roce 2019 nejvyšší naměřená průměrná denní teplota byla 23,4 °C dne 31.8. Nejnižší průměrná denní naměřená teplota byla 4,9 °C dne 07.10. Nejvyšší úhrn srážek činil 26,1 mm dne 20.08. (graf č. 12). Nejteplejší den v tomto sledovaném období byl 31.08. kdy naměřená teplota dosahovala 30 °C. Nejchladnější den 03.10. dosahovala nejvyšší denní teplota 8 °C. Absolutně nejnižší naměřená teplota 3 °C byla 20.09.



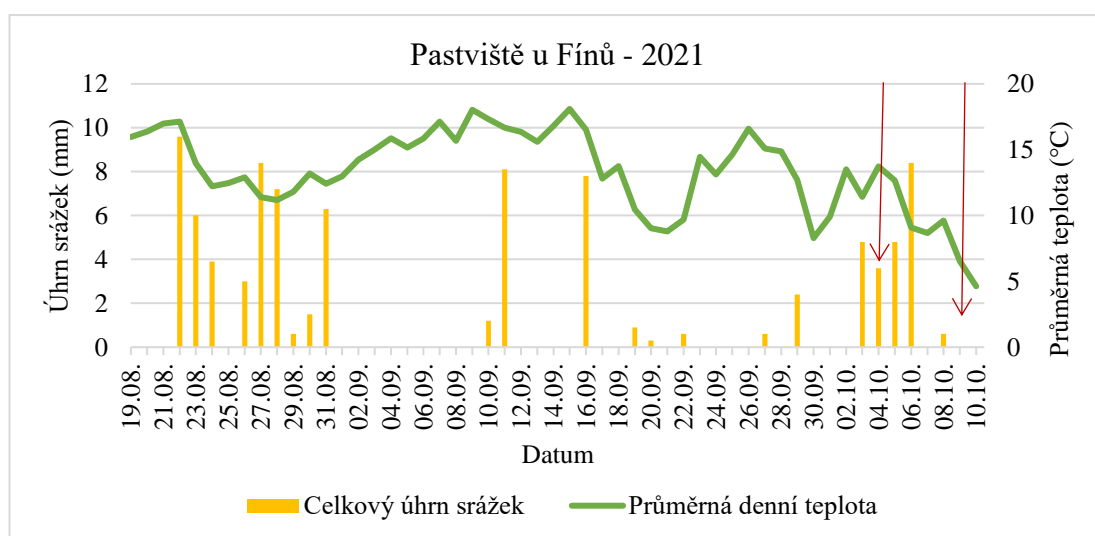
Graf. 12: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–10.10.2019. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipky zobrazují, kdy byly odebrány semínky (Hosnedl 2022).

V roce 2020 nejvyšší průměrná teplota 23,1 °C byla naměřena dne 21.08. Nejnižší průměrná teplota byla naměřena 26.09. a dosahovala 5,3 °C. Tento den byl nejstudenější, nejvyšší denní teplota dosáhla pouze 6 °C. Nejvyšší úhrn srážek 16,2 mm byl zaznamenán 25.09. Nejvyšší denní teplota 33 °C byla naměřena 21.08. Absolutně nejnižší teplota 3 °C byla naměřena 28.09 (graf č. 13).



Graf. 13: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–10.10.2020. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipka zobrazuje datum odběru semeníků (Hosnedl 2022).

V roce 2021 byla naměřena nejvyšší průměrná teplota 18,1 °C dne 15.09. Nejnižší průměrná denní teplota činila 10.10. 4,6 °C. Nejvíce srážek během dne spadlo 22.08. a to 9,6 mm. Nejvyšší naměřená denní teplota 27 °C byla naměřena 09., 14. a 26.09. Nejnižší naměřená teplota -1 °C byla zaznamenána 10.10.

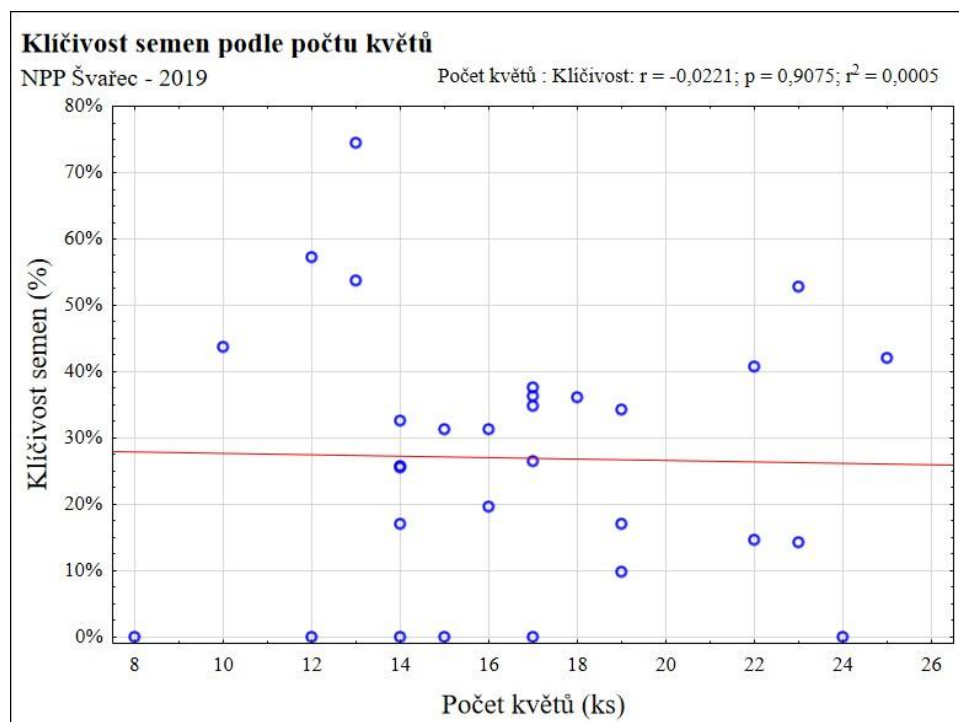


Graf. 14: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–10.10.2021. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipky zobrazují, kdy byly provedeny odběry semeníků (Hosnedl 2022).

7.2.2. NPP Švařec

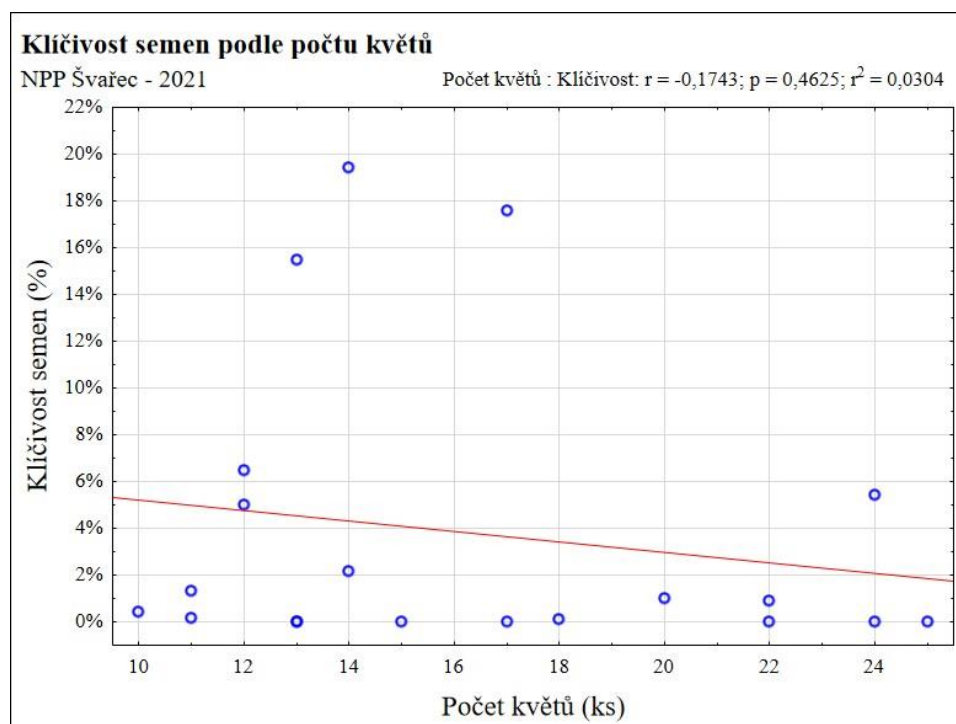
7.2.2.1. Vliv počtu květů na klíčivost semen

Statisticky vyhodnocovanou závisle proměnnou byla použita procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2019, 12 týdnů od výsevu, nezávisle proměnnou byl zvolen počet květů na květonosném stvolu. Testování závislosti bylo provedeno využitím regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že počet květů nemá významný vliv na klíčení semen (p -hodnota = 0,9075; $R^2 = 0,0005$). Nejvyšší četnost klíčících semen byla u 14 a 17 květů na stvolu. Nejvyšší klíčivost semen 75 % byla zaznamenána u 13 květů na stvolu (graf č. 15).



Graf. 15: Bodový graf znázorňuje vliv počtu květů na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* z lokality NPP Švařec z roku 2019. Body grafu byla proložena regresní přímkou (lineární regrese), jejíž testová kritéria jsou uvedena v pravém horním rohu.

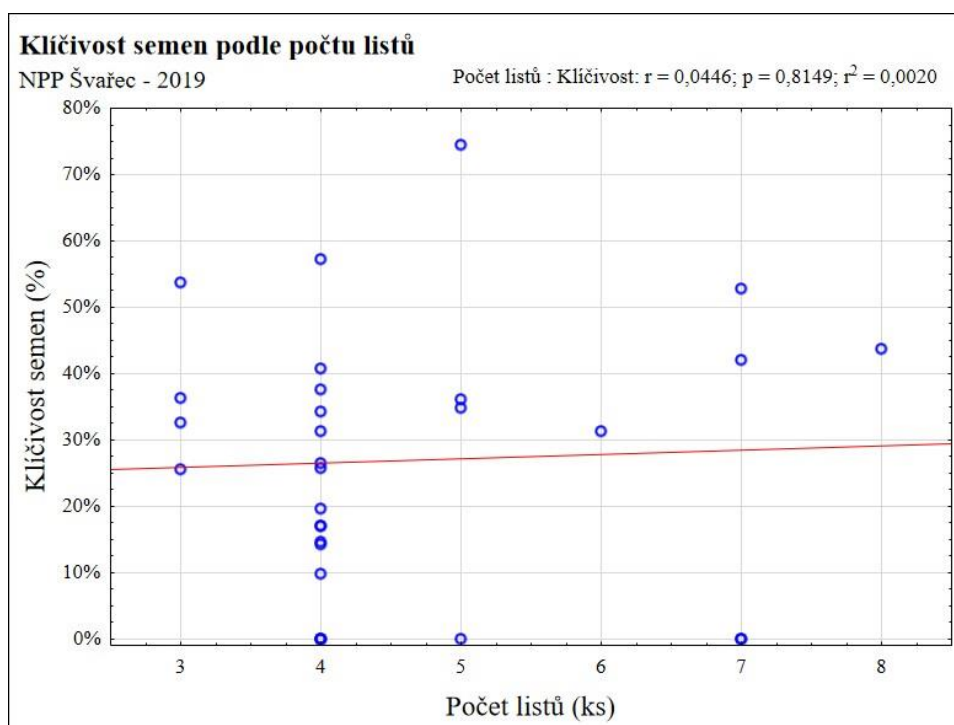
Statisticky testovanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2021, po 13 týdnech od výsevu, nezávisle proměnnou byl zvolen počet květů na květonosném stvolu. Testování závislosti bylo provedeno využitím regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že počet květů nemá významný vliv na klíčivost semen (p -hodnota = 0,4625; $R^2 = 0,0304$). Nejvyšší zaznamenaná klíčivost semen byla u 14 květů a dosahovala necelých 20 % (graf č. 16).



Graf. 16: Bodový graf znázorňuje vliv počtu květu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2021 na lokalitě Švařec. Body grafu byla proložena regresní přímkou (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

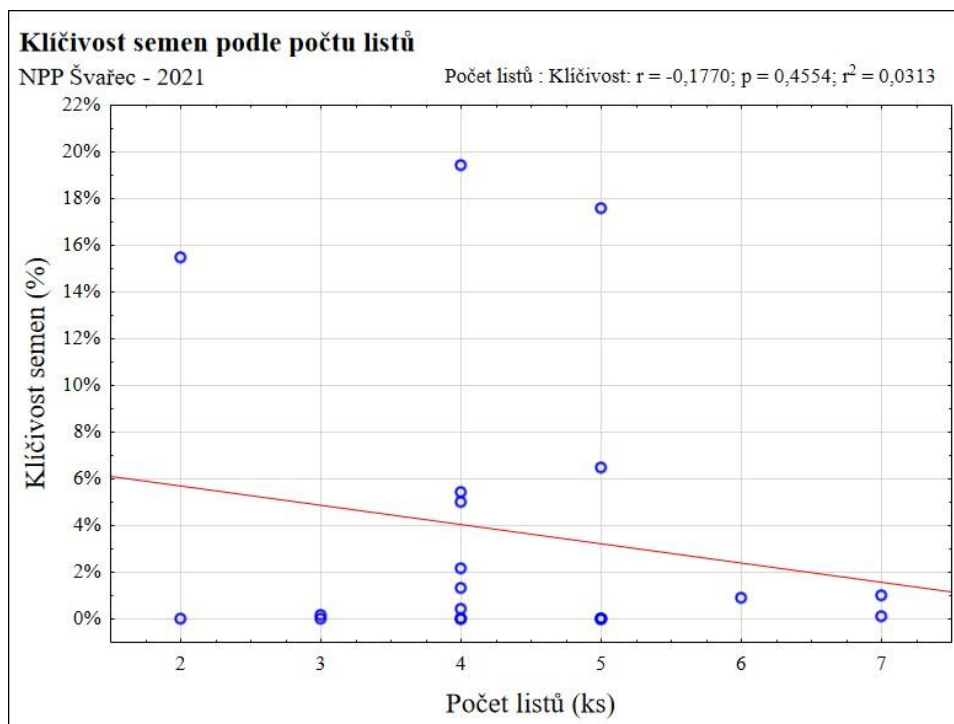
7.2.2.2. Vliv počtu listů na klíčivost semen

Ke statistickému testování proměnných byla závisle proměnnou zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2019 a jako nezávisle proměnnou byl zvolen počet listů listové růžice. Tyto hodnoty byly otestovány pomocí regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že počet listů nemá významný vliv na klíčení semen (p -hodnota = 0,8149; R^2 = 0,0020). Nejvyšší četnost klíčících semen byla zaznamenána u růžic, které měly čtyři listy. Nejvyšší zaznamenaná klíčivost semen 75 % byla zaznamenána u růžic s 5 listy (viz. graf č. 17).



Graf. 17: Bodový graf zobrazuje vliv počtu listů v růžici na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2019 v NPP Švařec. Body grafu byla proložena regresní přímkou (lineární regrese). Testová kritéria lineární regrese jsou umístěna v pravé horní části grafu.

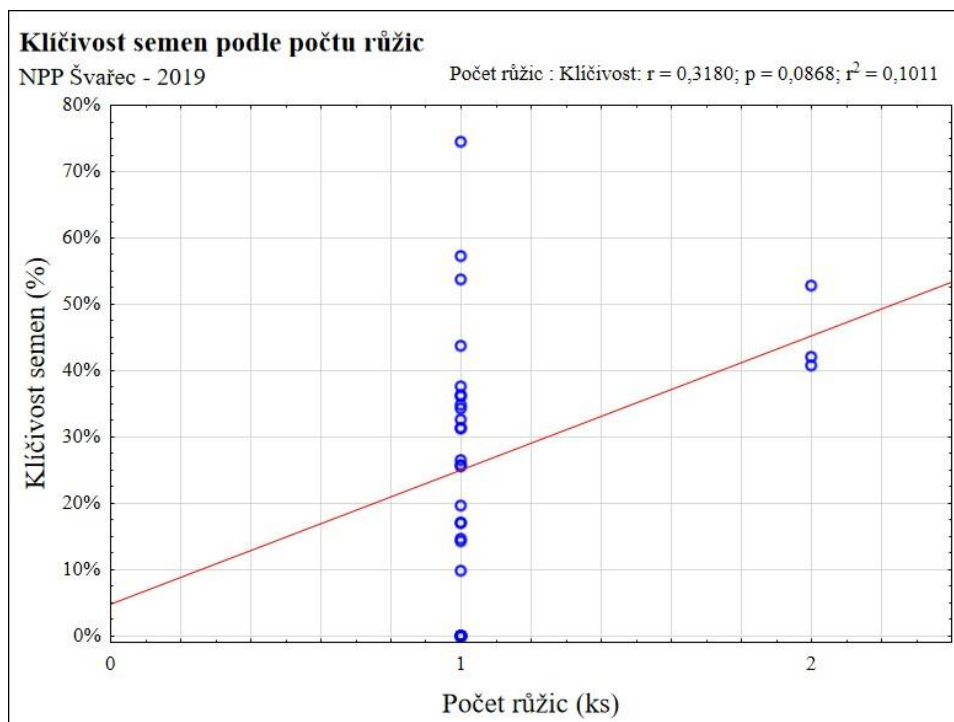
Statisticky vyhodnocovanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2021, nezávisle proměnnou byl zvolen počet listů listové růžice. Proměnné byly testované využitím lineární a regresní analýzy. Bylo zjištěno, že počet listů nemá vliv na klíčivost semen (p -hodnota = 0,4554; $R^2 = 0,0313$). Nejvyšší četnost i klíčivost (19 %) byla zaznamenána u listových růžic se čtyřmi listy (graf č. 18).



Graf. 18: Bodový graf zobrazuje závislost klíčivosti semen na počtu listů v listové růžici. Semena byla odebrána v roce 2021 na lokalitě NPP Švařec. Body byla proložena regresní přímkou (lineární regrese) a její testová kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

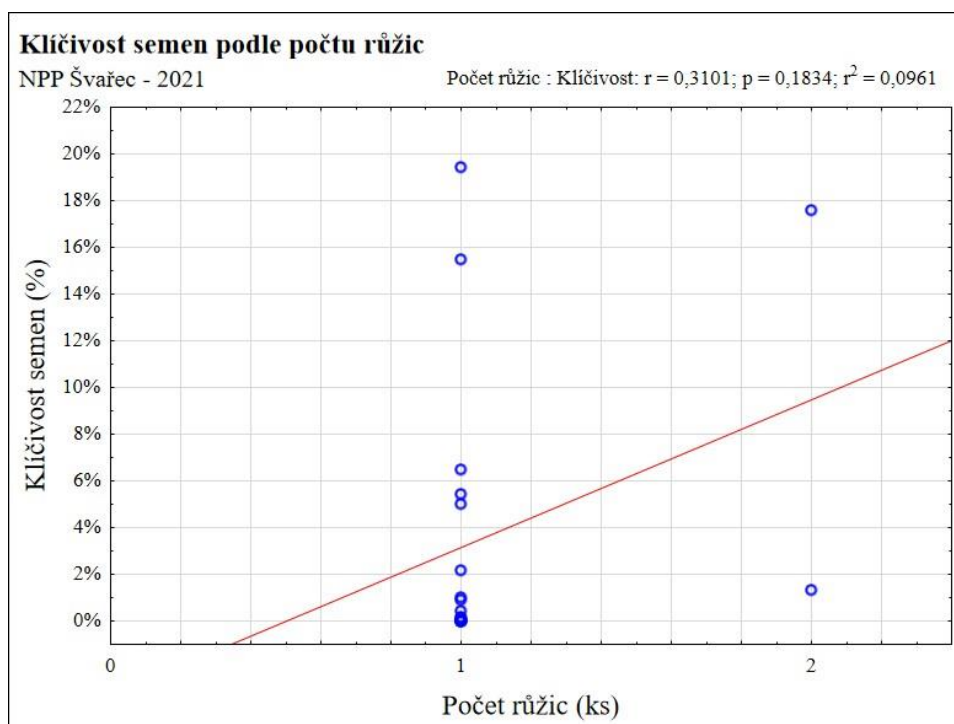
7.2.2.3. Vliv počtu růžic na klíčivost semen

Testovanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2019 po 12 týdnech od výsevu, nezávisle proměnnou byl zvolen počet listových růžic. K vyhodnocení proměnných byla použita korelační a regresní analýza. Bylo zjištěno, že počet růžic nemá významný vliv na klíčivost semen (p -hodnota = 0,0868; $R^2 = 0,1011$). Nejvyšší četnost klíčících semen vykazovala rostlina s jednou listovou růžicí (graf č. 19).



Graf. 19: Bodový graf znázorňuje vliv počtu listových růžic na klíčivost semen odebraných v roce 2019 z lokality NPP Švařec. Body grafu byla proložena regresní přímkou vyjadřující lineární regresí. Testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

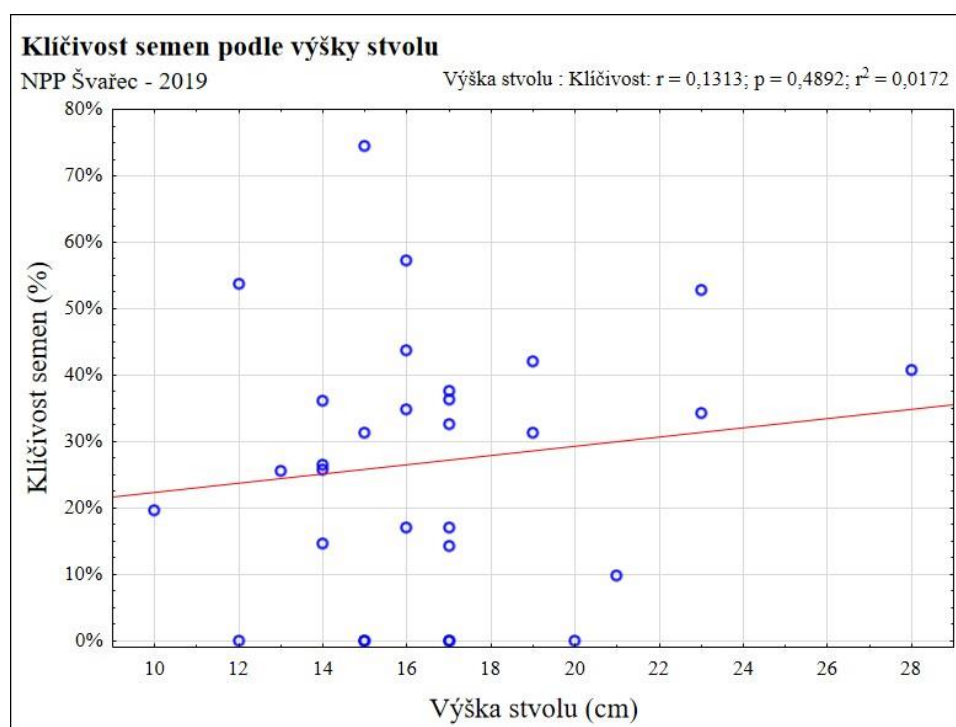
Statisticky testovanou závisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen z roku 2021, nezávisle proměnnou byl zvolen počet listových růžic. Testování závislosti bylo provedeno pomocí regresní a korelační analýzy. Bylo zjištěno, že počet růžic nemá významný vliv na klíčivost semen (p -hodnota = 0,1834; $R^2 = 0,0961$). Nejvyšší klíčivost i četnost klíčících semen byla zaznamenána u rostlin s jednou listovou růžicí (graf č. 20).



Graf. 20: Bodový graf zobrazuje závislost klíčivosti semen *Spiranthes spiralis* na počtu růžic na lokalitě NPP Švařec v roce 2021. Body grafu byla proložena regresní přímkou (lineární regrese) a její testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

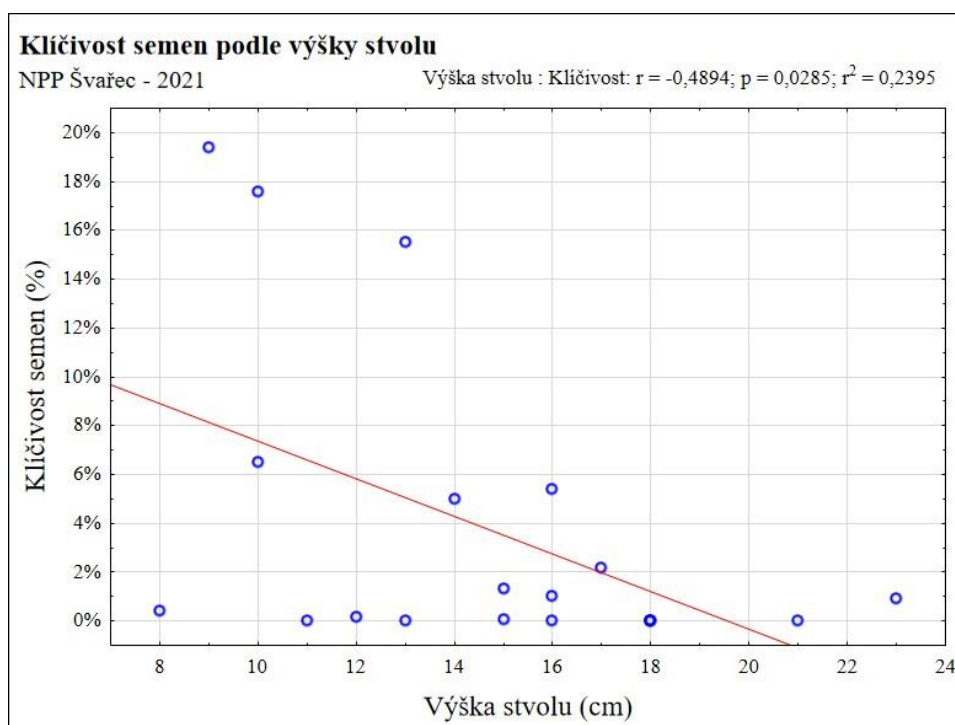
7.2.2.4. Vliv výšky stvolu na klíčivost semen

Statisticky testovanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen z roku 2019 a nezávisle proměnnou byla zvolena výška stvolu. Testování závislosti proměnných bylo provedeno pomocí korelační a regresní analýzy. Bylo zjištěno, že výška stvolu nemá významný vliv na klíčivost semen (p-hodnota = 0,4892; $R^2 = 0,0172$). Nejvyšší zaznamenaná klíčivost semen 75 % je u rostlin vysokých 15 cm (graf č. 21).



Graf. 21: Bodový graf znázorňující závislost klíčivosti semen na výšce květonosného stvolu. Semena *Spiranthes spiralis* byla odebrána v roce 2019 na lokalitě Švařec. Bodovým grafem byla proložena regresní přímka (lineární regrese), jejíž testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

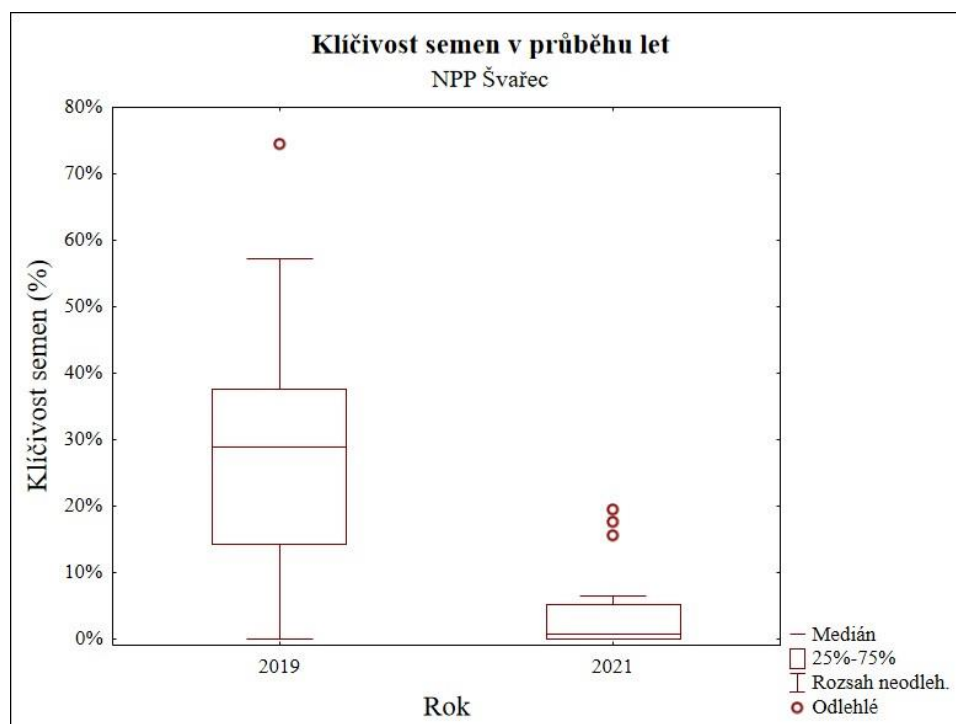
Testovanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální klíčivost semen z roku 2021, nezávisle proměnnou byla zvolena výška stvolu. Závislost byla testovaná pomocí regresní a korelační analýzy. Využitím regresní a korelační analýzy byla na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ prokázána lineární závislost klíčivosti semen na výšce stvolu (p -hodnota = 0,0285; $R^2 = 0,2395$). S 95% pravděpodobností lze tvrdit, že klíčivost semen je z 23,95 % ovlivněna výškou květonosného stvolu. Nejvyšší klíčivost semen 19 % byla zaznamenána u výšky 9 cm. Nejvyšší četnost klíčivosti semen byla u výšky 16 cm (graf č. 22).



Graf. 22: Bodový graf zobrazuje vliv výšky stvolu na klíčivost semen *Spiranthes spiralis* odebraných v roce 2021 na lokalitě NPP Švařec. Body tohoto grafu byla proložena regresní přímkou znázorňující lineární regresí. Testovaná kritéria jsou uvedena v pravé horní části grafu.

7.2.2.5. Porovnání klíčivosti semen během let

Porovnávanou závisle proměnnou byla procentuální hodnota klíčivosti semen a nezávisle proměnnou byly zvoleny hodnoty klíčivosti semen z let 2019 a 2021. Bylo zjištěno, že nejvyšší klíčivost semen byla zaznamenána v roce 2019, kdy maximální klíčivost semen byla 57,3 % (medián = 28,9 %). Maximální klíčivost semen v roce 2021 dosahovala hodnoty 6,5 % (medián = 0,7 %) (graf č. 23).



Graf. 23: Krabicový graf znázorňuje procentuální klíčivost semen *Spiranthes spiralis* během roku 2019 a 2021 z lokality NPP Švařec. Čára grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Dále je zobrazen rozsah hodnot a pomocí kolečka jsou označeny odlehlé hodnoty.

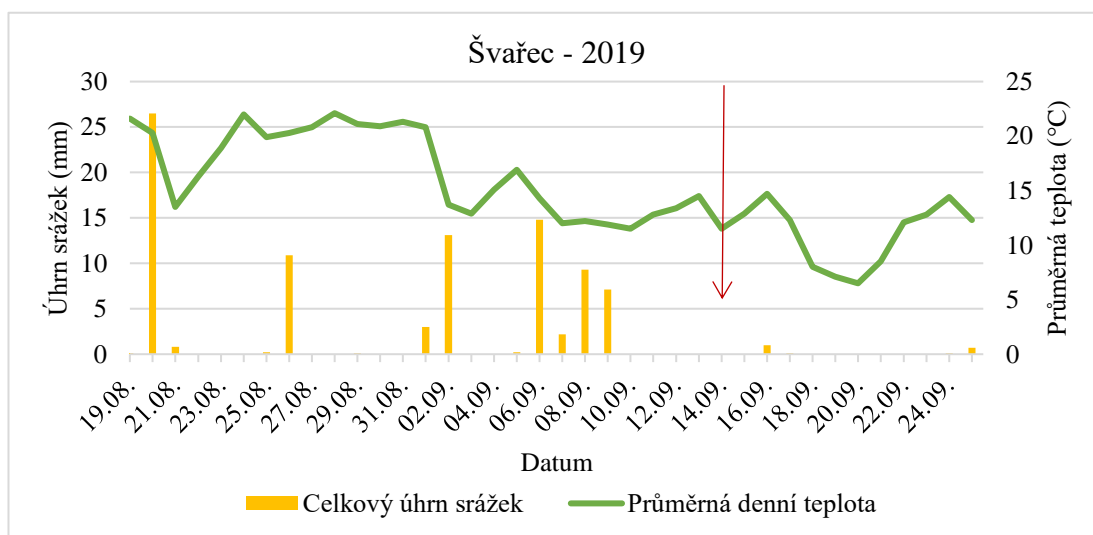
7.2.2.6. Klimatologické údaje

Průměrné denní teploty a celkového úhrnu srážek od 19.08. do 25.09. v letech 2019 a 2021 jsou zobrazeny pomocí kombinovaného sloupcového a spojnicového grafu. Pomocí sloupcového grafu byl znázorněn denní úhrn srážek a pomocí spojnicového grafu byla znázorněná průměrná denní teplota za sledované období. Tabulka č. 4 přehledně zobrazuje průměrnou denní teplotu a celkový úhrn srážek za období 19.08.–25.09. v letech 2019 a 2021. Nejvyšší průměrná denní teplota byla naměřena v roce 2019, zároveň úhrn srážek byl v tomto roce nejvyšší, ale nejvyšší úhrn srážek za rok byl zaznamenán v roce 2021.

Tab. 4: Průměrná denní teplota a celkový úhrn srážek za sledované období v letech 2019 a 2021 pro NPP Švařec (pro rok 2019 zdroj: CHMÚ 2022; pro rok 2021 zdroj: Horníček 2022). Dále je zobrazen celkový roční úhrn srážek (CHMÚ 2022).

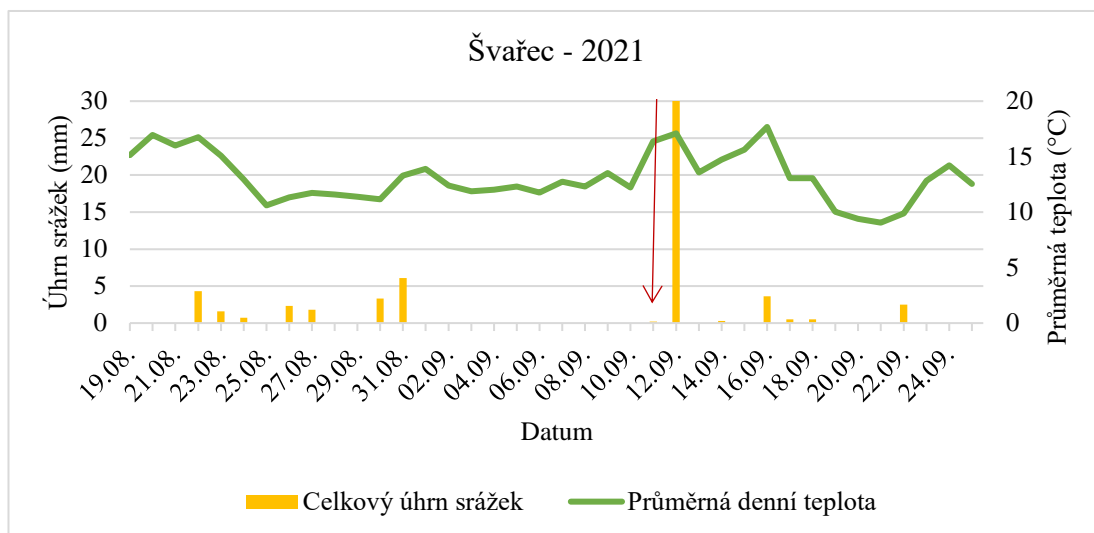
	2019	2021
Průměrná denní teplota (srpen–září)	15,11 °C	13,11 °C
Celkový úhrn srážek	90,2 mm	78,5 mm
Celkový úhrn srážek za rok	645,7 mm	758,5 mm

V roce 2019 nejvyšší průměrná denní teplota 22 °C byla naměřena dne 24.08. Nejnižší průměrná denní teplota byla naměřena 20.09. a dosahovala 6,5 °C (graf č. 24). Nejvyšší úhrn srážek 26,5 mm byl zaznamenán 20.08. Nejvyšší denní teplota 29 °C byla naměřena 01.09. Nejnižší denní teplota byla zaznamenána 19.09. a to 13 °C. Absolutně nejnižší teplota 2 °C byla naměřena 25.09 (graf č. 24).



Graf. 24: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–25.09.2019. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipka zobrazuje datum odběru semeníků (CHMÚ 2022).

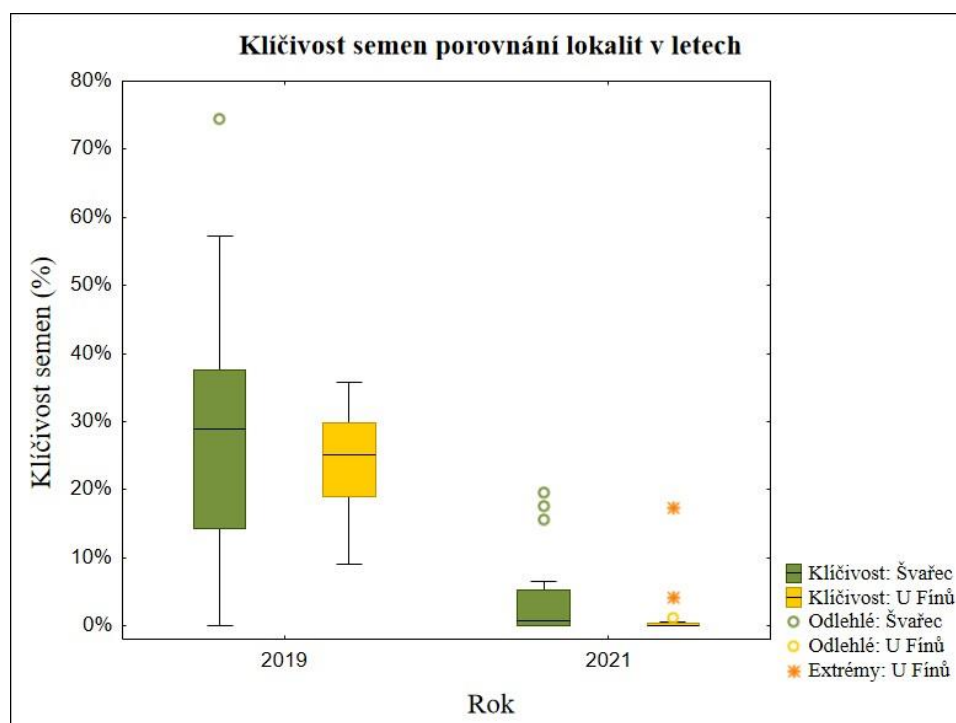
V roce 2021 nejvyšší průměrná denní teplota dosahovala 17,7 °C dne 16.09. Nejnižší průměrná denní teplota 9,1 °C byla naměřena 21.09 (graf č. 25). Nejvíce srážek během dne spadlo 12.09. a to 51,3 mm. Nejvyšší maximální denní teplota 26 °C byla naměřena 11. a 12.09. Nejnižší maximální teplota 12 °C byla zaznamenána 19. a 21.09. Absolutně nejnižší naměřená teplota dosahovala 4 °C dne 06.09.



Graf. 25: Kombinovaný graf zahrnuje sloupcový a spojnicový graf. Sloupcový graf zobrazuje celkový denní úhrn srážek za období 19.08.–25.09.2021. Spojnicový graf zobrazuje průměrnou denní teplotu za stejné sledované období. Šipka zobrazuje odběr semeníků (Horníček 2022).

7.2.2.7. Porovnání klíčivosti semen na lokalitách

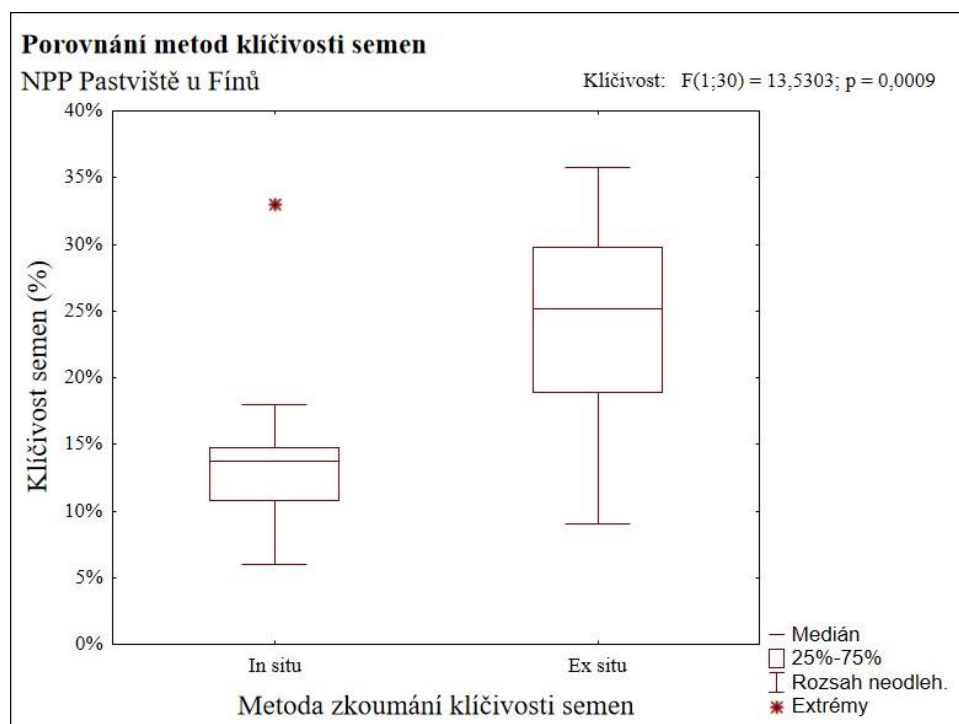
Porovnávanou závisle proměnnou byla zvolena procentuální hodnota klíčivosti semen, nezávisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen z jednotlivých lokalit, seřazena podle roku 2019 a 2021 (graf č. 26). Maximální hodnota klíčivosti semen byla zjištěna v roce 2019 na lokalitě NPP Švařec o hodnotě 57,3 % (medián = 28,9 %). Na této lokalitě byla vyšší klíčivost semen zaznamenána i roce 2021, kdy maximální zjištěná hodnota činila 6,5 % (medián = 0,6 %). Na lokalitě NPP Pastviště u Fínů klíčilo více semen v roce 2019, kdy maximální hodnota klíčivosti semen dosahovala 35,8 % (medián = 25,1 %). V roce 2021 maximální hodnota klíčivosti semen dosahovala 0,6 % (medián = 0 %).



Graf. 26: Kráčkový graf zobrazuje klíčivost semen *Spiranthes spiralis* v jednotlivých letech na lokalitě NPP Švařec (zelená barva) a NPP Pastviště u Fínů (žlutá barva). Boxy vymezují první a třetí kvartil, čára v grafu zobrazuje medián. Dále je uveden rozsah hodnot, pomocí kolečka jsou vyznačeny odlehlé hodnoty a pomocí hvězdy extrém (pouze z lokality NPP Pastviště u Fínů).

7.3. Porovnání metod klíčivosti semen

Jako porovnávanou závisle proměnnou byla zvolena klíčivost semen z lokality NPP Pastviště u Fínů odebraná v roce 2019 a nezávislou proměnnou byla zvolena jejich klíčivost v in situ a ex situ podmínkách. Bylo zjištěno, že klíčivost semen je závislá na zvoleném prostředí pro jejich úspěšný výsev (ANOVA $F(1;30) = 13,5303$; p -hodnota = 0,0009). Semena v ex situ podmínkách dosahovala vyšší klíčivosti (viz. graf č. 27). Maximální hodnota klíčivosti semen v ex situ podmínkách byla zjištěná 35,8 % (medián = 25,1 %). V in situ podmínkách maximální hodnota klíčivosti semen byla zjištěna 18 % (medián = 13,8 %).



Graf. 27: Krabicový graf porovnává metody zkoumání klíčivosti semen s procentuální hodnotou klíčivosti semen *Spiranthus spiralis*. Čára v grafu zobrazuje medián, box vymezuje první a třetí kvartil. Dále je zobrazen rozsah hodnot a pomocí kolečka odlehlé hodnoty.

8. Diskuze

8.1. In situ – klíčení a přežívání semenáčků na lokalitě

Na lokalitě NPP Pastviště u Fínů byl vytvořen na podzim roku 2019 pokus klíčení a přežívání semenáčků v in situ podmínkách. Na jaře roku 2021 byly diarámečky vyjmuty z půdy a kontrolovány pod binokulární lupou. Jednotlivé pokusné plochy byly rozdělené podle vlhkostních poměrů na biotop mezický, suchý a vyprahlý. Nejvíce semen vyklíčilo na první pokusné ploše, kde se nachází suchý typ biotopu. Maximální hodnota klíčivosti semen zde dosáhla 33 %, průměrná hodnota klíčivosti 19 %. Na této ploše byly v diarámečku objeveny i dva protokormy. Na druhé ploše s mezickým typem biotopu byla klíčivost nepatrně nižší (průměrná hodnota klíčivosti 15 %) a byly zde tři protokormy, z toho jeden byl rozdělen na tři části. Poslední pokusná plocha na vyprahlém stanovišti klíčila ze všech ploch nejméně (průměrně 9 %) a obsahovala dva protokormy. Jeden diarámeček s protokormem z této plochy obsahoval i část houbového mycelia. *Spiranthes spiralis* preferuje sušší stanoviště, na kterých je i menší tlak okolní vegetace (Jacquemyn & Hutchings 2010). Tímto faktem lze vysvětlit vyšší klíčivost na sušším typu biotopu, neboť zde panují příznivější podmínky pro semena tohoto druhu orchideje. Naproti tomu vyprahlé stanoviště nabízí ještě slabší konkurenční tlak okolní vegetace, ale také omezené množství dostupné vody, které nemusí vyhovovat samotné rostlině nebo její mykorrhizní houbě (Ipser 2012).

Testování klíčivosti v in situ podmínkách je náročné na přípravu a na potřebný čas ke zjištění výsledků. Studie zjistily, že klíčivost semen v přírodním prostředí je nízká (Yang et al. 2017). Autoři Rasmussen a Whigham (1993), od kterých byla pro tento pokus převzatá metodika zkoumání, použili tuto metodu pro zjištění klíčivosti semen pěti terestrických orchidejí. Dále se snažili zjistit, jestli lze metodu použít i k dalšímu studování dynamiky klíčení semen v půdě. Batty et al. (2001) tímto způsobem zkoumali klíčivost terestrické orchideje *Caladenia arenicola* až do stádia tvorby hlíz.

Na této lokalitě byl obdobný pokus již v minulosti proveden Ipsorem (2012), který vyhodnocoval stav semen, zda jsou ve stádiu protokormu, klíčí, neklíčí či jsou mrtvá. Také zkoumal jejich vztah k pozici diarámečků na lokalitě. Diarámečky umisťoval 10 cm od živé rostliny (Ipser 2012). V této práci byly jednotlivé diarámečky umístěné od živých rostlin v rozmezí 45–188 cm v nejhustších výskytech jedinců *Spiranthes*

spiralis. Ipser (2012) diarámečky odebíral po 6 měsících a zjistil, že procento života schopných semen velmi rychle klesá díky krátkodobé semenné bance švihlíku krutiklasu. Nejvíce života schopných semen našel 12 měsíců od výsevu (6,3 %). Celkem objevil tři protokormy, všechny při prvním odběru po 6 měsících od výsevu semen. Protokormy se vyskytovaly na pozici, které se dá porovnat s naším vyprahlým stanovištěm. V našem případě se na tomto stanovišti vyskytovaly dva protokormy každý v jiném diapozitivu, které byly objeveny až 1,5 roku od výsevu semen z důvodu hromadného odběru diarámečků. Díky tomu nelze určit za jak dlouho se protokormy ze semen vytvořily. Jelikož v našem pokusu se nacházelo celkem 7 protokormů, lze uvažovat nad tím, že se jedná o běžný trend jejich početnosti, jelikož Ipser (2012) měl ve svém pokusu tři protokormy. Pro vznik protokormu je důležitá infekce semene mykorhizní houbou (Rasmussen 1995). Diarámečky byly na plochách rozdělené rovnoměrně a pravděpodobně mohlo dojít k tomu, že ne každý rámeček byl v dosahu mycelia mykorhizních hub. Rozdílnost počtu klíčících semen především na vyprahlém biotopu mohla být zapříčiněna abiotickými faktory jako je odlišnost plochy s mocností půdního horizontu, teploty, dostupnost vody, hodnotou pH nebo organických prvků. Případně ji mohou ovlivňovat biotické faktory jako jsou půdní organismy, patogeny či přítomnost mycelia mykorhizních hub (Rasmussen 1995). Případně zde mohlo působit více faktorů najednou. Tyto faktory mohly být odlišné než v pokusu Ipsera (2012) a díky tomu mohla být klíčivost semen úspěšnější než v jeho studii, eventuálně mohlo dojít k odlišnosti při sčítání stavu semen. In situ experiment nemohl být proveden v NPP Švařec, neboť k jeho založení nebylo uděleno nutné povolení.

8.2. Ex situ – in vitro kultivace

8.2.1. Vliv typu biotopu na klíčivost semen

Spiranthes spiralis preferuje krátkostébelné, suché louky a pastviny. Nesnáší velkou okolní rostlinnou konkurenci (Jacquemyn & Hutchings 2010; Procházka 2010). Jelikož se *Spiranthes spiralis* v NPP Pastviště u Fínů vyskytuje na třech různých stanovištích, bylo zkoumáno, jestli jejich rozdílnost může mít vliv na klíčivost semen v laboratorních podmínkách. Porovnávané biotopy byly rozdělené do tří skupin dle vlhkostních poměrů určitého stanoviště, a to na mezické, suché a vyprahlé stanoviště. Jednotlivé biotopy se kromě vlhkostních poměrů liší i pokryvností půdy rostlinami a je mezi nimi mírný rozdíl obsahu chemických prvků a hodnoty pH. V tomto ohledu se nejvíce liší vyprahlý biotop, který má nepatrně vyšší pH (5,19)

a pouze 60% pokrývnost půdy (Panská 2020). Statistickým vyhodnocením nebyla prokázána závislost klíčivosti semen na typ biotopu. Tento výsledek byl v roce 2021 potvrzen. V roce 2019 nejvyšší hodnotu klíčivosti semen vykazovala semena pocházející ze suchého biotopu, což může opět souviset s preferencí druhu k suchým stanovištím a nižším konkurenčním tlakem okolní vegetace (Jacquemyn & Hutchings 2010). Maximální hodnota klíčivosti semen v roce 2019 dosahovala suchém biotopu dosahovala 35,8 %, na vyprahlém 31,8 % a mezickém 27,8 %. Rozdíl mezi plochami není příliš významný. Semena z vyprahlého stanoviště mohou být životaschopnější než semena z mezického biotopu z důvodu menší okolní vegetace, která mohla umožnit rostlině lépe asimilovat. Ale k potvrzení této myšlenky by bylo třeba posoudit například vývoj listových růžic z května 2019 a zvážit další vlivy. V roce 2021 nejvíce klíčících semen pocházelo z vyprahlého stanoviště. Jelikož tento rok celkově vyklíčilo méně semen, mohou být výsledky tímto faktem ovlivněné. Průměrná klíčivost semen z vyprahlého biotopu dosáhla pouze 0,25 %. Vliv prostředí, ze kterého pochází matečná rostlina na klíčivost semen zkoumal například Pérez-García (1997), který zjistil, že klíčení semen je ovlivněno environmentálními a fyziologickými faktory, které působí na semena během zrání na matečné rostlině. Tyto výsledky porovnává s dalšími autory, kteří dospěli k obdobným závěrům (Pérez-García 1997). Typ biotopu může ovlivňovat i reprodukční úspěšnost rostlin. Například Kindlmann & Jersáková (2006) zjistili, že orchidej *Platanthera bifolia* z biotopu otevřené louky byly opylované častěji než rostliny ze světlého smrkového lesa. Kindlmann a Jersáková (2006) uvádějí, že k těmto výsledkům došli i další autoři.

8.2.2. Vliv počtu květů na klíčivost semen

Počet květů vyprodukovaných matečnou rostlinou, může být použit jako jeden z fitness parametrů charakterizující rostlinu. Po statistickém vyhodnocení nebyla prokázána závislost klíčivosti semen na počtu květů. V NPP Pastviště u Fínů byla zaznamenána nejvyšší klíčivost semen v roce 2019 u rostlin se 14 květy na stvolu, nejvyšší četnost klíčících semen byla u rostlin se 12 a 14 květy na květonosném stvolu. V roce 2021 byla nejvyšší klíčivost semen zaznamenána taktéž u rostlin se 14 květy a nejvyšší četnost u rostlin s 15 květy na stvolu. V NPP Švařec nejvyšší zaznamenaná klíčivost semen v roce 2019 byla u rostlin se 13 květy a nejvyšší četnost byla u rostlin se 17 květy. Nejvyšší procento klíčivosti semen byla v roce 2021 u rostlin se 14 květy na stvolu. Jak již bylo zmíněno, v tomto roce na obou lokalitách vyklíčilo mnohem

menší množství semen, což mohlo ovlivnit výsledky, na které může mít vliv i nerovnoměrné rozložení dat v jednotlivých počtech květů. Nejvyšší procento klíčivosti semen se na obou lokalitách velmi podobá. Četnost klíčících semen zobrazuje nejčastěji zastoupený počet květů.

Spiranthes spiralis vytváří až 25 květů na květonosné lodyze. Současně jsou pro opylovače otevřené tři až pět květů (Procházka 1980; Willems 1989). Aby květy byly oplozeny, je nutný přenos pylu hmyzím opylovačem. Willems & Lahtinen (1997) ve své práci zjistili, že díky vlastnosti otevření jen pár květů opylovači nepreferují větší květenství, a tím je podpořen vyšší počet vyprodukovaných semeníků. Dále zjistili, že po odstranění květů z okolních konkurenčních druhů byla podpořena vyšší produkce semeníků. V této práci nebyla ovšem zkoumána životaschopnost vyprodukovaných semen. Pouze zhodnocen způsob managementu studované lokality, který dle autorů tvoří vhodné podmínky pro klíčení semen na lokalitě, ale musí být nadále tento vyhovující management lokality dodržován (Willems & Lahtinen 1997). Kindlmann & Jersáková (2006) zkoumali, jestli počet květů v květenství má vliv na produkci semen u 12 terestrických orchidejí. U *Anacamptis morio* a *Dactylorhiza sambucina* zjistili, že rostliny s malým a velkým květenstvím byly opylované méně často než rostliny se středně velkým květenstvím (Kindlmann & Jersáková 2006).

8.2.3. Vliv počtu růžic na klíčení semen

Vliv počtu růžic na klíčivost semen byl statisticky prokázán pouze v případě NPP Pastviště u Fínů v roce 2019. Jelikož v jednotlivých kategoriích počtu růžic je nerovnoměrný počet opakování, pravděpodobně je tento výsledek hodnotou ovlivněn. A nelze tedy říct, že pokud rostlina má více listových růžic, více klíčí. To potvrzují výsledky z roku 2021 a z lokality NPP Švařec, neboť závislost klíčivosti zde nebyla prokázána. V roce 2019 na Pastvišti u Fínů nejvíce klíčila semena pocházející z rostlin, které měly 3 růžice. Nejvyšší četnost klíčivosti semen byla zaznamenána u rostlin s jednou růžicí. Jak již bylo zmíněno, tento výsledek může být ovlivněn nerovnoměrným rozložením počtu opakování. Taktéž v roce 2021 byl nejčastější výskyt klíčících semen u rostlin s jednou růžicí a zároveň zde byla zaznamenána i nejvyšší klíčivost semen. Obdobné výsledky vyšly i na Švařci, kde oba roky nejvíce i nejčastěji klíčila semena pocházející z rostliny s jednou listovou růžicí. Dle morfologických předpokladů *Spiranthes spiralis* tvoří nejčastěji jednu nebo dvě kořenové hlízy, ze kterých listové růžice vyrůstají (Jacquemyn & Hutchings 2010).

Proto u vyššího počtu růžic je méně opakování. Tento výsledek potvrdil ve své práci i Ipsier (2012), že se na lokalitě Pastviště u Fínů v 72 % případech vyskytuje pouze jedna listová růžice a s postupným zvyšováním počtu růžic, jejich zastoupení klesá. Domnívám se, že pro porovnání vlivu listové růžice na klíčivost semen by bylo vhodnější použít údaje o počtech z jarního období. Listová růžice, která během odběru semeníků vyrůstá vedle květonosného stvolu, vzniká z nově tvořící se hlízy. Zatímco květonosný stvol vytvořila hlíza z předešlého vegetačního období, během kterého provozovala fotosyntézu. Tato listová růžice na jaře zaschne, rostlina přečká nepříznivé letní období v podzemní hlíze a až na konci srpna vytvoří květonosný stvol. Staré hlízy ke vzniku nové růžice buď vůbec nepřispějí nebo jen minimálně (Jacquemyn & Hutchings 2010). Dle mého názoru by bylo zajímavé porovnat počet listových růžic z předešlého vegetačního období. To znamená použít počet listových růžic z května téže roku, kdy rostlina vykvetla. Jelikož kvetení rostlin ovlivňuje velikost listových růžic v následujícím vegetačním období (Willems & Dorland 2000), bylo by vhodné uvážit, jestli by nebylo výstižnější použít k porovnání závislosti klíčivosti semen na fitness matečné rostliny, plochu asimilačního aparátu zjištěnou na jaře, před vytvořením květonosného stvolu. Autoři Willems & Lahtinen (1997) se domnívají, že nová listová růžice, která vzniká po vzejití květonosného stvolu a během tvorby semen je již plně fotosynteticky produkční, vyprodukované asimilační látky přesouvá do tvorby reprodukčních orgánů. Tím si autoři vysvětlují svůj výsledek, že investice do generativního rozmnožování švihlíku krutiklasu není omezena zdrojem živin (Willems & Lahtinen 1997). I z tohoto hlediska by bylo zajímavé porovnat závislost klíčivosti semen na již zmíněné listové ploše v jarním období před kvetením, ale i velikost nově vznikající listové růžice např. na konci září během vývoje semen a zjistit, jestli zde není závislost klíčivosti semen.

8.2.4. Vliv výšky stvolu na klíčivost semen

Výška stvolu nemá významný statistický vliv na klíčivost semen. Tento výsledek byl zjištěn na Pastvišti u Fínů v obou sledovaných letech a na Švařci v roce 2019. Na této lokalitě v roce 2021 byla zjištěna závislost klíčivosti semen na výšce stvolu. Tento výsledek může být opět zkreslen nevhodným rozložením četnosti dat a malého počtu opakování v nižších a vyšších výškách stvolů. Na lokalitě Pastviště u Fínů vyšla nejvyšší klíčivost u rostlin s výškou stvolu 11 cm a nejvyšší četnost klíčících semen byla zaznamenána u výšky 12 cm. Ve druhém sledovaném roce nejvyšší klíčivost

byla zaznamenána u rostlin vysokých 17 cm a nejvyšší četnost u 14 cm. Na Švařci vyšla v roce 2019 nejvyšší klíčivost semen u výšky 15 cm, nejvyšší četnost klíčících semen u výšky 17 cm. V roce 2021 byla zaznamenána nejvyšší klíčivost semen u výšky 9 cm a nejčastější výskyt klíčících semen byl u výšky 16 cm. Jelikož jednotlivé výšky stvolu neobsahovaly podobné počty opakování, výsledek tím může být negativně ovlivněn. Pokud jednotlivé lokality mezi sebou porovnáme, nejčastěji semena klíčila v rozmezí 12–16 cm. Švihlík krutiklas má stvol obvykle vysoký (4,5–)7–20(–35) cm (Procházka 2010). Willems & Lahtinen (1997) zjistili, že opylovači u *Spiranthes spiralis* neupřednostňují velké rostliny před malými, jako např. zjistili autoři Kindlmann & Jersáková (2006). Ti přišli na to, že pokud orchidej *Gymnadenia conopsea* byla vyšší a kvetlo jich více najednou, přilákala tím více opylovačů, a tím pádem vytvořila více semeníků. Willems (1982) zkoumal výšku stvolu matečné rostliny a výšku stvolů nových (pravděpodobně generativních) rostlin orchideje *Orchis simia*. Zjistil, že potomci matečné rostliny měly kratší stvol než matečná rostlina ve stejném roce (Willems 1982). Ale ovlivnění klíčivosti semen nebyla zkoumána. Wells (1981) zjistil, že rostliny jsou vyšší, pokud v létě byl vyšší úhrn srážek.

8.2.5. Vliv počtu listů na klíčivost semen

Vliv počtu listů v listové růžici byl na lokalitě Švařec statisticky vyhodnocen s negativním výsledkem pro oba sledované roky. Nejčastější klíčivost semen byla zaznamenána u listových růžic, která měla čtyři listy. V roce 2019 byla nejvyšší klíčivost semen zaznamenána u pěti listů (75 %), v roce 2021 byla u pěti listů zaznamenána vyšší, ale nejvyšší byla u růžic se čtyřmi listy (19%). Jelikož údaje o počtu listech v růžicích pocházejí z doby, kdy se listové růžice teprve vyvíjí, a ne z plného vývoje, může se jednat o zkreslené hodnoty. Jak již bylo zmíněno v jedné předešlé podkapitole, pravděpodobně by bylo vhodnější zvolit porovnání velikosti listové plochy v plném rozvoji s klíčivostí semen a posoudit její vliv. *Spiranthes spiralis* v listové růžici obvykle tvoří 4–5 listů, ale lze nalézt růžice i s více než 10 listy (Jacquemyn & Hutchings 2010). Z tohoto důvodu semena nejčastěji a nejvíce klíčí u čtyř až pěti listů v listové růžici, neboť v tomto rozmezí je zastoupeno nejvyšší počet opakování. Willems (1982) zkoumal vliv počtu listů a jejich plochy na dispoziční vytvoření květů rostlinou u orchideje *Orchis simia*. Zjistil, že tento druh orchideje pro vytvoření květů potřebuje minimálně 4–5 listů s minimální plochou 13 cm². V tomto

pokusu hodnotil okulárně klíčivost semen v in situ podmínkách, a to podle toho, jestli se v okolí matečné rostliny vytvořili noví jedinci. Konkrétní vliv na klíčivost semen v in vitro podmínkách neposuzoval (Willems 1982). Ke stejným výsledkům dospěli i Paušič et al. (2017) při zkoumání Slovinské populace *Spiranthes spiralis*. Zjistili, že průměrný počet listů v růžici kvetoucí rostliny je 4,4 listů (Paušič et al 2017). Willems & Dorland (2000) zjistili, že rostliny švihlíku krutiklasu, které jeden rok vykvetly, vytvoří následující rok listy s menší plochou. K těmto výsledkům ve své práci došli i autoři Brabec et al. (2011) na lokalitě Pastviště u Fínů. Také zjistili, že pokud rostlina byla sterilní, její listová plocha setrvávala každý rok v obdobných hodnotách (Brabec et al. 2011).

8.2.6. Porovnání klíčivosti semen během let

Na lokalitě Pastviště u Fínů vyklíčilo nejvíce semen odebraných v roce 2019. Semena odebraná v roce 2020 ani po 7 měsících od výsevu nevykazovala žádné známky klíčivosti. Semena byla skladována 11 měsíců a až poté byl proveden výsev. Delší doba skladování mohla ovlivnit životaschopnost semen. Pro ověření, jestli delší doba skladování ovlivnila klíčivost semen, byla ve stejnou dobu vyšetřena semena uchovaná z roku 2019, která skoro po dvou letech skladování vyklíčila. Lze se tedy domnívat, že semena byla ovlivněna při svém vývoji jinými faktory, např. průběhem klimatických podmínek, konkurenčním tlakem okolní vegetace, fyziologickými procesy či kombinací více faktorů. V tomto roce nebyl proveden odběr semeníků na druhé lokalitě, a proto nelze určit, co přesně ovlivnilo životaschopnost semen z lokality Pastviště u Fínů. Procento vyklíčených semen odebraných v roce 2021 v porovnání s rokem 2019 bylo velmi nízké. Díky tomuto zjištění lze spekulovat, že životaschopnost semen v roce 2020 nemusela být ovlivněna chybou skladování semen, ale mohly být ovlivněny již zmíněnými vnějšími faktory prostředí či vnitřními faktory rostliny. Semena z lokality Švařec vyklíčila nejvíce v roce 2019. V roce 2020 nebyl vlivem nemoci proveden odběr semen. Rok 2021 byl v klíčivosti úspěšný, ale opět jako na druhé sledované lokalitě v mnohem menší míře, než tomu bylo v roce 2019. V tomto roce hodnota mediánu klíčivosti semen dosáhla hodnoty 28,8 % a v roce 2021 pouze 0,7 %.

Porovnání více lokalit v průběhu několika let se věnují např. Primack & Stacy (1998), kteří po 11 let zkoumali tři lokality výskytu střevíčníku bezlodyžného (*Cypripedium acaule*) a sledovali vliv produkce semen na fitness rostliny. Zjistili,

že mezi jednotlivými lokalitami i během let je významný rozdíl, který způsobují rozdílné klimatické podmínky (především úhrn srážek) a další vlivy abiotických i biotických činitelů. Tímto dlouhodobým pokusem zjistili, že optimální doba pro trvání experimentu sledování vývoje lokality je v rozmezí čtyř až sedmi let. Studie, které trvají kratší dobu, mohou být příliš krátké pro odhalení účinků a delší mohou zakrýt nové poznatky studie (Primack & Stacy 1998).

8.2.7. Klimatologické údaje

Klimatologické údaje byly zpracovány z okolních meteorologických stanic. Pro NPP Pastviště u Fínů se jednalo o amatérskou meteorologickou stanici Chotěšov, umístěnou v nadmořské výšce 700 m n. m. a od lokality vzdálenou vzdušnou čarou 16,5 km. Data byla sledována za období 19.08 do 10.10. V roce 2019 průměrná teplota činila 13,9 °C a celkový úhrn srážek dosahoval 114,6 mm. Průměrná teplota za sledované období v roce 2020 činila 14,12 °C a celkový úhrn srážek 79,8 mm. V roce 2021 dosahovala průměrná denní teplota 13,4 °C a celkový úhrn srážek 90,6 mm (Hosnedl 2022). Rozdíly v průměrné denní teplotě během jednotlivých let nejsou příliš výrazné, ale celkový úhrn srážek vykazuje rozdíly vyšší, kdy nejbohatší na srážky ve sledovaném období byl rok 2019. Ale nejvyšší roční úhrn srážek 729,4 mm byl v roce 2020, kdy nejvíce srážek bylo zaznamenáno od května do srpna.

Data vztahované k lokalitě NPP Švařec z roku 2019 byly převzaté z meteorologické stanice CHMÚ z Bystřice nad Pernštejnem, umístěné v 553 m n. m. a pro rok 2021 z amatérské meteorologické stanice také z Bystřice nad Pernštejnem, v nadmořské výšce 534 m. Data byla zpracována za sledované období od 19.08. do 25.09. V roce 2019 naměřená průměrná teplota dosahovala 15,1 °C a celkový úhrn srážek dosahoval 90,2 mm. V roce 2021 dosahovala průměrná teplota 13,1 °C a celkový úhrn srážek byl 78,5 mm. Rozdíl průměrných denních teplot mezi sledovanými roky činí 2 °C. Celkový nejvyšší roční úhrn srážek 758,5 mm byl zaznamenán v roce 2021, kdy nejvíce srážek bylo zaznamenáno během července a srpna.

U švihlíku krutiklasu byla sledovaná fluktuace (nepravidelné kvetení) v populacích v Nizozemí (Jacquemyn et al. 2007), Velké Británii (Wells 1981), ale i na lokalitě NPP Pastviště u Fínů (Ipser 2010). Tyto výkyvy jsou pravděpodobně způsobené energetickou náročností kvetení, klimatickými podmínkami nebo kombinací obou

zmíněných faktorů (Wells 1981; Jacquemyn et al. 2007). Wells (1967) zjišťoval vliv úhrnu srážek a teploty na pravděpodobnost kvetení u populace *Spiranthes spiralis* ve Velké Británii. Tuto domněnku neprokázal. Ke stejným výsledkům dospěl i Willems (1989) u nizozemské populace. V britské populaci, kterou sledoval autor Wells (1981), našel pozitivní korelaci mezi množstvím srážek z období dubna až června a teplotou půdy v období ledna až dubna. Tato populace se nachází v místech, kde průměrná lednová teplota dosahuje 4,4 °C a průměrná červencová teplota dosahuje 15,9 °C. Průměrný roční úhrn srážek je 884 mm (Hill et al. 2004). Ipser (2012) zkoumal vliv průměrné teploty na velikost listové plochy v NPP Pastviště u Fínů. Zjistil, že vysoké teploty během roku způsobují vysychání a tím i zmenšení listové plochy. Ipser (2012) se domnívá, že červnové a červencové teploty předešlého roku před kvetením ovlivnily spojení rostliny s mykorhizní houbou. Ipser (2012) došel k výsledkům, že pokud jsou předchozí rok celoroční teploty nižší, konec podzimu vlhký a vlhké jaro, je velikost listové plochy pozitivně ovlivněná. Na pravděpodobnost kvetení měly vliv nižší teploty v květnu a červnu a v srpnu těsně před kvetením. Pokud byl březen sušší a říjen chladnější, byla tím zvýšená pravděpodobnost úhynu rostlin (Ipser 2012). K obdobným výsledkům došel i Wells (1981), který zjistil, že mírná zima a vlhké jaro příznivě ovlivňuje pravděpodobnost kvetení rostlin. Na lokalitě Švařec bylo v roce 2019 období března, května a června vlhčí než v roce 2021.

Dle Wellse (1981) je vývoj rostlin švihlíku krutiklasu více ovlivněn úhrnem srážek než teplotou i přesto, že se jedná o mediteránní druh, který by měl být adaptován na suché letní období. Nejvyšší úhrn srážek dopadl během sledovaného období v roce 2019, což platí pro obě srovnávané lokality. Nejméně srážek byl v roce 2020. Rozdíl mezi rokem 2019 a 2020 činil 34,8 mm pro lokalitu Pastviště u Fínů. V roce 2021 na této lokalitě spadlo o 24 mm srážek méně. Na Švařci je rozdíl mezi roky 2019 a 2021 11,7 mm srážek. V době, kdy semena vytvářela květenství a následně i semeníky (přelom srpna a září), byl nejvyšší úhrn srážek zaznamenán v roce 2019. Díky dostatku vody mohlo dojít k vývoji životaschopnějších semen. Neboť v roce 2020, kdy semena nevyklíčila, byl v tomto období úhrn srážek nejnižší a v roce 2021 se úhrn srážek pohyboval mezi těmito hodnotami. Při srovnání celkových ročních úhrnů srážek byl na srážky nejbohatší rok 2020 pro lokalitu Pastviště u Fínů a rok 2021 pro lokalitu Švařec (rok 2020 na této lokalitě není z důvodu absence dat o klíčivosti

semen zohledněn), a to především v období pozdního jara a raného léta. Vyšší úhrn srážek, který byl zaznamenán v jarním i brzkém letním období, mohlo klíčivost semen ovlivnit z důvodu vyššího tlaku konkurenční vegetace a omezení podmínek pro fotosyntézu. Při porovnání průměrných teplot během jednotlivých let na lokalitě Pastviště u Fínů není pozorován významný rozdíl, proto se lze domnívat, že větší vliv na klíčivost semen měl právě úhrn srážek a jeho rozložení během roku.

8.2.8. Porovnání klíčivosti semen na lokalitách

Spiranthes spiralis se na území České republiky v minulosti vyskytoval na 237 lokalitách, z toho 105 lokalit zaniklo ještě před rokem 1900 (Štípková & Kindlmann 2021). V současnosti se u nás nacházejí pouze dvě přírodní lokality, které jsou v této práci mezi sebou porovnávány. Jedná se o lokality NPP Pastviště u Fínů z Pošumaví a NPP Švařec ze Svratecké hornatiny (Brabec et al. 2004). Obdobně jsou na tom i populace v Nizozemí, kde v minulosti bylo zaznamenáno 40 lokalit a v dnešní době evidují pouze dvě lokality (Jacquemyn et al. 2007). Semena pocházející z lokality NPP Švařec klíčila lépe v obou sledovaných letech, než tomu bylo u semen pocházejících z Pošumaví. Semena odebraná v roce 2019 vyklíčila na obou lokalitách více než v roce 2021. Semena pocházející z lokality Švařec vykazovala nejvyšší hodnotu klíčivosti 57,3 % a z lokality Pastviště u Fínů to bylo 35,8 % semen. Ve střední hodnotě klíčivosti semen je taktéž rozdíl, ale není tolik výrazný. U semen ze Švařce dosahovala hodnota mediánu necelých 29 % a na Pastvišti u Fínů 25 %. Z grafu č. 27 lze vyčíst, že více semen v roce 2021 vyklíčilo taktéž na lokalitě Švařec, ale medián klíčivosti semen dosahuje 0,7 %. Semena pocházející z Pastviště u Fínů dosahují hodnoty mediánu jejich klíčivosti pouze 0,3 %. V minulosti byly obě lokality obhospodařovány jako orné půdy. Vlivem nepříznivých terénních podmínek byly lokality využívány pro pastvu dobytka (hovězí dobytek, ovce nebo kozy). Po objevení švihlíku krutiklasu na lokalitách byl upraven režim pasení, aby vyhovoval fenologickým potřebám tohoto druhu kriticky ohrožené orchideje.

Porovnání lokalit s výskytem *Spiranthes spiralis* se věnují ve své práci Machon et al. (2003), kteří porovnávají genetickou strukturu pařížské populace této orchideje s několika dalšími populacemi, které se vyskytují v jižní Francii. Autoři zjistili, že sledovaná populace má dvě odlišné genetické struktury než rostliny z jižních populací. Semena v této populaci se šířila pouze v nejbližším okolí mateřských rostlin (Machon et al. 2003). Mnoho autorů zkoumá stav rostlin (vegetativní, kvetoucí,

ve stavu dormance) a jejich fitness parametry (počet růžic, výšku stvolu, počet květů) z nizozemské populace (Wells 1967; Willems & Dorland 2000; Jacquemyn et al. 2007), z britské populace (Jacquemyn & Hutchings 2010). Zjištěné parametry dále porovnávají mezi jednotlivými lety, aby zjistili vývoj populace na studované lokalitě a mohli tak predikovat budoucnost rostlin na lokalitě nebo porovnat jednotlivé lokality mezi sebou. Podobný postup je prováděn i během monitoringu v NPP Pastviště u Fínů. Při něm dochází k zaznamenání již zmíněných parametrů rostlin a následná data slouží ke sledování vývoje nejen lokality, ale i konkrétních jedinců a lze díky nim říct, jestli počty jedinců neklesají a nedochází k postupnému vymírání této lokality. Tyto informace lze využít ke sledování životního cyklu konkrétních jedinců a dále by se daly aplikovat i na sledování klíčivosti semen a v průběhu let sledovat u jednotlivých jedinců výkyvy životaschopnosti semen. Na druhé lokalitě NPP Švařec pravděpodobně nedochází k takto intenzivnímu monitoringu v rámci sledování jedinců, ale pouze na sledování vývoje celé populace. Jedná se o osobní domněnku, která není ničím podložená ani vyvrácená.

Zajímavé je, že v roce 2017 na obou lokalitách vykvetlo nejvíce exemplářů od začátku monitoringu lokalit, na Pastvišti u Fínů se jednalo o 322 kvetoucích jedinců a na Švařci vykvetlo přes 500 exemplářů. Následující rok 2018 vlivem suchého a teplého léta kvetlo velmi málo rostlin. Na lokalitě Pastviště u Fínů kvetlo pouze 20 jedinců *Spiranthes spiralis*, na lokalitě Švařec dokonce nekvetla ani jedna rostlina. Semena odebraná v následujícím roce 2019 vykazovala nejvyšší klíčivost ve sledovaném období. Tuto skutečnost si vysvětlují dvěma způsoby. Buď rostliny investovaly více energie do tvorby kvalitních semen jako reakci na stres vyvolaný nepříznivými podmínkami předešlého roku. Obdobně reagoval v práci autorů Suzuki et al. (2012) *Arabidopsis thaliana*, který vyprodukoval více semen při působení dlouhodobého stresu z vysokých teplot.

Druhý možný způsob interpretace výsledků je ovlivnění rostliny průběhem klimatických podmínek. Jak již bylo zmíněno, v roce 2018 bylo letní období suché a teplé. Nedostatkem vody a silného žáru mohlo dojít k oslabení okolní konkurence. Díky tomu nově vyrůstající listové růžice mohly během svého vegetačního období snadněji asimilovat a vytvořit dostatek zásobních látek na produkci kvalitnějších semen, která byla podpořena vyšším úhrnem srážek během srpna a září roku 2019. Což vysvětlují i autoři Snow & Whigham (1989), kteří zjistili, že pokud je plocha

listových růžic dostatečně velká, mohou asimilační aparáty vytvářet pomocí fotosyntézy dostatečné množství sacharidů. Díky tomu je umožněn rozvoj růžic a následně i vývoj květonosného stvolu (Snow & Whigham 1989). Rok 2020 byl na srážky nejbohatší, především v předjaří, v průběhu jara i léta. Vyšší úhrn srážek mohl být prospěšný pro okolní vegetaci, která vytvořila více biomasy (vlastní pozorování při provádění podzimního monitoringu v tomto roce) a neumožnila listovým růžicím *Spiranthes spiralis* dostatečný rozvoj, vlivem toho neměla rostlina dostatek živin na vytvoření životaschopných semen. Průměrná denní teplota v období tvorby semen byla sice vyšší než v předchozím roce, ale rozdíl nedosahoval ani 0,5 °C. Na vývoj semen mohly v tomto roce negativně působit nižší teploty na konci září, případně zmíněný nejvyšší úhrn srážek v tomto roce. V roce 2021 byl celkový úhrn srážek nižší než v předchozím roce, ale vyšší než v roce 2019. Průměrná denní teplota za sledované období byla nejnižší. Opět zde mohlo hrát roli rozložení srážek během roku, kdy nejvyšší úhrny srážek byly opět od května do července. Jedná se o nepodloženou myšlenku, kterou by bylo třeba ověřit například zjištěním plochy listových růžic. Zvýšená tvorba biomasy okolní vegetace mohla mít vliv na činnost fotosyntézy. Ovlivnění rostlin by bylo možné posoudit zjištěním plochy listových růžic a jejich polohy vůči povrchu půdy v jarním období před kvetením, za sledované roky a porovnat je mezi sebou. Willems et al. (2001) zkoumali vliv zastínění na listové růžice *Spiranthes spiralis*. Zjistili, že pokud je listová růžice zastíněná, její listy jsou prodloužené, tenčí a s povrchem půdy svírají ostřejší úhel (přibližně 60°), tudíž lze tento druh považovat za mírně tolerantní k zastínění (Willems et al. 2001). Pokud by tedy listové růžice na jaře 2019 byly plně vyvinuté a dostatečně přitisklé k zemi, v letech 2020 a 2021 s menší plochou, užšími, vytaženými listy a s povrchem půdy by svíraly ostřejší úhel, mohlo by se jednat o pravdivou myšlenku. Nelze vyloučit ovlivnění klíčivosti semen více faktory najednou.

8.3. Porovnání metod klíčivosti semen

Semena klíčila v ex situ podmínkách laboratoře lépe než přímo na lokalitě Pastviště u Fínů v in situ podmínkách. Procentuální hodnota klíčivosti semen v in situ podmínkách lokality dosahovala mediánové hodnoty 13,8 %, kdežto v ex situ podmínkách byla zaznamenaná střední hodnota klíčivosti 25,1 %. Dulić et al. (2019) zkoumali asymbiotickou klíčivost semen *Spiranthes spiralis* v závislosti na složení živného média, osvětlení a vliv cytokininů na klíčivost, tvorbu protokormu a vývoj

sazenic v laboratorních podmínkách. Autoři došli k výsledkům, že švihlík krutiklas klíčí jak ve stálé 24hodinové tmě, tak i během 16hodinového osvětlení. Během podmínek 16/8 (světlo/tma) probíhal vývoj embryí semen rychleji, než tomu bylo při trvalé tmě. Semena vystavená těmto světelným podmínkám vykazovala kromě rychlejšího vývoje protokormu i vyšší procento tvorby výhonků a rhizoidů. A již po 12 týdnech od výsevu 1,6 % klíčících semen měly vyvinuté 2–3 listy (Dulić et al. 2019). V případě této práce byla semena vystavená 24hodinové tmě a jejich vývoj po 12–14 týdnech od výsevu dosahoval maximálně fáze protokormu. Dulić et al. (2019) vysvětlují, že lepší klíčivost a vývoj semen za světelných podmínek je způsoben přirozeným stanovištěm tohoto druhu. Jelikož švihlík krutiklas se převážně vyskytuje na suchých pastvinách (Procházka 2010), jeho semena jsou přizpůsobená klíčení na povrchu půdy, těsně či hlouběji pod půdním povrchem (Kauth et al. 2006). Dulić et al. (2019) zjistili, že *Spiranthes spiralis* má pozitivně fotoblastická semena, ale je nutné provést další výzkumy na toto téma. Dále zjistili, že po přidání kokosové vody do kultivačního média došlo ke zvýšení klíčivosti semen (Dulić et al. 2019).

In situ výzkumu *Spiranthes spiralis* se přímo na lokalitě Pastviště u Fínů věnoval Ipser (2012). Jeho výsledky byly již s našimi výsledky v této práci porovnávány v samostatné kapitole (viz. kapitola 8.1.). Masuhara & Katsuya (1994) porovnávali vztahy mezi druhem orchideje *Spiranthes sinensis* var. *Amoena* a mykorhizní houby *Rhizoctonia* spp. v in situ a in vitro podmínkách. Zjistili, že druhy mykorhizních hub *Rhizoctonia* spp., které se v in situ podmínkách neúčastnily klíčení semen, podpořily klíčení v in vitro podmínkách. V in situ podmínkách byla nalezena infekce převážně houbou *Rhizoctonia repens*. Rostliny z in vitro podmínek přesunuli do ex vitro a zjistili, že sazenice po dobu tří měsíců pokračovaly v růstu. Tím se ukázalo, že houby, které se přirozeně na lokalitě neúčastní mykorhizy, mohou být za vhodných uměle vytvořených podmínek mykorhizní (Masuhara & Katsuya 1994). Yang et al. (2017) zkoumali klíčivost semen v ex situ a in situ podmínkách u epifytické orchideje *Dendrobium sinense* na kůře hostitelského stromu, která sloužila jako živné médium pro klíčení semen. Při porovnání klíčivosti semen v ex situ a in situ podmínkách došli k závěru, že semena klíčí lépe v ex situ podmínkách (Yang et al. 2017). Výsledky v předkládané práci se s těmito autory shodují.

9. Závěr

Práce se zabývala generativním rozmnožováním kriticky ohrožené terestrické orchideje *Spiranthes spiralis* z lokalit NPP Pastviště u Fínů a NPP Švařec. Výzkum byl proveden v ex situ podmínkách laboratoře a in situ podmínkách na lokalitě NPP Pastviště u Fínů. V ex situ podmínkách byla zjištěná nejvyšší klíčivost semen v roce 2019. Semena odebraná na lokalitě Švařec ve sledovaném období vykazovala vyšší klíčivost (max. hodnota = 57,3 %) než z Pastviště u Fínů (max. hodnota = 35,8 %). Při zkoumání vlivu vláhových režimů různých typů biotopu, nebyl zjištěn významný vliv na klíčivost semen. Dále bylo zjištěno, že klíčivost semen nezávisí na počtu květů a počtu listů. Závislost klíčivosti semen na výšce stvolu byla potvrzena v roce 2021 u semen z lokality Švařec. Tento výsledek nebyl potvrzen v předešlém roce a ani u semen z druhé lokality. Obdobné výsledky vyšly u závislosti klíčivosti semen na počtu listových růžic, kdy v roce 2019 byla zjištěna závislost u semen z lokality Pastviště u Fínů, ale dalším sledováním nebyla potvrzená. Klíčivost semen odebraných v roce 2019 na lokalitě Pastviště u Fínů byla vyšší v ex situ podmínkách než v in situ podmínkách. Výsledky mohou být ovlivněné nerovnoměrným rozložením dat a nízkým počtem opakování. Semena v in situ podmínkách klíčila nejvíce na suchém stanovišti (průměrná hodnota 19 %), které studovaná orchidej preferuje.

Rozdílnost v klíčivosti semen v jednotlivých letech, mohlo být ovlivněno více faktory. Domnívám se, že nejvýznamnější vliv má množství srážek a jejich rozložení během roku, neboť mají vliv např. na okolní vegetaci. Klíčivost semen v roce 2019 mohl podpořit i nepříznivý rok 2018 a vyšší úhrn srážek v době tvorby semen v roce 2019. Následující rok 2020 byl zaznamenán nejvyšší úhrn srážek především v jarním období, to by mohlo vysvětlit nevyklíčení semen, ale z důvodu absence informací z druhé lokality, nelze přesně určit důvod. Semena v roce 2021 klíčila méně než ta z roku 2019. Opět zde mohl být vliv vyššího úhrnu srážek a rozdílnost jejich rozložení.

Zjištěná data by se dala použít pro dlouhodobé sledování vývoje klíčivosti semen na studovaných lokalitách a rozšíření poznatků o populační dynamice *Spiranthes spiralis* v České republice. Podrobnější výzkum, který by byl aplikován na obou lokalitách současně a obdobným způsobem by mohl odhalit rozdílnost lokalit. Navíc by dlouhodobý monitoring mohl přinést přesnější výsledky a ukázat jaké faktory ovlivňují rozdílnost klíčivosti semen během let.

10. Seznam literatury

Adams A. E. & Adams J. S. (1971): Men versus systems. Agriculture in the USSR, Poland, and Czechoslovakia. – Free Press, New York, USA.

Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky. Lokality, Národní přírodní památka Pastviště u Fínů [online databáze]. – Praha: © 2022 AOPK ČR [cit. 19.01.2022a]. Dostupné z: <http://www.ochranaprirody.cz/lokality/?idmzchu=909>

Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky. Lokality, Národní přírodní památka Švařec [online databáze]. – Praha: © 2022 AOPK ČR [cit. 19.01.2022b]. Dostupné z: <http://www.ochranaprirody.cz/lokality/?idmzchu=943>

Amador G. J., Matherne M., Waller D. A., Mathews M., Gorb S. N., Hu D. L. (2017): Honey bee hairs and pollenkitt are essential for pollen capture and removal. – *Bioinspiration & Biomimetics*, 12(2): 026015.

Anderson A. B. (1990): Asymbiotic germination of seeds of some North American orchids. In: Sawyers C. E. [ed.]: North American native terrestrial orchid propagation and production. – Chadds Ford, Pennsylvania: Brandywine Conservancy, 75–80.

Anderson A. B. (1991): Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (*Orchidaceae*). – *Lindleyana* 6: 183–186.

Anonymous (2009): Plán péče o Národní přírodní památku Švařec na období 2011–2021. – AOPK ČR, SCHKO Žďárské vrchy.

Anonymous (2014a): Plán péče o NPP Pastviště u Fínů na období 2015–2024. – AOPK ČR, SCHKO Český les, Přimda.

Anonymous (2014b): Koncepce záchranných programů a programů péče zvláště chráněných druhů živočichů a rostlin v České republice. – MŽP a AOPK ČR. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/programy_pece/\\$FILE/ODOIMZ_koncepce_20170905.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/programy_pece/$FILE/ODOIMZ_koncepce_20170905.pdf)

Arditti J. (1967): Factors affecting the germination of orchid seeds. – *The Botanical Review* 33(1): 1–97.

Arditti J. (2008): Micropropagation of orchids (2nd ed.), vol. II. – Blackwell Publishing Ltd., USA.

Bailarote B. C., Lievens B., Jacquemyn H. (2012): Does mycorrhizal specificity affect orchid decline and rarity? – *American Journal of Botany*, 99(10): 1655–1665.

Baskin C.C. & Baskin J. M. (2001): *Seeds: ecology, biogeography, an, evolution of dormancy and germination*. – Academic Press, San Diego, CA, 665.

Baskin J. M. & Baskin C. C. (2004): A classification system for seed dormancy. – *Seed science research* 14(1): 1–16.

Baskin C. C., Thompson K., Baskin J. M. (2006): Mistakes in germination ecology and how to avoid them. – *Seed Science Research* 16(3): 165–168.

Batty A. L., Dixon K. W., Brundrett M., Silvasithamparam K. (2001): Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. – *New phytologist* 152(3): 511–520.

Bečvářová P.H. (2020): Neviditelný glomalin prospívá půdě. – *Praha, Vesmír* 99: 94–95.

Brabec J.; Křenová Z.; Nesvadbová J. (2004): Švihlík krutiklas - pozoruhodný druh květeny ČR. – *Praha, Živa* 5: 209–201.

Brabec J., Ipser Z., Jersáková J., Malinová T., Balounová Z., Plesková L., Somol V., Brabec J., Krinke L., Štefánek M., Nesvadbová J. (2011): Populační dynamika, energetická náročnost kvetení a přežívání švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*) na tradičně obhospodařované lokalitě „NPP Pastviště u Fínů“. – *Praha, Příroda* 31: 185–200.

Brabec J. (2021): Podzimní monitoring a mapování švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*) v NPP Pastviště u Fínů. *Zprávy a materiály/2021*. – Český svaz ochránců přírody 13/18 základní organizace Silvatica.

Brundrett M. C. (2002): Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. – *New phytologist*, 154(2): 275–304.

Burgeff H. (1909): Die Wurzelpilze der Orchideen: ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze. – G. Fischer Verlag, Jena, 202.

Buscot F. (2015): Implication of evolution and diversity in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. – *Journal of plant physiology* 172: 55–61.

Cameron D. D., Johnson I., Leake J. R., Read D. J. (2007): Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. – *Annals of Botany* 99(5): 831–834.

Curtis J. T. (1936): The germination of native orchid seeds. – *American Orchid Society Bulletin* 5: 42–47.

Čech L., Šumpich J., Zabloudil V. et al. (2002): Jihlavsko. In: Mackovčín P., Sedláček M. [eds]: Chráněná území ČR, svazek VII. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR a EkoCentrum Brno, Praha.

Český hydrometeorologický ústav. Historická data, Denní data dle zákona 123/1998 Sb. [online] [cit. 17.03.2022b]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/denni-data/Denni-data-dle-z.-123-1998-Sb#>

Český hydrometeorologický ústav. Historická data, Měsíční a roční data dle zákona 123/1998 Sb. [online] [cit. 01.04.2022a]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/mesicni-data/mesicni-data-dle-z.-123-1998-Sb>

Dulić J., Ljubojević M., Ognjanov V., Barać G., Dulić T. (2019): In vitro germination and seedling development of two European orchid species, *Himantoglossum jankae* Somlyay, Kreutz & Óvári and *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. – *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 55(4): 380–391.

Dykyjová D. (2003): Ekologie střeoevropských orchidejí. – KOPP, České Budějovice.

Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J., Vosátka M. (2004): Mykorhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin. – Academia, Praha.

Hadley G. (1970): Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. – *New Phytologist* 69(4): 1015–1023.

Hamrick J. L. & Trapnell D. W. (2011): Using population genetic analyses to understand seed dispersal patterns. – *Acta Oecologica* 37(6): 641–649.

Harvais G. & Hadley G. (1967): The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultured. – *New Phytologist* 66: 217–230.

Harvais G. (1980): Scientific notes on a *Cypripedium reginae* of northwestern Ontario, Canada. – *American Orchid Society Bulletin* 49: 237–244.

Hill M. O., Preston C. D., Roy D. B. (2004): PLANTATT-tributes of British and Irish plants: status, size, life history, geography and habitats. – Centre for Ecology & Hydrology, Huntingdon, UK.

HiMedia Laboratories Pvt [online]: Product information: Orchid Maintenance Medium. HiMedia Laboratories Pvt. India. – Copyright @ 2012 HiMedia Laboratories. [cit. 25.02.2022]. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/PT055.pdf>

Hoban S. & Schlarbaum S. (2014): Optimal sampling of seeds from plant populations for ex-situ conservation of genetic biodiversity, considering realistic population structure. – *Biological Conservation* 177(9): 90–99.

Horníček L. (2022): Archivní data z meteostanice Bystřice nad Pernštejnem [online]. – In-počasí, © 2022 InMeteo,s.r.o. [cit. 17.03.2022]. Dostupné z: https://www.in-pocasi.cz/aktualni-pocasi/bystrice_nad_pernstejnem_pod_horou/?&typ=teplota&historie_bar_mesic=9&historie_bar_rok=2021#monthly_graph

Hosnedl V. (2022): Archivní data z meteostanice Chotěšov [online]. – In-počasí, © 2022 InMeteo,s.r.o. [cit. 17.03.2022]. Dostupné z: https://www.in-pocasi.cz/aktualni-pocasi/chotesov/?detailed_typ=teplota&historie=2016-04-22&detailed_usek=24#daily_graph

Hostička M. & Nesvadbová J. (1990): Monitoring populace kriticky ohroženého druhu *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. na trvalých plochách v CHPV Pastviště u Fínů. – Krajské středisko státní památkové péče a ochrany přírody v Plzni, Plzeň.

- Chen L. J., Liu K. W., Xiao X. J., Tsai W. C., Hsiao Y. Y., Huang J., Liu Z. J. (2012): The anther steps onto the stigma for self-fertilization in a slipper orchid. – PLoS One, 7(5): e37478.
- Christenhusz M. J. & Byng J. W. (2016): The number of known plants species in the world and its annual increase. – Phytotaxa 261(3): 201–217.
- Ipser Z. (2010): Využití obrazové analýzy při monitoringu kriticky ohroženého druhu *Spiranthes spiralis*. – Ms. [Bakalářská práce, depon in: Katedra biologických disciplín, Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.]
- Ipser Z. (2012): Vliv biotických a abiotických faktorů na populační dynamiku kriticky ohroženého druhu *Spiranthes spiralis*. – Ms. [Diplomová práce, depon in: Katedra biologických disciplín, Zemědělská univerzita Jihočeské univerzity, České Budějovice.]
- IUCN S. (2002): IUCN technical guidelines on the management of ex-situ populations for conservation. – Gland, Switzerland: IUCN.
- Jacquemyn H., Brys R., Vandepitte K., Honnay O., Roldán – Riuz I., Wiegand T. (2007): A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. – New Phytologist 176(2): 448–459.
- Jacquemyn H. & Hutchings M.J. (2010): Biological Flora of the British Isles: *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. – Journal of Ecology 98: 1253–1267.
- Jersáková J. & Kindlmann P. (2004): Zásady péče o orchidejová stanoviště. – KOPP, České Budějovice.
- Jersáková J., Johnson S. D., Kindlmann P. (2006): Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. – Biological reviews 81(2): 219–235.
- Ježek Z. (2003): Encyklopedie orchidejí. – Rebo Productions Dobřejuvice, 304.
- Johnson S. D. & Nilsson L. A. (1999): Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination systems in orchids. – Ecology 80(8): 2607–2619.

Kauth P. J., Vendrame W. A., Kane M. E. (2006): In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85(1): 91–102.

Kauth P. J., Dutra D., Johnson T. R., Stewart S. L., Kane M. E., Vendrame W. (2008): Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. In: da Silva T. [ed.]: *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*. – Global Science books, Volume 5: 375–391.

Kindlmann P. & Jersáková J. (2006): Effect of floral display on reproductive success in terrestrial orchids. – *Folia Geobotanica* 41: 47–60.

Kitsaki C. K., Zygouraki S., Ziobora M., Kintzios S. (2004): In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys species (Orchidaceae)*. – *Plant cell reports* 23(5): 284–290.

Knudson L. (1922): Nonsymbiotic germination of orchid seeds. – *Botanical gazette* 73(1): 1–25.

Knudson L. (1946): A new nutrient solution for the germination of orchid seed. – *American Orchid Society Bulletin* 15: 214–217.

Lindén B. (1992): Two new methods for pretreatment of seeds of Northern orchids to improve germination in axenic culture. – *Annales Botanici Fennici* 29: 305–313.

Machon N., Bardin P., Mazer S. J., Moret J., Godelle B., Austerlitz F. (2003): Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. – *New Phytologist* 157(3): 677–687.

Maloplošná zvláště chráněná území (MZCHÚ), Pastviště u Fínů [online]. – AOPK ČR, © T-MAPY spol. s r.o. [cit. 19.01.2022a]. Dostupné z: https://drusop.nature.cz/ost/chrobjekty/zchru/index.php?SHOW_ONE=1&ID=909

Maloplošná zvláště chráněná území (MZCHÚ), Švařec [online]. – AOPK ČR, © T-MAPY spol. s r.o. [cit. 19.01.2022b]. Dostupné z: https://drusop.nature.cz/ost/chrobjekty/zchru/index.php?SHOW_ONE=1&ID=943

Mapy.cz [online]. © Seznam.cz, a.s., 2020, © TopGis 26.08.2016. [cit. 25.05.2020]. Dostupné z: <https://mapy.cz/s/jomebasegu>

Masuhara G. & Katsuya K. (1994): In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *Amoena* (M. Bieberstein) Hara (*Orchidaceae*). – *New Phytologist* 127(4): 711–718.

Matějková I., Nesvadbová J., Brabec J., Somol V. (2015): Vegetační změny v NPP Pastviště u Fínů v letech 1987 až 2012. – *Sborník Západočeského muzea, Plzeň, Příroda* 119: 5–59.

Matějková I. (2019): Inventarizační průzkum NPP Pastviště u Fínů, floristika. In: *Monitoring a mapování vybraných druhů rostlin a živočichů a inventarizace maloplošných zvláště chráněných území v národně významných územích v České republice. Státní fond životního prostředí České republiky.*

Maunder M., Havens K., Guerrant E. O., Falk D. A. (2004): Ex situ methods: a vital but underused set of conservation resources. The evolution of ex situ plant conservation, 1. vydání, 7–13. – In: Guerrant E. O., Havens K., Maunder M. (2004): *Ex situ plant conservation: Supporting species survival in the wild*, 00003.

Maxted N. (2001): Ex situ, in situ conservation. In: Levin S. A. [ed.]: *Encyclopedia of Biodiversity*, Vol. 2. – Academic Press, San Diego, Ca, 683–695.

Mercier H., Souza B. M., Kraus J.E., Hamasaki R. M., Sotta B. (2003): Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. – *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15(2): 107–112.

Nesvadbová J., Čechil F., Gryc J., Hostička M., Kraft J., Nedorostová B., Sofron J., Vaněček J., Vondráček M., Žán M. (1987): Chráněný přírodní výtvar Pastviště u Fínů. – Inventarizační průzkum provedený v letech 1986–1987; depon. In: AOPK ČR, středisko Plzeň.

Nesvadbová J., Sofron J., Vondráček M. (1989): Die Vegetation des geschützten Naturgebildes Weide „U Fínů“ (Südwestböhmen, Gebiet von Sušice). – *Západočeské muzeum Plzeň, Plzeň.*

Nesvadbová J. & Pivoňková L. (1996): Monitoring populace *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. na trvalých plochách v národní přírodní památce Pastviště u Fínů. – *Praha, Příroda* 6: 95–104.

Nesvadbová J., Brabec J., Matějková I., Křenová Z. (2003). Populační biologie *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. na tradičně obhospodařované lokalitě „NPP Pastviště u Fínů“. – In.: Pivničková M. (ed.) (2003): Sborník dílčích zpráv z grantového projektu VaV 610/10/00 „Vliv hospodářských zásahů na změnu v biologické rozmanitosti ve zvláště chráněných územích“. Praha, Příroda 386: 189–195.

Panská A. (2020): Výskyt a reprodukční biologie kriticky ohrožené orchideje švihlíku krutiklasu (*Spiranthes spiralis*) v České republice. [bakalářská práce]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, katedra ekologie lesa, Praha.

Paušič I., Kaligarič M., Bakan B. (2017): Late seasonal mowing enhances central European *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. (*Orchidaceae*) population viability. – Botany Letters 164(4): 401–412.

Pešková V. (2008): Houby na kořenech lesních dřevin Mykorrhizy. Příloha Lesnické práce 12. Dostupné z: http://www.silvarium.cz/images/letaky-los/2008/2008_houby.pdf

Pérez-García F. (1997): Germination of *Cistus ladanifer* seeds in relation to parent materiál. – Plant Ecology 133: 57–62.

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.

Ponert J., Figura T., Vosolsobě S., Lipavská H., Vohník M., Jersaková J. (2013): Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (*Orchidaceae*) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. – Botany 91: 662–670.

Ponert J. (2016): Jak rostou orchideje ze semen. Praha, Živa 4: 168–171.

Prance G. T., Guerrant E. O., Havens K., Maunder M. (2004): Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild. – Program in Biological Sciences-Chicago Botanic Garden, 23–29.

- Primack R. & Stacy E. (1998): Cost of reproduction in the pink lady's slipper orchid (*Cypripedium acaule*, *Orchidaceae*): an eleven-year experimental study of three populations. – *American journal of botany* 85(12): 1672–1679.
- Procházka F. (1980): Naše orchideje. – Krajské muzeum východních Čech, Pardubice, 296.
- Procházka F. & Velíšek V. (1983): Orchideje naší přírody. – Academia, Praha.
- Procházka F. (2010): *Spiranthes* L. C. M. Richard - švihlík. – In: Štěpánková J., (ed): Květena ČR 8. Academia, Praha, 480–483.
- Procházka S. & Šebánek J. (1997): Regulátory rostlinného růstu. – Academia, Praha.
- Průša D. (2019): Orchideje České republiky (2. rozšířené vydání). – CPres, Brno.
- Rasmussen H. N., Anderson T. F., Johansen B. (1990): Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (*Orchidaceae*) With and without a mycorrhizal fungus. – *Plant, Cell & Environment* 13(2): 171–177.
- Rasmussen H. N. & Wigham D.F. (1993): Seed Ecology of Dust Seeds in Situ: A New Study Technique and Its Application in Terrestrial Orchids. – *American Journal of Botany* 80: 1374–1378.
- Rasmussen H. N. (1995): Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant – Cambridge University Press, Great Britain.
- Rasmussen H. N. & Whigham D. F. (1998): Importance of woody debris in seed germination of *Tipularia discolor* (*Orchidaceae*). – *American Journal of Botany* 85(6): 829–834.
- Rasmussen H. N. (2002): Recent developments in study of orchid mycorrhiza. – *Plant and Soil* 244: 149–163.
- Rasmussen H. N. & Rasmussen F. N. (2014): Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in *Orchidaceae*. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 175(3), 313–327.

- Reif J. Voříšek P., Šťastný K., Bejček V., Petr J. (2008): Agricultural intensification and farmland birds: new insights from a central European country. – *Ibis* 150(3): 596–605.
- Rout G. R. (2006): Effects of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. – *Plant growth regulation* 48(2): 111–117.
- Sarasan V., Cripps R., Ramsay M. M., Atherton C., McMichen M. O. N. I. C. A., Prendergast G., Rowntree J. K. (2006): Conservation in vitro of threatened plants – progress in the past decade. – *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 206-214.
- Sekerka P., Obdržálek J., Ponert J. (2006): *Orchideje na zahradě* (Vol. 83). – Grada Publishing a.s., Praha.
- Smith S.E. & Read D.J. (2008): *Mycorrhizal symbiosis*, third edition. – Academic Press, New York.
- Snow A. A. & Whigham D. F. (1989): Costs of flower and fruit production in *Tipularia discolor* (Orchidaceae). – *Ecology* 70(5): 1286–1293.
- Soó R. de (1980): *Dactylorhiza*. In: *Flora Europaea*, volume 5. – Alismatacea to Orchidaceae, s. 333–337. Cambridge: Cambridge University Press.
- Stroh, P.A. (2014): *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. Autumn Ladies-tresses. – Species Account, Botanical Society of Britain and Ireland.
- Suzuki N., Miller G., Sejima H., Harper J., Mittler R. (2012): Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in *Arabidopsis thaliana* plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. – *Journal of Experimental Botany* 64(1): 253–263.
- Swarts, N. D. & Dixon, K. W. (2009): Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. – *Annals of botany* 104: 543–556.
- Šmiták J. (2019): Ústní sdělení. Předseda Orchidea klubu Brno.

Štípková Z. & Kindlmann P. (2021): Orchid extinction over the last 150 years in the Czech Republic. – *Diversity* 13(2): 78.

Trávníček P., Čertner M., Ponert J., Chumová T., 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(4): 1642–1656.

Tyteca D. (2000): The orchid flora of Portugal: addendum n.3. Remarks on *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. And three new taxa to the Portuguese flora. – *Journal Europäischer Orchideen* 32: 291–347.

Vale A., Navarro L., Rojas D., Álvarez J. C. (2011): Breeding system and pollination by mimicry of the orchid *Tolumnia quibertiana* in Western Cuba. – *Plant Species Biology*, 26(2): 163–173.

van Waes J. M. (1984): In vitro studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideën. – Thesis, Rijkuniversiteit Gent.

van Waes J. M. & Debergh P. C. (1986a): In vitro germination of some Western European orchids. – *Physiologia Plantarum* 67: 253–261.

van Waes J. M. & Debergh P. C. (1986b): Adaptation of the tetrazolium method for testing seed viability and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. – *Physiologia Plantarum* 66: 435–442.

Vejsadová H. (2006): Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. – *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 109–113.

Wells T. C. E. (1967): Changes in a population of *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. at knocking Hoe National nature reserve, bedfordshire, 1962–65. – *The Journal of Ecology* 55: 83–99.

Wells T. C. E. (1981): Population ecology of terrestrial orchids. In: Syngé H. [ed.]: *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*. – Wiley, Chichester, UK, 281–295.

Wells T. C. E. & Kretz R. (1986): *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. – from seed to flowering plant in 5 years. – *Watsonia* 16: 235.

Whigham D. F., O'Neill J., McCormick M., Smith C., Rasmussen H., Caldwell B., Daniell T. (2002): Interactions between decomposing wood, mycorrhizas, and terrestrial orchid seeds and protocorms. In: Kindlmann P., Willems J. H., Whigham D. F. [ed.]: Trends and fluctuations and underlying mechanisms in terrestrial orchid populations. – Backhuys publishers, Leiden, The Netherlands, 171–131.

Willems J. H. (1982): Establishment and development of a population of *Orchis simia* Lamk. In the Netherlands, 1972 to 1981. – *New Phytologist* 91(4): 757–765.

Willems J. H. (1989): Population dynamics of *Spiranthes spiralis* in South-Limburg, The Netherland. – *Memoires de la Socié Royale de Botanique de Belgique* 11: 115–121.

Willems J. H. & Lahtinen M. L. (1997): Impact of pollination and resource limitation on seed production in a border population of *Spiranthes spiralis*. – *Acta Botanica Neerlandica* 46: 365–375.

Willems J. H. & Dorland E. (2000): Flowering frequency and plant performance and their relation to age in the perennial orchid *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. – *Plant Biology* 2(03): 344–349.

Willems J. H., Balounová Z., Kindlmann P. (2001): The effect of experimental shading on seed production and plant survival in the threatened species *Spiranthes spiralis* (*Orchidaceae*). – *Lindleyana* 16: 31–37.

Willems J. H. (2006): Herfstchroeforchis: portret van een laatbloeier. – Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht, The Netherlands.

Williams N. H. (1982): The biology of orchids and euglossine bees. In: Arditti [ed.]: *Orchid biology: reviews and perspectives*, II, s 119–171. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

Wodrich K. (1997): *Growing South African Indigenous Orchids*. – A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands.

Yang F. S., Sun A. H., Zhu J., Downing J., Song X. Q., Liu H. (2017): Impacts of Host Trees and Sowing Conditions on Germination Success and a Simple Ex Situ Approach to Generate Symbiotic Seedlings of Rare Epiphytic Orchid Endemic to Hainan Island, China. – *The Botanical Review* 83: 74–86.

Yoder J. A., Zettler L. W., Stewart S. L. (2000): Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. – *Plant Science* 156(2): 145–150.

Zhang S., Yang Y., Li J., Qin J., Zhang W., Huang W., Hu H. (2018): Physiological diversity of orchids. – *Plant diversity* 40(4): 196–208.