

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ekologie lesa

**Charakteristika výskytu vstavače nachového (*Orchis
purpurea* Huds.) na vybraných lokalitách ČR a možnosti
jeho růstu v *in situ* a *ex situ* podmínkách**

Diplomová práce

Autor: Dominika Kozlovská

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

2022

Zadání BP

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Dominika Kozlovská

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Charakteristika výskytu vstavače nachového (*Orchis purpurea* Huds.) na vybraných lokalitách ČR a možnosti jeho růstu v in situ a ex situ podmínkách

Název anglicky

Population characteristic of *Orchis purpurea* Huds. in selected localities of the Czech Republic, and possibilities to reproduce in situ conditions and ex situ incubation

Cíle práce

Cílem práce je vytvořit diplomovou práci se zřetelem na sledování přírodních lokalit výskytu vstavače nachového v ČR a možnosti jeho růstu v in situ a ex situ podmínkách. V této souvislosti budou vybrány a zmapovány přírodní lokality jeho výskytu, v rámci několika krajů ČR. Tyto lokality s odlišnou populační abundancí, budou porovnávány v závislosti na zjištěném stavu populace, fitness jednotlivých rostlin, míře zastínění, ekologických podmínkách na stanovišti a stanovištní charakteristice. U vybraných jedinců s rozdílnými fitness parametry, budou odebrány uzavřené zralé tobočky a porovnána jejich schopnost klíčení v in situ i in vitro podmínkách.

Metodika

- 1) Vytvoření literární rešerše o výskytu vstavače nachového v ČR a možnostech jeho růstu v in situ a ex situ podmínkách, za účelem ověření životnosti a klíčivosti semen.
- 2) Navrhnutí metodiky pro založení experimentu pro ověření životnosti a klíčivosti semen vstavače nachového
- 3) Návštěvy vybraných lokalit s výskytem vstavače nachového a vytváření záznamu o stanovištních podmínkách a stavu populace orchidejí
- 4) Odebrání tobolek a hodnocení množství a kvality semen dle jedinců
- 5) Založení pokusů ex situ (v půdě) a v in vitro podmínkách
- 6) Průběžné sledování a hodnocení klíčení semen v in vitro podmínkách
- 7) Zhodnocení získaných informací
- 8) Vypracování a odevzdání diplomové práce

Doporučený rozsah práce

60-70 stran

Klíčová slova

Ex situ, germinace, in situ, in vitro, *Orchidaceae*, živná média

Doporučené zdroje informací

- 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 Cell.Dev.Biol.-Plant* 55: 380–391. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09997-z>
- Jacquemyn, H., Brys, R., Vandepitte, K., Honnay, O., Roldán-Ruiz, I. and Wiegand, T. (2007): A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist*, 176: 448-459. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02179.x
- Jacquemyn, H., Vandepitte, K., Brys, R., Honnay, O., Roldán-Ruiz, I. (2007): Fitness variation and genetic diversity in small, remnant populations of the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Biological Conservation*, 139(1–2): 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.06.015>
- Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K., Lipavská, H. (2011): European orchid cultivation – from seed to mature plant *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2): 95–107.
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., Těšitelová, T. (2015): Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of botany*, 116(3): 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- Tsiftsis, S., Djordjević, V. (2018): Habitat effects and differences in the reproductive success of *Orchis punctulata* and *Orchis purpurea* (Orchidaceae). *Turk J Bot*, 42: 1-12. <https://doi.org/10.3906/bot-1711-22>
- Walsh, R. P., Michaels, H. J. (2017): When it pays to cheat: Examining how generalized food deception increases male and female fitness in a terrestrial orchid. *PLoS ONE*, 12(1): e0171286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171286>
-

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jan Vítámvás, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie lesa

Elektronicky schváleno dne 22. 2. 2021

prof. Ing. Miroslav Svoboda, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 28. 3. 2021

prof. Ing. Róbert Marušák, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 10. 10. 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Charakteristika výskytu vstavače nachového (*Orchis purpurea* Huds.) na vybraných lokalitách ČR a možnosti jeho růstu v *in situ* a *ex situ* podmínkách vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jana Vítámváse, Ph.D. a použila jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Fotografie, u kterých není v popisku uveden autor, jsou mé vlastní.

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 Praze, dne

Podpis autora

Poděkování

Ráda bych poděkovala za podporu, vedení, rady, nesčetné pomoci a prokonzultované hodiny zejména mému vedoucímu práce Ing. Janu Vítámvásovi Ph.D., mé odborné konzultantce Mgr. Radce Broumové a panu Mgr. Petru Karlíkovi Dr. rer. nat. Dále mé velké díky patří celé mé rodině, přátelům a kolegům. Na závěr děkuji ČZU za poskytnutí příležitosti, prostorů pro realizaci výzkumu a skvělých vyučujících.

Abstrakt

Suché teplomilné lesy, xerothermní a subxerothermní trávníky a křovinaté stráně hostí celou řadu chráněných a ohrožených druhů rostlin, přičemž jedním z typických druhů je terestrická orchidej vstavač nachový (*Orchis purpurea* Huds). Předmětem práce je zhodnocení stavu populací zmíněného druhu na šesti lokalitách v České republice a dále porovnání schopnosti klíčivosti a životnosti jeho semen v *in situ* a *ex situ* podmínkách v závislosti na lokalitě, parametrech fitness zkoumaných jedinců rostlin a způsobu stratifikace. Dalším tématem byla účinnost kinetinu a aktivního uhlí přidávaných do média.

Výsledné hodnoty potvrzují, že životaschopnost a klíčivost semen závisí na konkrétní lokalitě, kategorii parametrů fitness rostlin a na přidání kinetinu a aktivního uhlí do média. Klíčivost semen se pohybovala v rozmezí od 0,49 % do 8,5 %. Překvapujícím zjištěním je, že i malé vymírající lokality mohou mít vysokou klíčivost semen a že větší a chráněné lokality mohou mít klíčivost semen poměrně nízkou. Také, že vysoká životaschopnost semen nemusí znamenat, že semena budou mít zároveň vysokou klíčivost semen. Rozdílné výsledky v životaschopnosti a klíčivosti semen v závislosti na lokalitě mohou být způsobeny nepříznivými historickými událostmi, například opakujícími se populačními propady a obnovami, které mohou silně ovlivnit genetickou diverzitu a prostorově genetickou strukturu populací, nebo vlivem inbrední deprese. Dalším zjištěním bylo, že rostliny s průměrnými parametry fitness mají pravděpodobně nejkvalitnější semena, což může být způsobeno tím, že drobnější rostliny z xerothermních stanovišť rostoucích v ekologickém optimu své realizované niky, mohou být zvýhodněny, například díky charakteru biotopů mohou dosahovat lepšího opylení. V rámci přidruženého pokusu byla prokázána účinnost přidání kinetinu spolu s aktivním uhlím do média BM1 pro podporu životaschopnosti semen a s velkou pravděpodobností i klíčivosti semen.

Zjištěné poznatky lze uplatnit při cílenější ochraně tohoto druhu, a to jak v praktické územní ochraně, tak i v případných záchranných programech *in vitro*.

Klíčová slova: *ex situ*, *in vitro*, klíčivost semen, médium, ohrožené druhy, *Orchideacea*, *Orchis purpurea*, parametry fitness rostlin, stratifikace semen, terestrické orchideje, životaschopnost semen.

Abstract

Dry thermophilic forests, xerothermic and subxerothermic lawns, and shrubby slopes host a variety of protected and endangered plant species, with one of the typical species being the purple terrestrial orchid (*Orchis purpurea* Huds). The subject of the thesis is to evaluate the state of populations of the mentioned species at six localities in the Czech Republic and to compare the germination ability and viability of its seeds *in situ* and *ex situ* conditions depending on the locality, fitness parameters of the examined plants and the method of stratification. Another topic was the effectiveness of kinetin and activated carbon added to the medium.

The resulting values confirm that the viability and germination of the seeds depend on the specific location, the category of plant fitness parameters, and the addition of kinetin and activated carbon to the medium. Germination of seeds ranged from 0.49 % to 8.5 %. A surprising finding is that even small extinction sites can have high seed germination and, conversely, larger and protected sites can have relatively low seed germination. In addition, the high viability of the seeds does not necessarily mean that the seeds will have high seed germination at the same time. Depending on the location, different results in seed viability and germination may be due to adverse historical events, such as recurrent population declines and recoveries, which may strongly affect the genetic diversity and spatial genetic structure of populations, or due to inbred depression.

Furthermore, it was found that plants with average fitness parameters probably have the highest quality of seeds. The reason may be that smaller plants from xerothermic habitats growing in the ecological optimum of their realized niche may be advantaged, for example, due to the character of the habitat they can achieve better pollination. The effectiveness of adding kinetin together with activated carbon to the BM1 medium to promote seed viability and most likely seed germination has been demonstrated in an associated experiment.

The findings can be applied to more targeted protection of this species, both in practical territorial protection and in possible *In vitro* rescue programs.

Keywords: *Ex Situ*, *In vitro*, seed germination, medium, endangered species, *Orchideacea*, *Orchis purpurea*, plant fitness parameters, seed stratification, terrestrial orchids, seed viability

1 Obsah

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | Obsah..... | 9 |
| 2 | Úvod..... | 15 |
| 3 | Cíle..... | 16 |
| 4 | Literární rešerše..... | 17 |
| 4.1 | Terestrické orchideje..... | 17 |
| 4.1.1 | Rozmnožování..... | 17 |
| 4.1.2 | Orchidejová mykorhizní symbióza..... | 19 |
| 4.1.3 | Semena a jejich klíčivost..... | 20 |
| 4.1.4 | Stanovištní a světelné nároky..... | 23 |
| 4.1.5 | Ohrožení..... | 24 |
| 4.1.6 | Ochrana..... | 26 |
| 4.1.6.1 | Pěstování orchidejí..... | 27 |
| 4.1.6.1.1 | Výsevy orchidejí v podmínkách ex situ..... | 27 |
| 4.1.6.1.2 | Výsevy orchidejí v podmínkách in vitro..... | 28 |
| 4.2 | Druh <i>Orchis purpurea</i> | 37 |
| 4.2.1 | Popis a charakteristika druhu..... | 37 |
| 4.2.2 | Rozšíření v České republice..... | 40 |
| 4.2.3 | Rozšíření ve světě..... | 40 |
| 4.2.4 | Ohrožení a ochrana druhu <i>Orchis purpurea</i> | 40 |
| 4.3 | Zkoumané lokality..... | 42 |
| 4.3.1 | Přírodní rezervace Milská stráň..... | 44 |
| 4.3.2 | Národní přírodní rezervace Karlštejn..... | 46 |
| 4.3.3 | PP Chotuc..... | 47 |
| 4.3.4 | NPR Čtvrtě..... | 49 |
| 4.3.5 | Skalička..... | 50 |
| 4.3.6 | Kryry..... | 51 |
| 5 | Metodika..... | 53 |
| 5.1 | Terénní práce:..... | 53 |
| 5.2 | Laboratorní práce..... | 54 |
| 5.2.1 | Výsevy semen metodou in vitro..... | 54 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 5.2.1.1 | Příprava živných médií | 54 |
| 5.2.1.2 | Stratifikace (povrchová sterilizace a skarifikace semen)..... | 57 |
| 5.2.1.3 | Dokončení práce po výsevu semen a uskladnění vzorků | 59 |
| 5.2.1.4 | Vyhodnocení vzorků..... | 59 |
| 5.2.1.4.1 | Životoschopná a neživotoschopná semena | 60 |
| 5.2.1.4.2 | Protokormy | 62 |
| 5.2.2 | Výsevy semen metodou <i>ex situ</i> | 63 |
| 5.2.2.1 | Práce s daty | 64 |
| 6 | Výsledky..... | 65 |
| 6.1 | Výsevy semen metodou <i>ex situ</i> | 65 |
| 6.2 | Výsevy semen metodou <i>in vitro</i> | 67 |
| 6.2.1 | Závislost životoschopnosti a klíčivosti semen na lokalitě..... | 68 |
| 6.2.2 | Závislost životoschopnosti a klíčivosti semen na parametrech fitness | 75 |
| 6.2.3 | Závislost životoschopnosti a klíčivosti semen na druhu média | 79 |
| 7 | Diskuse | 81 |
| 7.1 | <i>Ex situ</i> výsevy semen | 81 |
| 7.2 | <i>In vitro</i> výsevy semen..... | 81 |
| 7.2.1 | Životoschopnost a klíčivost semen v závislosti na způsobu stratifikace | 82 |
| 7.2.2 | Životoschopnost a klíčivost semen v závislosti na lokalitě | 83 |
| 7.2.3 | Životoschopnost a klíčivost semen v závislosti na parametrech fitness | 85 |
| 7.2.4 | Životoschopnost a klíčivost semen v závislosti na druhu média | 86 |
| 8 | Závěr..... | 87 |
| 9 | Citovaná literatura..... | 89 |
| 10 | Seznam internetových zdrojů..... | 95 |
| 11 | Seznam příloh..... | 96 |
| 12 | Přílohy..... | 96 |

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Rozkvétající květ <i>Orchis purpurea</i> na Milské stráni, ilustrační obrázek. | 16 |
| Obrázek 2: <i>Cetonia aurata</i> s přilepenou brylkou na tykadle, sedící na <i>Orchis pallens</i> , | 18 |
| Obrázek 3: Komplexní faktory ovlivňující klíčení semen a růst semenáčků, obrázek upraven | 23 |
| Obrázek 4: Přesazení druhu <i>Spiranthes spiralis</i> z podmínek <i>in vitro</i> | 27 |
| Obrázek 5: Rostliny druhu <i>Spiranthes spiralis</i> pěstované v podmínkách <i>in vitro</i> | 29 |
| Obrázek 6: Připravená média, semena v injekčních stříkačkách a dezinfekční roztoky pro výsevy semen druhu <i>Orchis purpurea</i> | 37 |
| Obrázek 7: Kvetoucí <i>Orchis purpurea</i> , PR Milská stráň | 38 |
| Obrázek 8: Mapa se zakreslenými lokalitami, které byly předmětem výzkumu. Jednotlivé lokality jsou označeny číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry), mapa byla připravena v programu Mapomat.exe (2. 0. 0. 8.), který online poskytuje Agentura ochrany přírody a krajiny ČR | 42 |
| Obrázek 9: PR Pohled na Milskou stráň v první polovině dubna v roce 2019..... | 45 |
| Obrázek 10: Milská stráň, rostliny druhu <i>Orchis purpurea</i> rostoucí na xerothermním stanovišti | 46 |
| Obrázek 11: Lokalita v NPR Karlštejn, foto Radka Broumová..... | 47 |
| Obrázek 12: Odkvétající jedinci druhu <i>Orchis purpurea</i> v PP Chotuc, foto Radka Broumová | 48 |
| Obrázek 13: Lokalita v NPR Čtvrtě, foto Radka Broumová | 49 |
| Obrázek 14: Druh <i>Orchis purpurea</i> na lokalitě u obce Skalička, foto Radka Broumová | 51 |
| Obrázek 15: Stráň u města Kryr..... | 52 |
| Obrázek 16: Připravená média, dezinfekční látky a semena druhu <i>Orchis purpurea</i> v injekčních stříkačkách pro výsevy v roce 2020 | 59 |
| Obrázek 17: Vzorčky semen a protokormů druhu <i>Orchis purpurea</i> připravené k focení na mikroskopu Leica | 60 |
| Obrázek 18: Životoschopná semena (semena s vyvinutým embryem) druhu <i>Orchis purpurea</i> | 61 |
| Obrázek 19: Neživotoschopná semena (semena s nevyvinutým embryem) druhu <i>Orchis purpurea</i> | 61 |

| | |
|--|----|
| Obrázek 20: Vyvinuté protokormy druhu <i>Orchis purpurea</i> foceny mikroskopem Leica DVM6 M | 62 |
| Obrázek 21: Vyvinutý protokorm druhu <i>Orchis purpurea</i> focen mikroskopem Leica DVM6 M | 62 |
| Obrázek 22: Graf popisující podíl životaschopných semen z nalezených v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p=0,216$ | 66 |
| Obrázek 23: Graf popisující podíl životaschopných semen z nalezených v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení parametrů fitness je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p=0,309$ | 67 |
| Obrázek 24: Graf popisující životaschopnost semen (počet životaschopných semen vč. protokormů) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p<0,001$ | 69 |
| Obrázek 25: Graf popisující životaschopnost semen (počet životaschopných semen vč. protokormů) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p<0,001$ | 70 |
| Obrázek 26: Graf popisující životaschopnost semen (počet životaschopných semen vč. protokormů) v závislosti na lokalitě. K této analýze byl použit soubor dat určený primárně k zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1 v závislosti na životaschopnosti a klíčivosti semen. Jednalo se o celkové počty životaschopných semen včetně protokormů z výsevů na médiích 1 až 4. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p<0,001$ | 71 |
| Obrázek 27: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. | |

6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = <0,001$.

..... 72

Obrázek 28: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Mílská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p = 0,085$.

..... 73

Obrázek 29: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na lokalitě. K této analýze byl použit soubor dat určený primárně k zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1 na životaschopnosti a klíčivosti semen. Jednalo se celkové počty vyklíčených semen z výsevů na médiích 1 až 4. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Mílská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,002$.

..... 74

Obrázek 30: Graf popisující životaschopnost semen (životaschopná semena vč. protokormů) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,012$.

..... 75

Obrázek 31: Graf popisující životaschopnost semen (životaschopná semena vč. protokormů) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,009$.

..... 76

Obrázek 32: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,005$.

..... 77

Obrázek 33: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p = 0,082$.

..... 78

Obrázek 34: Graf popisující životaschopnost semen (životaschopnost semen vč. protokormů) v závislosti na druhu média. K této analýze byl použit soubor dat určený ke zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení médií je zobrazeno číselně: médium č. 1 (BM1+AC), médium č. 2 (BM1), médium č. 3 (BM1+KIN), médium č. 4 (BM1+AC+KIN). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p=0,017$ 79

Obrázek 35: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na druhu média. K této analýze byl použit soubor dat určený ke zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení médií je zobrazeno číselně: médium č. 1 (BM1+AC), médium č. 2 (BM1), médium č. 3 (BM1+KIN), médium č. 4 (BM1+AC+KIN). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p=0,071$ 80

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: Počet semen v rostlině vs. v tobolce vybraných orchidejí, zkrácená a upravená tabulka dle Ardritti a Ghani (2000)..... | 20 |
| Tabulka 2: Rozměry a objem semen vybraných orchidejí, zkrácená a upravená tabulka dle Ardritt a Ghani, (2000)..... | 21 |
| Tabulka 3: složení použitých médií pro vybrané druhy orchidejí ve výzkumné práci Ponerta a kol. (2011)..... | 32 |
| Tabulka 4: Upravená tabulka složení živných médií z publikace Dulić a kol., (2019)..... | 34 |
| Tabulka 5: Přehledová tabulka jednotlivých lokalit a jejich nadmořské výšky, biotopu, fytogeografického obvodu a okresu a počtu jedinců sledovaného druhu rostoucí v dané populaci, Skalický (1988)..... | 43 |
| Tabulka 6: Rozměry kategorií rostlin podle kategorií parametrů fitness..... | 53 |
| Tabulka 7: Složení a množství látek obsažených v živném médiu, upravená tabulka z webové stránky www.phygenera.de | 56 |
| Tabulka 8: Tabulka zobrazující druhy médií a jejich složení, které byly použity pro přidružený pokus, který si kladl za cíl prokázat účinnost kinetinu a aktivního uhlí přidávaných do média BM1 na životaschopnost a klíčivost semen..... | 57 |
| Tabulka 9: Používané číselné označení porovnávacích kategorií..... | 64 |
| Tabulka 10: Výsledky statistických analýz z výsevů ex situ..... | 66 |
| Tabulka 11: Výsledky statistických analýz z výsevů in vitro..... | 68 |

2 Úvod

Orchideaceae (vstavačovitě) je čeleď suchozemských, jednoděložných a krytosemenných rostlin. Tato čeleď je jednou z největších čeledí semenných rostlin čítající okolo 27 000 druhů, spolu s čeledí *Asteraceae* (Stern, 2014).

Většina druhů čeledi *Orchideaceae* se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech Ameriky, Asie, Afriky a Austrálie, přičemž největší koncentrace výskytu druhů orchidejí jsou v amerických a asijských tropech. V Evropě roste přibližně 500 druhů a v České republice se můžeme pozorovat 70 druhů a poddruhů (Průša, 2005).

Tato čeleď rostlin je jednou z nejohroženějších na světě, proto také v České republice jsou všechny zde rostoucí druhy orchidejí součástí úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin CITES a Červeného seznamu České republiky.

Orchideje jsou pro vědce stále ještě v mnoha ohledech velkou neznámou, a to jednak protože jsou stále popisovány nové druhy, které ještě nejsou detailně prozkoumány, ale také především pro složitý životní cyklus, kterými se vyznačují. Tyto rostliny mají totiž životaohrožující podmínku, a to mykorhizní symbiózu, proto je velmi obtížné orchideje pěstovat v kultuře a vracet zpět na původní stanoviště (Jersáková a Kindlmann, 2004).

Práce byla zaměřena na zástupce rodu *Orchis* (vstavač), konkrétně *Orchis purpurea* (vstavač nachový), jehož výskyt je vázán jak na lesy, lesní lemy, lesostepní lady, ale i na xerothermní, subxerothermní trávníky a křovinaté porosty (Jersáková a Kindlmann, 2004, Štěpánková, 2010).

Výzkum byl prováděn v PR Milská stráň, kde se vyskytuje pravděpodobně nejpočetnější populace tohoto druhu v České republice, která čítá až tisíc kvetoucích jedinců. Další sledované lokality se nachází v NPR Karlštejn, PP Chotuc, NPR Čtvrtě, lokalita v blízkosti obce Skalička a v blízkosti města Kryry. Jedná se tedy o šest lokalit v Čechách a každá lokalita má naprosto odlišné ekologické a stanovištní podmínky.



Obrázek 1: Rozkvétající květ *Orchis purpurea* na Mílské stráni, ilustrační obrázek

3 Cíle

Cílem této práce je zhodnocení stavu populací druhu *Orchis purpurea* na šesti lokalitách v České republice a dále porovnání schopnosti klíčivosti a životnosti semen v *in situ* a *ex situ* podmínkách v závislosti na lokalitě, kategorii parametrů fitness zkoumaných jedinců rostlin a způsobu stratifikace semen.

Zjišťování schopnosti klíčení orchidejí by nám také mohlo ujasnit, zda na větších a chráněných lokalitách v porovnání s maloplošnými vymírajícími lokalitami jsou rostliny stále schopny vyprodukovat tobolky se životaschopnými semeny, jelikož je pravděpodobné, že budou trpět inbrední depresí. Proto by tyto zjištěné výsledky byly velmi přínosné pro ochranu malých vymírajících populací.

Dalším cílem této práce je prokázat účinnost kinetinu (cytokinin) a aktivního uhlí přidaných do média BM1 rostlin u sledovaného druhu na životaschopnost a klíčivosti semen.

Zjištěné výsledky by mohly přispět k lepšímu poznání ekologických nároků tohoto druhu v České republice. Dále je bude možné uplatnit při plánování péče pro podobné lokality, nebo ty které byly součástí výzkumu. Také by tyto výsledky mohly

pomoci při určení optimálních podmínek vhodných z hlediska rozšíření a reprodukce druhu. A v neposlední řadě mohou postupy pro *in vitro* a *in situ* výsevů daného druhu posloužit jako inspirace pro další případné pokusy a případné záchranné programy u daného druhu.

4 Literární rešerše

4.1 Terestrické orchideje

Orchideje se rozdělují dle adaptace na prostředí ve kterém se vyskytují na terestrické, epifytické (žijící v korunách stromů) a litofytické (žijící na kamenném podloží) (Nash, Croix, 2007).

V našich evropských podmínkách se jedná o terestrické orchideje, které se převážně vyskytují v mírném pásu severní polokoule. Hlavním znakem terestrických orchidejí je, že část roku v období klidu přežívají zataženy do kořenových hlíz nebo oddenků (Ježek, 2003).

Terestrické orchideje jsou nesmírně rozmanité a pestré v mnoha ohledech, od morfologie, přes mechanismy opylení, rozmnožování, až po ekologii jednotlivých druhů. Následující podkapitoly jsou proto zaměřeny na několik témat důležitých pro pochopení problematiky a specifického způsobu života orchidejí.

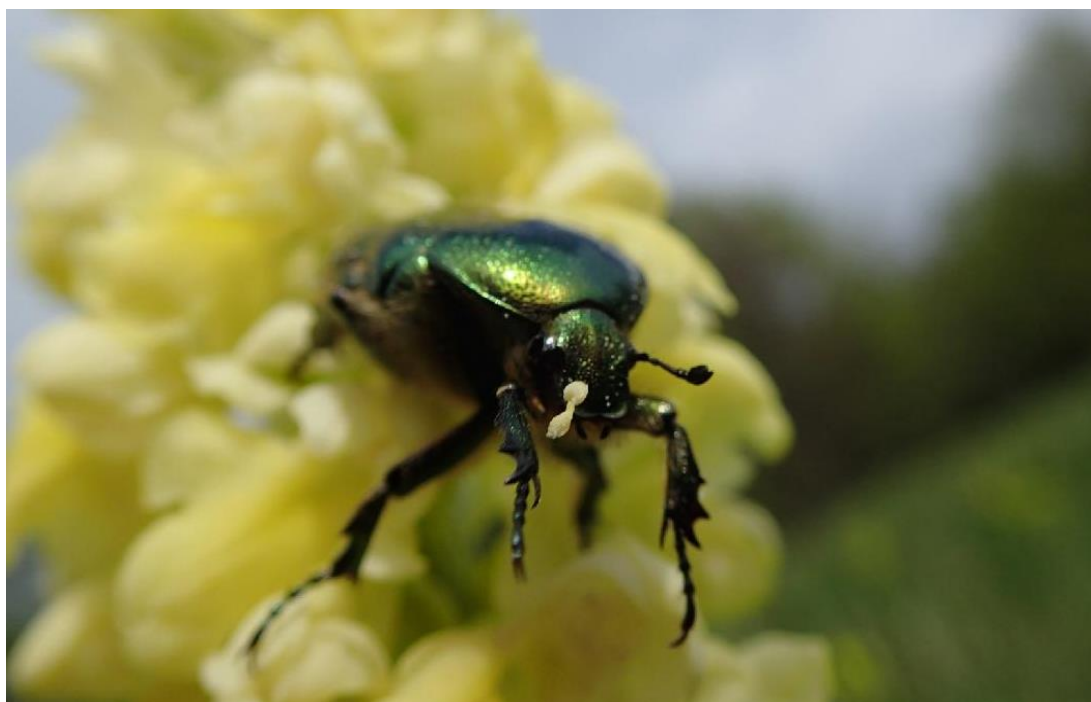
4.1.1 Rozmnožování

Druhy orchidejí se rozmnožují pohlavním (generativním) a nepohlavním (vegetativním) způsobem. V rámci pohlavního rozmnožování jsou orchideje vyskytující se v České republice nejčastěji opylovány druhy hmyzu řádu blanokřídlí a motýli. Většina druhů je opylována více druhy opylovačů, avšak některé druhy jsou závislé na konkrétním druhu opylovače. Proto, když se v takovém případě přestane konkrétní opylovač na dané lokalitě vyskytovat, dojde k tomu, že rostliny přestanou mít opylovány květy a nebudou se moci dále rozmnožovat (Jersáková a Kindlmann, 2004). Vůči tomuto ohrožení se některé orchideje začaly adaptovat využíváním autogamie, zejména v těchto ztížených podmínkách. K autogamii dochází jak v otevřených květech, tak také v uzavřených (Procházka a Velísek 1983).

Orchideje mohou vábit opylovače několika způsoby, pomocí nektaru, pylu, sexuálních atrap nebo vonných látek. Orchideje, které využívají vonné látky, se často

nazývají šálivé orchideje. Tyto orchideje pyl hmyzu nenabízí, jelikož tvorba pylu navíc jako zdroj potravy je pro ně velmi zatěžující, s ohledem na jejich reprodukci (Pruša, 2005).

Některé druhy orchidejí také lákají opylovače sexuálními atrapami, což znamená, že napodobují různé druhy samic hmyzích opylovačů, rostlina tedy opylovače láka příslibem sexuálního potěšení (Pruša, 2005). O přizpůsobení květů specifickým druhům opylovačů pojednává také Čačko (2013), který uvádí, že za dlouhá tisíciletí vývoje rostliny a hmyz začaly spolupracovat a začaly se vzájemně přizpůsobovat. Rostliny pro své rozmnožovací orgány vytvořily různé atraktivní okvětní lístky, aby je hmyz snadněji spatřil. Například druhy rodu *Ophrys* napodobující svým tělem různé druhy členovců.



Obrázek 2: *Cetonia aurata* s přilepenou brylkou na tykadle, sedící na *Orchis pallens*,
foto: Miroslav Broum

Samotné opylení, přímo u vstavačů, probíhá následovně. Květ s pyskem, který je vybaven trubkovitou ostruhou ukrývá brylky (samostatný reprodukční orgán složené z pestíků a tyčinek). Tyto brylky se terčíkem přilepí na kořen sosáku nebo hlavu opylovače v podobě dvou trčících růžků, kterými jsou dále přenášeny jako jeden celek z jednoho květu na květ (Dykyjová, 2003), viz obrázek č. 2.

Opylené květy se následně vyvinou do tobolek, které v sobě obsahují mnoho miniaturních semen bez zásobních látek, které se proto velmi dobře přenáší pomocí větru i na velké vzdálenosti. Počet semen u našich druhů orchidejí v jedné zralé tobolce se pohybuje v řádech tisíců kusů (Průša, 2005), viz tabulka č. 1.

Orchideje ke svému rozmnožování využívají také vegetativní způsob. Vegetativní rozmnožování je typické pro druhy mírného a studeného pásma a v oblastech s dlouhotrvajícím obdobím sucha. Jelikož v nepříznivém ročním období přežívají pomocí vytrvalých podzemních orgánů (hlíz, oddenků, kořenů) z nichž se obnovují nadzemní lodyhy. Pomocí těchto orgánů se orchideje rozmnožují, což podmiňuje v rozsahu původního stanoviště šíření jedinců ve skupinách (Dykyjová, 2003).

4.1.2 Orchidejová mykorhizní symbióza

Jedním z životně důležitých faktorů orchidejí je mykotrofní symbióza. Symbióza mezi houbou a orchidejí je významná jak při výměně látek a vývoji hlíz, tak také při vlastním klíčení, kdy semena rostlin, bez této symbiózy v přirozených podmínkách nemohou vyklíčit (Dykyjová, 2003; Procházka, 1980). O neschopnosti vyklíčení orchidejí bez mykorhizy pojednávají také Procházka a Velíšek (1983), kteří uvádí, že semena orchidejí začnou klíčit ve vhodných podmínkách vždy, ale po započetí vývojových procesů musí dojít k houbové infekci a vzniku mykorhizy. V heterotrofní fázi podzemního vývoje je mykorhiza jediným prostředkem, kterým může vstavačovitá rostlina získávat potřebné zásobní nebo stavební látky.

Proces výměny látek mezi orchidejí a houbou není zdaleka detailně prozkoumán. Avšak je již známo, že houba rostlině zajišťuje fosfor, organické látky, dusík a vodu. Rostlina na oplátku poskytuje houbám část uhlíkatých látek, také může produkovat exsudáty, které mohou příznivě ovlivnit růst houby (Průša, 2005).

Avšak u některých orchidejí se nejedná o klasickou symbiózu, ale o postupný přechod k parazitismu. Houbové vlákno nejprve pronikne do klíčícího semene a začne ho vyživovat přísunem cukrů a snad i vitamínů a hormonálních látek. Houbová vlákna se následně přesunou do kořenů rostliny. Houby v kořenech vytvářejí klubíčka, která jsou postupně orchidejovými pletivy stravována (pomocí obraných látek, které rostlina vyrábí fotosyntézou (Dykyjová, 2003) a některé orchideje tímto způsobem houbu následně usmrtí (Ježek, 2012).

4.1.3 Semena a jejich klíčivost

Klíčení semen je klíčovou událostí v životě rostliny a je vysoce regulováno faktory prostředí. U suchozemských orchidejí představuje klíčení limitující krok pro pěstování rostlin ze semen (Dulić a kol., 2019).

Orchideje se vyznačují tím, že mají velice malá semena, v řádu desetin milimetrů a v jedné tobolce se může vyskytovat až několik tisíc semen (Průša, 2005). Konkrétní rozměry semen dosahují rozmezí 0,07–0,40 mm na délku a 0,11–1,97 mm na šířku (Rasmussen, 1995). Konkrétní ukázka rozměrů semen a počty semen v jedné tobolce u několika druhů terestrických orchidejí jsou zobrazeny v tabulce č. 1 a 2.

Tabulka 1: Počet semen v rostlině vs. v tobolce vybraných orchidejí, zkrácená a upravená tabulka dle Arditti a Ghani (2000)

| Terestrické orchideje | | |
|-------------------------------|-----------------------|---|
| Druh | Počet semen v tobolce | Reference |
| <i>Orchis maculata</i> | 6 200 | Darwin, 1904; Lenz a Wimber, 1959 |
| <i>Orchis morio</i> | > 40 000 | Tournay, 1960 |
| <i>Platanthera chlorantha</i> | 25 000 | Tournay, 1960 |
| <i>Rhizanthella gardenri</i> | 20–50 | George a Cooke, 1981 |
| <i>Stanhopea</i> | > 1 000 000 | Malguth, 1901 citing F. Cohn a E. Pfitzer |

Tabulka 2: Rozměry a objem semen vybraných orchidejí, zkrácená a upravená tabulka dle Arditti a Ghani, (2000)

| | Rozměry | | | | | |
|--------------------------|------------|------------|--------------------------|------------|------------|--------------------------|
| | Semena | | | Embryo | | |
| Druh orchideje | Délka (mm) | Šířka (mm) | Objem (mm ³) | Délka (mm) | Šířka (mm) | Objem (mm ³) |
| <i>Orchis coriophora</i> | 0,46±0,06 | 0,18±0,05 | 4,17±2,7 | 0,2 0,02 | 0,14±0,02 | 1,11 |
| <i>Orchis mascula</i> | 0,39±0,13 | 0,18±0,03 | 6,43±3,98 | 0,21 0,1 | 0,14±0,01 | 1,64 |
| <i>Orchis morio</i> | 0,56±0,16 | 0,18±0,05 | 5,7±4,52 | 0,18 0,04 | 0,12±0,03 | 1,35±0,13 |
| <i>Orchis purpurea</i> | 0,38±0,04 | 0,15±0,07 | 2,65±1,69 | 0,15 0,03 | 0,09±0,03 | 0,78±0,34 |
| <i>Orchis saccata</i> | 0,52±0,01 | 0,13±0,05 | 2,9±1,5 | 0,14 0,03 | 0,11±0,01 | 1,72 |
| <i>Orchis simia</i> | 0,15±0,08 | 0,15±0,08 | 4,2 | 0,16 0,03 | 0,11±0,03 | 1,55 |

Semena jsou šířena převážně anemochorně, a to proto, že jsou semena drobná a lehká, jelikož mají mezi embryem a osemením vyplněný prostor vzduchem (Arditti, Ghani, 2000). Semena bývají šířena také zoochorně (Jersáková a Kindlmann 2004).

Doba od vyklíčení semen do prvního kvetení rostliny se u našich druhů udává přibližně v rozmezí 5-15 let (Průša, 2005). Klíčící embryo se nejprve vyvíjí v tzv. protokorm, poté co se vyvine první vegetativní orgán se z protokormu stává mykorhizom. Tvar protokormu je rozdílný v závislosti na druhu orchideje (např. protokormy rodu *Dactylorhiza* mají charakteristický kónický tvar, rody *Ophrys* a *Orchis* jsou souměrně kuželovité). Ve stádiu protokormu a následně mykorhizomu se jednotlivé druhy orchideje vyvíjí rozdílně dlouhou dobu (Rasmussen, 1995).

Při každé snaze o zachování nebo obnovu populace je potřeba znát faktory, které omezují produkci osiva a klíčivost semen, jelikož je nezbytné určit požadavky na klíčivost semen na dané lokalitě, a aby bylo možné přijímat informovaná rozhodnutí o přístupech k ochraně a obnově stanovišť. To platí, pokud se populace orchidejí spoléhá pouze na přirozený růst sazenic, stejně tak při pokusech o vysazování semen, uměle vypěstovaných rostlin nebo sazenic. Informace o požadavcích na klíčení

semen jsou tedy zásadní z hlediska pokroku v ochraně orchidejí a obnově stanovišť (Rasmussen, a kol. 2015).

Faktory které působí na klíčivost semen, je již výše popisovaná nutnost mykotrofie, kdy se navíc druhy orchidejí zdají být většinou v poměrně specifické symbióze s úzkou monofyletickou skupinou hub. Dalšími faktory jsou abiotické a biotické faktory. Abiotické faktory, jako je **teplota** a **vlhkost substrátu** jsou sezónní podněty, které mohou uvolnit dormanci semen anebo zvýšit klíčivost semen (Batty a kol., 2001). Proto abiotické faktory mohou ovlivňovat zdroje orchidejí, hub a uhlíku odlišně, což značně přispívá ke složitosti definování podmínek, které napomáhají klíčení (Rasmussen a kol. 2015).

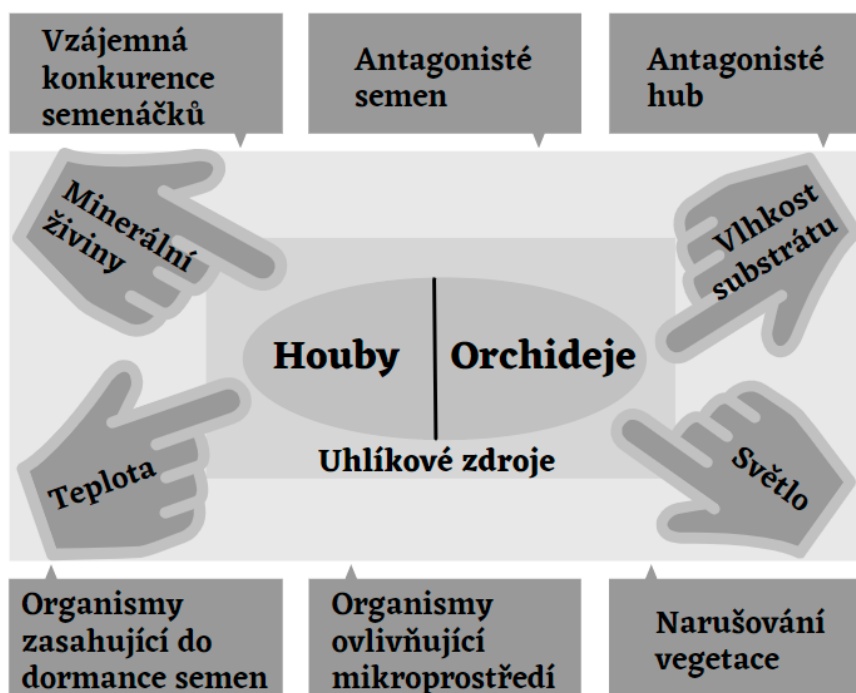
Vlivem vlhkosti substrátu u orchidejí se zabýval například Diez (2007), který se ve své práci zabýval hierarchickými vzorci klíčení symbiotických orchidejí s vazbou na blízkost dospělých jedinců a environmentální gradienty. Jeho výsledná data ukázala u druhu *Goodyera pubescens* silný vzorec klesající pravděpodobnosti symbiotického klíčení do 1 m od dospělých rostlin a zvýšenou klíčivost na místech s vyšší vlhkostí půdy, organickým obsahem a nižším pH.

Rasmussen, a kol. (2015) dále uvádí, že je velmi pravděpodobné, že účinky vlhkosti substrátu prospívají přežití a růstu mycelia. Úspěšný růst mycelia by mohl zvyšovat kapacitu příjmu vody při nasávání semen a sazenic (Yoder a kol., 2000).

Vliv změny teplot a srážek tedy mají také dopad na růst sazenic orchidejí, přímo na semena nebo sazenice a nepřímo na dostupnost hub a zdroje uhlíku. Vliv teploty souvisí například s biologickým účinkem inhibice světla který by mohla spočívat v zajištění toho, že před vyklíčením má semeno dostatek času na zapuštění do substrátu, aby uniklo vysychání a získalo tepelnou stabilitu vhodnou pro mladé semenáčky (Rasmussena a kol. 2015).

Na klíčivost semen, růst mykotrofních hub a jejich zdroj uhlíku mají vliv také vnější biotické faktory, a to jak pozitivní, tak i negativní (Rasmussen, a kol. 2015). Těmito faktory jsou například antagonisté semen, jako jsou predátoři a paraziti (McCormick a kol., 2013). Také antagonisté mykobiontů jako jsou konkurenti pro stejný uhlíkový cyklus, parazité hub nebo houbaři, nebo také nesymbiontní mikroorganismy, které se prolínají s dormancí semen (Barsberg a kol., 2013).

Komplexní faktory ovlivňující klíčení semen a růst semenáčků jsou zobrazeny na obrázku č. 3.



Obrázek 3: Komplexní faktory ovlivňující klíčení semen a růst semenáčků, obrázek upraven dle Rasmussen a kol., (2015)

4.1.4 Stanovištní a světelné nároky

Pro život orchidejí je typická adaptace jednotlivých druhů na různé typy biotopů.

Průša (2005) rozděluje stanoviště výskytu orchidejí následovně:

- Vysokohorské louky, horské pastviny a hole
- Suché louky nebo křovinaté formace v pahorkatinách na alkalických půdách a lesostepi
- Vlhké louky, podhůří
- Stinné louky a bažiny, říčních luhy a prameniště v nížinách a pahorkatinách
- Vrchoviště a přechodová stanoviště
- Horský jehličnatý les
- Rašelinný jehličnatý les
- Vápencové bučiny, středně vlhké až suché bukové lesy bez křovinného para
- Suché bory a borové lesostepi na vápenných pískovcích

Podrobnější rozdělení typů stanovišť s výskytem orchidejí v České republice dle Katalogu biotopů České republiky, Chytrý a kol. (2001) je možné najít v knize Zásady péče o orchidejová stanoviště (2004).

Orchideje se podle světelných nároků dají rozdělit na dvě kategorie:

A) heliofilní a heliosciofilní. Heliofilní druhy nesnášející zastínění, spadají sem druhy luk, pastvin a pramenišť. B) heliosciofilní, tyto druhy snášejí jak plné sluneční záření, tak také částečné zastínění, které se většinou vyskytují v blízkosti keřů nebo ve světlých rozvolněných lesích (Jersáková a Kindlmann, 2004).

4.1.5 Ohrožení

Čeleď *Orchideaceae* je jednou z nejhroženějších čeledí na světě je proto velmi důležité se touto velmi neobvykle rozmanitou, málo probádanou a inspirativní čeledí zabývat pro podpoření jejího zachování.

V rozsáhlém výzkumu o vymírání orchidejí v České republice za posledních 150 let v různých dvacetiletých časových intervalech Štípková a Kindlmann (2021) zjistili, že naprostá většina orchidejí zmizela z mnoha jejich historických lokalit ve všech analyzovaných časových intervalech. Počet lokalit vhodných pro české orchideje poklesl v závislosti na druhu o 8–92 %.

Důvody, proč jsou orchideje zatím málo probádanou čeledí, a skýtá je velké ohrožení, jsou **pohlavní rozmnožování vázané na specifické vymírající druhy opylovačů a neobvyklý způsob mykotrofní výživy** v nenarušených přírodních půdách. Avšak hlavním důvodem úbytku populací je **lidská devastace přírodní krajiny** (Dykyjová, 2003).

Důvody úbytku populací orchidejí způsobené lidskou devastací přirozených biotopů, které se nejvíce podílejí na ohrožení této čeledi, popsal Průša (2005):

- Přímá destrukce a zánik existujících stanovišť: výstavba, znečištění, přeměna luk a pastvin na ornou půdu apod.
- Změna kvality existujících stanovišť:
 - eutrofizace půdy (nadměrné hnojení přispívá k přemnožení vysokostébelných trav, které vytlačují vstavačovité druhy)

- změna obhospodařování
 - sukcese (zarůstání lokalit dřevinami a agresivními bylinami)
 - odvodňování mokřadů a podmáčených stanovišť (meliorace)
 - používání pesticidů
 - vytlačování druhů orchidejí způsobené invazivními nepůvodními druhy rostlin
- Přímé vykopávání nebo sběr rostlin

Příbuzenské křížení orchidejí je jeden z dalších faktorů ohrožení jejich druhů. Reed a Frankham (2003) ve své vědecké práci uvádí, že příbuzenské křížení způsobuje ztrátu genetické diverzity a snižuje reprodukční způsobilost. Výsledné korelace výzkumu fitness rostlin v kombinaci s velikostí populací ohrožených druhů naznačují, že mnoho populací má sníženou zdatnost v důsledku inbrední deprese, ale i genetického driftu.

V poslední době se také otevírá otázka, zda za ohrožením výskytu druhů orchidejí nemůže být také zároveň klimatická změna. Jacquemyn a kol. (2009) ve svém výzkumu zjišťoval, zda měnící se klima ovlivňuje životaschopnost velkých populací v porovnání s malými populacemi druhů *Orchis purpurea* a *Neottia ovata* po dobu pěti let. Produkce plodů ve velkých populacích vykazovala mnohem vyšší stabilitu, než u malých populací a byla méně ovlivněna extrémními povětrnostními podmínkami.

Tématem dopadu klimatických změn na orchideje se také zabývala ve své vědecké práci Traxmandlová a kol. (2015) která uvádí, že dopady klimatických změn jsou způsobeny především přísnými požadavky na podmínky prostředí. Orchideje potřebují vhodné půdní podmínky a specifické mykorhizní houby pro klíčení i vhodná stanoviště. Mnoho orchidejí je také závislých na specifických opylovačích a změna klimatu pro ně také představuje velkou hrozbu. Proto je třeba zachovat rostlinná společenstva, v nichž orchideje žijí.

4.1.6 Ochrana

V České republice jsou orchideje chráněny zákonem 114/199 Sb., resp. vyhláškou č. 395/1992 Sb., kde se nachází seznam zvláště chráněných rostlin a jsou rozděleny na ohrožené, silně ohrožené a kriticky ohrožené. V tomto seznamu však nejsou uvedeny všechny druhy ohrožených orchidejí. Také jsou orchideje chráněny, jak již bylo zmíněno v úvodu, Whasingtonskou úmluvou o mezinárodním obchodu ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin, která chrání orchideje v rámci celé čeledi (Průša, 2005).

Pro záchranu těchto vymírajících populací je potřeba pochopit populační dynamiku orchidejí, a znát alespoň základní údaje o jejich životních strategiích (Jersáková a Kindlmann, 2004). Proto je důležité znát konkrétní ekologické nároky jednotlivých druhů. Poté je teprve možno zasahovat tím, že budou vytvářeny vhodné stanovištní podmínky pro jejich vývoj a setrvání na lokalitě.

K ochraně orchidejových stanovišť je nutné připravit a zrealizovat celý soubor opatření, který se zkráceně nazývá management, jehož úkolem je udržení kvality stanoviště tak, aby se populace orchidejí nesnižovala a přinejlepším se zvyšovala. Takový management se musí přizpůsobit rozdílným druhům rostlin a biotopů (Průša, 2005).

Výsledné plány péče včetně konkrétního managementu pro chráněná území mohou proto pomoci při jejich zachování a udržení biologické rozmanitosti. Jak se zmiňuje Procházka (1980), že samotná absence vhodného managementu má velký vliv na výskyt některých druhů.

Organizaci a realizaci managementu orchidejových stanovišť v České republice zajišťují národní parky, Správa ochrany přírody, AOPK ČR, krajské úřady, zájmová organizace Orchidea klub a program Orchideje Českého svazu ochránců přírody.

Management orchidejových lokalit by měl být pravidelný, měla by být sledována populační dynamika monitoringem nebo analýzou, což znamená, že bude populace každoročně sledována, a v případě poklesu populace bude vyhodnoceno, co takový jev způsobilo a management upraven (Jersáková a Kindlmann, 2004).

4.1.6.1 Pěstování orchidejí

Orchideje lze uměle pěstovat generativním rozmnožováním, vegetativním rozmnožováním nebo klonováním (Nash, Croix, 2007). V případě zájmu této práce bude následně popisován generativní způsob. Konkrétně možnosti růstu v *in situ* a *ex situ* podmínkách (obrázek č. 4).



Obrázek 4: Přesazení druhu *Spiranthes spiralis* z podmínek *in vitro*

4.1.6.1.1 Výsevy orchidejí v podmínkách *ex situ*

Pěstování orchidejí v umělých podmínkách je velmi komplikované, zejména kvůli potřebě orchidejí být v symbióze s houbami. V roce 1954 se jako první pokusil pěstovat H. Burgeff terestrické orchideje na umělých sterilovaných substrátech pomocí izolované symbiotické houby a následně přesazoval semenáčky do květináčů s vhodným substrátem infikovaným symbiotickou houbou. Postupem času dovedl u 20 druhů našich orchidejí vypracovat květináčovou metodu. Avšak poté, když byly namnožené rostliny vysazené do volného terénu, tak rostliny postupně vyhynuly. Úspěchy se dostavily s pokusem přesazování semenáčků u druhu *Orchis mascula*, které byly přesazovány ve velkých balech a následně byla rozrýpana a obnažena půda kolem rostlin, což mělo příznivý vliv pro nálety semen a vývoj semenáčků (Dykyjová, 2003).

Následný vývoj metody *ex situ* se začal úspěšně vyvíjet přibližně před třiceti lety, především pro účely zjištění klíčivosti semen a vývoje semenáčků, výzkumy se zabývali např. (Rasmussen a Whigham, 1993; Zelmer a kol., 1996). Jedná se o tzv. balíkové metody, kdy jsou semena orchidejí uzavřena v síťovině s půdou. Síťovina by měla být dostatečně hustá, aby udržela suchá semena, ale umožnila průchod houbové hyfy a vody (Rasmussen a kol., 2015). Při této metodě vývoj klíčení rostlin ovlivňují také výše popsané abiotické a biotické faktory.

Následně například Jacquemyn a kol., (2007) prováděl v rámci výzkumu experimentální zkoumání klíčivosti semen u druhu *Orchis purpurea* na dvou lokalitách v Belgii. Na klíčení semen a usazování sazenic byly sestaveny balíčky semen s použitím upraveného návrhu od Rasmussen a Whigham (1993). Přibližně 150 semen bylo umístěno do čtvercové sítě fytoplanktonu, uzavřené v držáku na sklíčko Polaroid, které byly umístěny těsně pod vrstvou ornice na zkoumaných lokalitách a ponechány v zemi 2,5 roku. Výsledky ukázaly, že rychlost klíčení semen se mezi jednotlivými lokalitami lišila. Na jedné ze dvou lokalit nevyklíčili žádné protokormy, což si autoři vysvětlovali neschopností semen vyklíčit, v důsledku nevhodných abiotických podmínek nebo absencí vhodných hub.

4.1.6.1.2 Výsevy orchidejí v podmínkách *in vitro*

V současné době se spíše pěstují terestrické orchideje ze semen na médiích bez symbiotické houby, jelikož tyto houby nelze bez komplikací kultivovat společně s výsevy semen, a proto se používají aseptické výsevy *in vitro*. Tato metoda je založena na přípravě médií (živných půd), které v sobě musí obsahovat především minerální prvky, cukry, hormonální látky a vitamínové látky a v neposlední řadě agar (želatina z mořských řas), aby médium ztuhlo. Po smíchání všech látek jsou média sterilizována vysokou teplotou a všechny další manipulace jako je například rozlévání médií, dezinfekce semen a samotný výsev musí probíhat v aseptických podmínkách pomocí laboratorní techniky (Ježek, 2012).

Asymbiotické klíčení semen tedy poskytuje příležitost studovat vliv různých faktorů na klíčení semen a vývoj semenáčků, bez mykorhizního vlivu. Aby však byla tato technika účinná, je nutné posoudit řadu faktorů, které klíčivost bez mykorhizy přímo či nepřímo ovlivňují. Složení kultivačního média, podmínky prostředí, zralost a

sterilizační protokoly mají silný vliv na asymbiotické in vitro klíčení, stejně jako na vývoji semenáčků (Vejsadová, 2006).

Přestože je biologie klíčení semen orchidejí v podstatě stejná pro všechny druhy a spočívá v bobtnání embryí a tvorbě protokormů, je nutné vytvořit optimalizovaný protokol pro každý druh s ohledem na jeho specifické potřeby živin a prostředí (Dulić a kol, 2019).



Obrázek 5: Rostliny druhu *Spiranthes spiralis* pěstované v podmínkách in vitro

Úspěšný in vitro výsev semen terestrických druhů orchidejí (viz. obrázek č. 5.) je v porovnání s tropickými druhy obtížnější. Jedním z hlavních důvodů vedle orchideoidní mykorrhizy je přirozená dormance semen v chladném období. Tato adaptace v přirozených podmínkách brání jejich vyklíčení semen v nepříznivých podmínkách, a tím zvyšuje míru úspěšnosti růstu orchidejí v příznivějších podmínkách (Lauzer a kol., 2007).

Dormance semen umožňuje synchronizaci klíčení semen do správného období, nebo tvorbu semenné banky. Aby mohlo dojít ke klíčení semen, musí být nejprve dormance přerušena. Přerušeni dormance spouští různé faktory, které jsou často druhově specifické. Nejčastější takové faktory jsou vysoké teploty, kombinace vysokých teplot a vlhkosti, nebo sežrání zvířetem (Baskin, Baskin, 2001).

Z tohoto důvodu se před samotným výsevem semen při výsevech in vitro používají metody sloužící k přerušeni mechanismů dormance semen (stratifikace), a to pomocí

uchování semen ve tmě, v nízkých teplotách, působením chemických látek, které naruší membránu semen (povrchová sterilizace nebo skarifikace semen), nebo kombinací těchto metod, což vede k úspěšnému klíčení semen a v nejlepším případě mohou zvýšit procento klíčivosti semen. Toto zvýšení může být například způsobeno snížením hladiny kyseliny abscisové, nebo zvýšením hladiny cytokininů, které klíčení semen stimulují (Rasmussen, 1995). Semena se poté vysévají na připravené médium plné látek a živin, které by přirozeně získala díky mykorrhizní symbióze, čímž se simuluje tento přirozený proces.

Ze všech faktorů prostředí je pro zajištění úspěšného klíčení zvláště důležité osvětlení. Četné studie zkoumaly vliv osvětlení na klíčení semen, včetně jeho individuálního vlivu, a prokazují důležitost osvětlení a jeho roli v asymbiotickém klíčení a vývoji semenáčků (Stewart a Kane, 2006; Chen a kol., 2015)). Dulić a kol., (2019) uvádí, že klíčení suchozemských orchidejí je obecně považováno za podporující tmu, avšak výsledky jejich studie ukázaly, že u druhu *Spiranthes spiralis* měly světelné podmínky (16 hodin světlo, 8 hodin tma) pozitivní vliv na vývoj embrya, rychlejší vývoj protokormů, na vyšší procento tvorby výhonků a rhizoidů a tvorbu prvního a druhého listu (Dulić a kol., 2019). Ponert a kol. (2011) také úspěšně pěstoval mnoho druhů střeoevropských orchidejí, zejména druhů rodu *Ophrys* a *Dactylorhiza*, při světelných podmínkách 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Dalším důležitým faktorem ovlivňující úspěšné klíčení u výsevů in vitro je teplota. Malmgren a Nyström na svých webových stránkách (www.lidaforsgarden.com) uvádí, že orchideje mírného pásma lépe rostou při nižších teplotách než jejich tropické příbuzné, a že správné teplotní změny mohou být u některých druhů přinejmenším stejně důležité jako složení kultivačního média. Také Ponert a kol., (2011) uvádí, že je velmi nutné respektovat u výsevů orchidejí in vitro fenologické cykly rostlin a tomu přizpůsobit podmínky pěstování, zejména teplotu. V této studii u druhů rodu *Ophrys* a *Dactylorhiza* pracoval s nižšími teplotami, jelikož z prvních pokusů pozoroval při vyšších teplotách, konkrétně 25 °C rychlý úhyn rostlin. Všechny rostliny následně rostly dobře při 17 °C, ale při 23 °C.

4.1.6.1.2.1 Média pro výsevy semen terestrických orchidejí

Americký botanik Lewis Knudson v roce 1922 jako první úspěšně představil techniku *in vitro* asymbiotického výsevu pro kterou vytvořil médium Knudson B složeného z živných roztoků doplněných o 1 % (w/v) sacharózy. Toto médium použil pro výsevy několika epifytických druhů orchidejí, u kterých bylo úspěšné jak samotné klíčení rostlin, tak i následný vývoj. V roce 1946 Knudson představil další médium známé jako Knudson C.

V současnosti se používá velké množství druhů médií pro *in vitro* výsevy terestrických orchidejí například z hojně využívané již výše zmíněné Knudsonovo C médium (Knudson, 1946), dále Malmgrenovo médium pro orchideje (Malmgren, 1996) a jeho různé modifikace, BM médium (Waes a Debergh, 1986) a jeho modifikace (např. BM1, BM2) a mnoho dalších.

Podle Znaniecké a Lojkowské (2004) žádné kultivační médium není univerzálně použitelné pro všechny druhy orchidejí. Proto musí být živiny upraveny tak, aby vyhovovaly jedinečným požadavkům každého druhu.

Ponert a kol. (2011) ve svém výzkumu výsevů metodou *in vitro* použil 4 různá média především u druhů rodu *Dactylorhiza* a *Ophrys*, ale i jiných rodů například *Orchis*, *Anacamptis* a *Neotinea*. Jejich přesné složení je uvedeno v tabulce č. 3. V této studii většina testovaných druhů orchidejí dobře rostly na všech čtyřech různých médiích. Například druhy *Dactylorhiza incarnata* agg. a *Dactylorhiza masculata* s 80% úspěšností klíčení byly pěstovány na médiu ¼-2 se stratifikací 2–5 min. 70% ethanolem a sterilizací 5% Ca(OCl)₂ po dobu 6 minut, nebo druh *Ophrys insectifera* s 85% úspěšností klíčení, který byl pěstován jak na médiu ¼-2, tak i na médiu Mo2 se stratifikací 2-5 min. 70% ethanolem a sterilizace 5% Ca(OCl)₂ po dobu 6 minut. Dále na médiu Michl-15 měly 100% klíčivost druhy *Orchis provincialis* a *Himantoglossum caprinum* se stratifikací 2–5 min. 70% ethanolem a sterilizace 5% Ca(OCl)₂ po dobu 10 minut.

Tabulka 3: složení použitých médií pro vybrané druhy orchidejí ve výzkumné práci Ponerta a kol. (2011)

| | | Mo2 | 1/4-2 | Michl-15 for germination | Michl-16 for growing |
|--------------------------------|---|-------|-------|-----------------------------|-------------------------|
| Macronutrients (g/l) | KH ₂ PO ₄ | 0.073 | 0.043 | 0.216 | 0.216 |
| | KCl | | | 0.150 | 0.150 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.077 | 0.093 | 0.246 | 0.246 |
| | CaCl ₂ | 0.057 | 0.083 | 0.022 | 0.022 |
| | NH ₄ NO ₃ | 0.033 | 0.413 | | 0.166 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | | | | |
| | KNO ₃ | 0.038 | 0.475 | | |
| Micronutrients (mg/l) | Na ₂ EDTA | 10.00 | 10.00 | | 17.50 |
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 7.00 | 7.00 | | 30.00 |
| | H ₃ BO ₃ | | | | 1.01 |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 2.20 | 2.20 | | 1.01 |
| | MnCl ₂ ·4H ₂ O | | | | 0.13 |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.01 | 0.01 | | 0.03 |
| | NiCl ₂ ·6H ₂ O | | | | 0.03 |
| | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | | | | 0.03 |
| | CoCl ₂ | 0.00 | 0.00 | | 0.02 |
| | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.06 | 0.06 | | |
| | MnSO ₄ ·H ₂ O | 4.20 | 4.20 | | |
| | KI | 0.20 | 0.20 | | |
| Organic supplements (g/l) | ananas juice | 20 | 20 | | |
| | casein hydrolysate | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 0.5 |
| | pangamin | 0.90 | 0.45 | | |
| | yeast extract | | | 0.5 | 0.5 |
| Vitamins (mg/l) | thiamine | 0.1 | 0.1 | 1.0 | 1.0 |
| | pyridoxine | 0.1 | 0.1 | 1.0 | 1.0 |
| | nikotinamide | 0.1 | 0.1 | 1.0 | 1.0 |
| Phytohormones (mg/l) | kinetine | 2.0 | 2.0 | | |
| Other organic compounds (mg/l) | citric acid | | | 192.0 | 192.0 |
| | glycine | 0.4 | 0.5 | | |
| | inositol | 20.0 | 25.0 | | |
| Saccharides (g/l) | sucrose | 10.0 | 15.0 | 10.0 | 30.0 |
| Others (g/l) | activated charcoal | 0.5 | 0.5 | 1.2 | 1.2 |
| | agar | 7.0 | 7.0 | 8.0 | 15.0 |
| | pH | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 5.8 |

Mnoho výzkumů se zabývalo také vlivem dusíku a organických přísad, které mohou mít stimulační nebo inhibiční účinky na klíčení semen. Inhibiční účinky na růst mohou mít anorganické formy dusíku ve formě dusičnanů, nebo dokonce mohou vést k toxicitě (Ponert a kol., 2013). Inhibiční účinek dusičnanů pozoroval při *in vitro* pěstování terestrických orchidejí také Figura a kol., (2019). Stimulačních účinky mívají na klíčení semen organické formy dusíku (Rasmussen 1995; Sgarbi a kol., 2009; Ponert a kol., 2013).

U suchozemských orchidejí se organické extrakty, jako je kokosová voda, kvasnicový extrakt, ananas, banánový homogenát, pepton a hydrolyzát kaseinu, používají především jako zdroj aminokyselin a mohou silně ovlivnit klíčení semen.

Přidání organických přísad pro klíčení, urychluje tvorbu protokormů a produkuje silné semenáčky, jak uvádí většina zpráv v literatuře. Tyto organické přísady poskytují přirozený zdroj sacharidů, anorganických iontů, aminokyselin, vitamínů a fytohormonů a pomáhají při množení orchidejí podporou růstu a morfogeneze v asymbiotických semenných kulturách (Gupta, 2016).

Dulić a kol, (2019) ve svém výzkumu prováděl výsevy semen druhu *Spiranthes spiralis* a *Himantoglossum jankae* na dvou druzích médií (viz. tabulka č. 4), a to médium Knudson C (KC; Knudson 1946; Morelova modifikace) a Malmgrenovo modifikované médium (MM; Malmgren 1996) s různými kombinacemi organických doplňků do živného média. Doplnky použité u obou médií zahrnovaly například kokosovou vodu, pepton nebo ananasovou šťávu. Všechna testovaná média také obsahovala 2 % (w/v) sacharózy, 7 % (w/v) technického agaru a 1 % (w/v) aktivního uhlí. Výsledky ukázaly, u druhu *Himantoglossum jankae* MM médium doplněné peptonem (2 g l⁻¹) a kokosovou vodou (50 ml l⁻¹) poskytuje nejpriznivější podmínky pro asymbiotické klíčení a další vývoj semen. Naopak KC médium inhibovalo asymbiotické klíčení u tohoto druhu a ukazuje se, že se negativně projeví na špatné klíčivosti semen anorganické formy dusíku, které byly součástí KC média. U druhu *Spiranthes spiralis* výsledky ukázaly vysokou rychlost klíčení u KC média, u kterého se autoři domnívají, že je to zapříčiněno přidáním kosové vody, jelikož nejvýznamnější a nejužitečnější složky kokosové vody jsou cytokininy, které jak uvádějí autoři Yong a kol., (2009) a Huh a kol., (2016) podporují dělení buněk, a tím podporují rychlý růst.

Tabulka 4: Upravená tabulka složení živných médií z publikace Dulić a kol., (2019)

| | KC | MM |
|---|--------|-------|
| Macronutrients (mg L⁻¹) | | |
| Ca(NO ₃) ₂ | 347,43 | – |
| KH ₂ PO ₄ | 250 | 75 |
| KCl | 250 | – |
| MgSO ₄ | 122,3 | 97,7 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 500 | – |
| NH ₄ NO ₃ | 500 | – |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | – | 75 |
| Micronutrients (mg L⁻¹) | | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 25 | 27,85 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 5,7 | 1,54 |
| Na ₂ EDTA | – | 37,26 |
| Vitamins (mg L⁻¹) | | |
| D-Biotin | – | 0,05 |
| Folic acid | – | 0,5 |
| Glycine | – | 2 |
| Myo-inositol | – | 100 |
| Nicotinic acid | – | 5 |
| Pyridoxine | – | 5 |
| Thiamine | – | 10 |
| Casein | – | 400 |

Regulátory růstu rostlin, zejména auxiny a cytokininy, také často podporují klíčení semen orchidejí (Godo a kol., 2010), jakož i další vývoj semenáčků (Nanekar a kol., 2014; Diengdoh a kol., 2017)). Z výsledků studií zabývajících se vlivem cytokininů, lze předpokládat, že různé druhy suchozemských orchidejí mají jedinečně odlišné požadavky při použití regulátorů růstu pro následný vývoj semenáčků (Dulić a kol., 2019).

Vejsadová (2006) také uvádí, že regulátory růstu, auxiny (např. kyselina naftyloctová) a cytokininy (např. benzyladenin nebo kinetin) se nejčastěji přidávají do živných médií, ke zvýšení procenta klíčení nebo ke stimulaci, dále také, že obecně auxiny stimulují tvorbu kořenů a cytokininy podporují vývoj výhonků a dělení buněk, což o cytokininech uvádí také Yong a kol. (2009) a Huh a kol. (2016).

Ve výzkumné práci Vejsadové (2006) měly semenáčky orchidejí dvou druhů rodu *Dactylorhiza* výrazně vyšší růst v přítomnosti kombinací auxinu a cytokininů.

Růstové rozdíly v reakci na auxiny a cytokininy, avšak nenaznačují silnou druhovou specifitu u ostatních studovaných druhů.

Do médií terestrických orchidejí se hojně přidává také aktivní uhlí, které pravděpodobně poskytuje semenům tmavé prostředí a odpovídajícím způsobem zvyšuje rychlost klíčení (Bektaş, Sökmen, 2016). Také přidání aktivního uhlí zvyšuje a udržuje konstantní hladinu pH kultivačního média a podporuje růst zvýšením příjmu dusíku (Eymar a kol., 2000).

4.1.6.1.2.2 Stratifikace a výsevy semen terestrických orchidejí

Před použitím povrchově sterilizačních látek je dle Ježka, (1996) vhodné použít 70% ethanol, který odstraní část ochranných vosků z povrchu semene, který má následně lepší smáčivost. Poté by mělo následovat propláchnutí destilovanou vodou. Ponert a kol. (2011) uvádí, že ethanol je schopen vymývat některé hydrofobní látky jako vosky. Semena se snadno nasáknou a jsou méně hydrofobní, což vede k lepší manipulaci s nimi. Výsledky naznačují, že krátké ošetření etanolem může mít pozitivní účinek, ale delší aplikace může semena zabít. Konkrétní příklad uvádí na druhu *Anacmaptis morio*, u kterého byl 70% líh aplikován na krátkou dobu dvou minut, což vedlo k mírně vyšším procentům klíčivosti, zatímco dlouhodobá expozice ethanolu, konkrétně po dobu šedesáti minut může semena zabít. Také například Vejsadová (2006) u druhů *Dactylorhiza Incarnata* a *Dactylorhiza maculata* použila před sterilizací chlornanem vápenatým nebo chlornanem sodným 70% ethanol po dobu tří minut.

Hojně využívaný při *in vitro* výsevech je přídavek detergentu (např. Tween 20 nebo Tween 80) přispívající ke snížení povrchového napětí semen a zlepšení účinku sterilizačních roztoků (Rasmussen, 1995). Detegren používali například Çiğ a Yilmaze (2017) k povrchové sterilizaci semen, jejich postup probíhal nejprve pětiminutovým třepáním ve 2% kyselině sírové (H_2SO_4) a poté s 1-2 kapkami Tween-20 v 10% chlornanu sodném ($NaOCl$) po dobu 12 minut.

Dalším užívaným roztokem sloužící k povrchové skarifikaci semen je 0,5–2% kyselina sírová (H_2SO_4). Avšak jak uvádí Malmgren (1996) ošetření semen pouze prostřednictvím H_2SO_4 bez následného ošetření roztokem chlornanů je nedostatečné a nepodporuje následné klíčení semen.

K samotné sterilizaci semen je nejčastěji používán chlornan sodný (NaClO) nebo chlornan vápenatý ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). Rasmussen (1995) uvádí, že vyšší procento klíčivosti semen bývá při použití chlornanu vápenatého než při použití chlornanu sodného. Ponert a kol. (2011) při pěstování orchidejí rodů *Dactylorhiza* a *Ophrys* použil úspěšně dezinfekční roztok $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, který působil na semena v rozmezí 3-30 minut, přičemž bylo smícháno 50 g $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ve 100 ml destilované vody a po 15 až 20 minutách přefiltrováno filtračním papírem do nové baňky.

Pozitivní účinky chlornanu vápenatého potvrdila ve své vědecké publikaci také Vejsadová (2006), která dosáhla nevyšší klíčivosti semen u druhů *Dactylorhiza incarnata*, *Dactylorhiza maculata* a *Liparis loeselii* při použití 7,2% roztoku $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (40-50 minuty) v kombinaci se 70 % ethanolem (3 minut). Naopak při použití 0,5% chlornanu sodného nebylo pro tyto druhy prstnateců vhodné, jelikož v některých případech poškodilo embrya a snížilo míru klíčivosti až o 50 %.

Většina autorů povrchově sterilizuje nebo skarifikuje semena v uzavřených zkumavkách, avšak jiný a velmi účinný způsob povrchové sterilizace semen popisuje ve svém výzkumu Ponert a kol. (2011), ve kterém byla semena sterilizována v Laurenových plastových injekčních stříkačkách, viz obrázek č. 6. Jako nejlepší způsob pro udržení semen uvnitř stříkačky při nabírání dezinfekčních látek a proplachování byla použita nylonová síťovina $1,5 \times 1,5$ cm a jelikož žádná semena nejsou zachycena ve filtru, mohou být zasetá téměř všechna semena. Výsevy na živná média se provádí v aseptických podmínkách, které zajišťuje laminární box (tzv. flow box).



Obrázek 6: Připravená média, semena v injekčních stříkačkách a dezinfekční roztoky pro výsevy semen druhu *Orchis purpurea*

4.2 Druh *Orchis purpurea*

4.2.1 Popis a charakteristika druhu

Orchis purpurea se řadí do rodu *Orchis*, který je v Evropě jedním z nejpočetnějších v čeledi vstavačovitě, viz obrázek č. 7. V České republice je druhově nejbohatším rodem (Procházka a Velíšek, 1983).

Druh *Orchis purpurea* je popsán jako vápnomilný, vyskytující se v prosvětlených, řídkých dubových lesích, lesních lemech, lesostepních ladách, xerothermních, subxerothermních trávnících a křovinatých porostech. Vzácně se vyskytuje v sekundárních borech na krystalických vápencích. Dle biotopů se jedná konkrétně o dubohabřiny hercynské, vápnomilné bučiny, bazofilní teplomilné doubravy perialpidské a středoevropské, úzkolisté suché trávníky, širokolisté suché trávníky, suché bylinné lemy, nízké xerofilní křoviny a sekundární válečkové bory (Jersáková a Kindlmann, 2004). Podle Květeny ČR (Štěpánková, 2010) jde o půdy vysychavé, vápnaté, zásadité nebo nanejvýš neutrální, často skeletovité, s nízkým obsahem dusíkatých látek. Procházka a Velíšek (1983) uvádějí, že se jedná o druh obligátně alkalofytní, jelikož roste na půdách jen alkalických (pH: 7,4-9,1).

Morfologické znaky (Štěpánková, 2010): „Hlízy elipsoidní až téměř kulovité, kořeny četné, krátké, tlusté. Lodyha jemně rýhovaná, tmavozelená, na bázi s nezelenými špičatými šupinovitými listy, v dolní ½ olistěná, v horní ¼-½ často bezlistá a někdy fialově naběhlá. Listy v počtu 5-10, podlouhlé až podlouhle vejčité 6-17 cm dl., 2-7 cm široké, na vrcholu tupě špičaté, sivozelené, na líci lesklé, nejhořejší 1(2) listy často úzce kopinaté, lodyhu objímající. Klas vejcovitý až válcovitý, 6-15 (20) cm dl. Mnohokvětý; listeny vejčité až úzce kopinaté, mnohem kratší než semeník, na vrcholu špičaté, jednožilné, většinou fialové. Květy velké, vně hnědavě nachové nebo růžové, nachově až černě tečkované; všechny okvětní lístky s výjimkou pysku skloněné v přílbu, lysé, vnější vejčité, 12-14 mm dl., na vrcholu špičaté, vnitřní užší, čárkovitě kopinaté, zpravidla o málo kratší; pysk v obrysu okrouhlý až obevejčitý, 10-15 (20) mm dl., delší než široký, plochý, bílý nebo růžový, hustě tečkovaný nachovými barvami, 3dílný, střední lalok již od báze se rozšiřující, obsrdčitý, okrouhlý, trojúhelníkovitý nebo téměř celistvý, zpravidla však vykrojený, ve výkroji někdy s nápadným zoubkem, postranní laloky podlouhlé, uťaté, mnohem menší a kratší než střední lalok, ostruha dolů sehnutá, krátce válcovitá, tupá; semeník válcovitý, za květu 13-15mm dl., zelený, někdy fialově naběhlý. Tobolky úzce elipsoidní, 18-25 mm dl.“



Obrázek 7: Kvetoucí *Orchis purpurea*, PR Milská stráň

Jedná se o alogamickou šálivou rostlinu bez nektaru s podprůměrnou tvorbou tobolek. (Helmut a kol., 2009). Tyto druhy lákají opylovače těkavými látkami, které na nich hmyz sbírá a představují vysokou specializaci druhu (Dykyjová, 2003). Tímto tématem se také zabývali Walsh a Mihaels (2017), kteří chtěli zjistit, zda šálivé druhy orchidejí nestrádají tímto způsobem vábení opylovačů na počtu opylovaných květů a následně dozrálých tobolek. Výzkum byl prováděn na rodu *Cypripedium*, a na rostliny byl uměle přidáván nektar. Výsledky z tohoto výzkumu naznačují, že přidání nektaru neovlivňuje celkový příjem pylu nebo nižší produkci tobolek.

Orchis purpurea je znám nezměrnou variabilitou a v rozsáhlejších populacích se jen výjimečně najdou dva jedinci se zcela barevně i tvarově shodnými květy. Také křížení je v rámci rodu velmi časté, například na společných lokalitách *Orchis purpurea* a *Orchis militaris* se často vyskytují jejich kříženci, někdy i častěji než oba rodiče dohromady (Procházka a Velíšek, 1983).

Druh *Orchis purpurea* se rozmnožuje generativně i vegetativně. Jeho fenologie začíná obdobím růstu nadzemních orgánů od února do poloviny dubna. Hlavní období kvetení je od poloviny dubna do druhé poloviny června. Období tvorby semeníků a vypadávaní semen začíná v polovině května a končí v průběhu července. Typem zásobního orgánu jsou hnízdovité kořeny. Vlhkostní nároky má xerofilní až mezofilní. Míra mykotrofie je středně silná a světelné nároky druhu jsou heliosciofilní (Jersáková a Kindlmann, 2004).

Vstavač nachový roste na výslunných stanovištích, například na pastvinách nebo nehnojených loukách, více se však vyskytuje v křovinách a ve světlých lesích, hlavně v doubravách (Procházka a Velíšek, 1983). Avšak na výslunných stanovištích má příznivější podmínky pro produkci tobolek, jak bylo prokázáno v předchozí bakalářské práci (Kozlovská, 2019).

Významem světelných nároků se zabýval dále například Jacquemyn a kol. (2009) v sedmiletém výzkumu u druhu *Orchis purpurea* zkoumaného v otevřených a stinných stanovištích. Zabýval se otázkou, zda a jak je důležité pro lesní orchideje míra zastínění. Výsledky prokázaly vliv světla na produkci semen, která byla dvojnásobně větší a čistá míra reprodukce pak v průměru šestinásobně vyšší než na

zastíněných lokalitách. Dále se prokázalo, že rostliny v otevřených lesních porostech kvetly častěji v průběhu let a produkovaly významně více tobolek než rostliny ve stinných lesích.

Orchis purpurea je dle aktualizované třetí verze Červeného seznamu cévnatých rostlin květeny České republiky řazen do kategorie C2 b, tedy druhů silně ohrožených (Grulich, 2017).

4.2.2 Rozšíření v České republice

Orchis purpurea se vyskytuje v Čechách hlavně v termofytiku od Džbánu a Labského středohoří po Český kras a východní Polabí. Vzácně se vyskytuje v jižních Čechách a v mezofytiku severozápadních Čech. Na Moravě roste vzácně také na střední a jihovýchodní části na sever po Kuřim a Brno, v moravském předhůří Českomoravské vrchoviny, Podyjí, Pavlovských kopcích, v Jihomoravské pahorkatině a Bílých Karpatech vzácně. Na severní Moravě a ve Slezsku neroste vůbec. Vyskytuje se převážně v kolinním až suprakolinním stupni, výjimečně i výše (Štěpánková, 2010).

4.2.3 Rozšíření ve světě

V Evropě velmi rozšířený druh, severní hranice od jižní Anglie do Dánska a Německem do jižního Polska, Ukrajiny a Rumunska. Jižní hranice probíhá jižním Španělskem, severovýchodní Sicílií, Peloponésem, jižním Tureckem. Východní hranice od centrálního Turecka přes Krym a Kavkaz (Baumann a kol., 2009).

Ve Slovenské republice roste roztroušeně v nižších a teplejších oblastech od Devínské Kobily, Malých a Bílých Karpat přes celé území k východu až po vápencové předhoří Vihorlatu (Procházka a Velíšek, 1983).

4.2.4 Ohrožení a ochrana druhu *Orchis purpurea*

V České republice v osmdesátých letech minulého století ochránci přírody zaznamenali velmi snižující se počty populací druhů *Orchis militaris*, *Orchis purpurea*, *Cypripedium calceolus*, *Platanthera bifolia*, *Cephalanthera damasonium*, *Listera ovata* a *Epipactis helleborine* v PR Mílská stráň, kterou se mimo jiné lokality tato práce zabývá. Pravidelné a systematicky organizované zásahy jsou zde prováděny od roku 1996 a vedou zejména k odstranění náletu a každoročnímu kosení

a odstraňování výmladků dřevin. V roce 2001 již bylo dokumentováno kolem 2500 kvetoucích exemplářů *Orchis purpurea* (Jersáková a Kindlmann, 2004).

Také na Moravě dochází k velkému poklesu populací, do roku 1980 existovalo celkem sto historických lokalit *Orchis purpurea*, avšak terénní výzkumy Šimitáka a Jatiové (1996) z let 1980-1995 prokázaly, že celkové procento úbytku činilo 66 %.

Například i v Bílých Karpatech, které jsou na orchideje poměrně bohaté je *Orchis purpurea* vzácným druhem. V roce 1990 bylo zaznamenáno pouze 33 údajů z 26 lokalit výskytu tohoto druhu, a to pouze v západní části daného území (Tlusták a Jongepierová-Hlobilová, 1990).

Ohrožení druhu spočívá hlavně ve změnách nebo destrukci biotopů (zarůstání lokalit, terasování svahů, urbanizace okolí apod.), a v přímém lidském vandalství. Managementová opatření by měla směřovat zejména k zabraňování postupující sukcesi, a to ve formě kosení a odstraňování náletových dřevin apod. (Průša, 2005).

O vhodném managementu pojednává také Gay (2013) ve svém vědeckém článku o populacích druhu *Orchis purpurea* v Kentu. Jako podstatné doporučení upozorňuje na potřebu zvyšovat vhodné podmínky prostředí a částečně prořezávat a prosvětlovat lesy, ve kterých se druh vyskytuje. Doporučuje také sledovat vliv slunečního záření na fitness a populační dynamiku.

Managementové zásahy spočívají hlavně v pravidelném a postupném kosení na většině ploch s vegetací suchých trávníků v červenci až srpnu. Kosení probíhá mozaikovitým způsobem a jsou ponechávány nepokosené plochy, které jsou kosené v následujícím roce. Dále při kácení dřevin jsou ponechávány roztroušené stromy, jelikož slabý zástín je pro klíčení vstavače nachového vhodný (Štefánek, 2016).

Hlavním úkolem pravidelného prořezávání je prosvětlení vytvářející plošně omezené loučky a liniové průseky, kterými také pravidelně protahuje zvěř a zochorně přenáší semena vstavačů (Jersáková a Kindlmann 2004).

4.3 Zkoumané lokality

Tato práce se zabývala šesti rozdílnými lokalitami s populací druhu *Orchis purpurea*. Jednalo se konkrétně o lokality PR Milská stráň, NPR Karlštejn, PP Chotuc, NPR Čtvrtě, lokalita u obce Skalička a u města Kryry. Rozmístění lokalit v rámci České republiky je zobrazeno na obrázku č. 8.



Obrázek 8: Mapa se zakreslenými lokalitami, které byly předmětem výzkumu. Jednotlivé lokality jsou označeny číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry), mapa byla připravena v programu Mapomat.exe (2. 0. 0. 8.), který online poskytuje Agentura ochrany přírody a krajiny ČR

Tabulka 5: Přehledová tabulka jednotlivých lokalit a jejich nadmořské výšky, biotopu, fytogeografického obvodu a okresu a počtu jedinců sledovaného druhu rostoucí v dané populaci, Skalický (1988)

| Název a číslo lokality | Nadm. výška | Druh biotopu | Fytogeografický obvod (Skalický, 1988) | Fytogeografický okres (Skalický, 1988) | Počet jedinců |
|---|-------------|---|--|--|------------------|
| Přírodní rezervace Milaská Stráň (lokalita č. 1) | 400–450 | Xerothermní typ vegetace, dubohabřiny a teplomilné doubravy | České termofytikum | Džbán (6) | Cca 1500 jedinců |
| Národní přírodní rezervace Karlštejn (lokalita č. 2) | 250–300 | Subteromorfní doubravy | České termofytikum | Český kras (8) | Cca 60 jedinců |
| Přírodní památka Chotuc (lokalita č. 3) | 200–220 | Xerothermní typ vegetace | České termofytikum | Poděbradské Polabí (11b) | Cca 200 jedinců |
| Národní přírodní rezervace Čtvrtě (lokalita č. 4) | 220–250 | Bazifilní doubravy/ dubohabřiny | České termofytikum | Rožďalovická tabule (13a) | Cca 100 jedinců |
| Lokalita u obce Skalička (lokalita č. 5) | 300–330 | Zapojená dubohabřina | Českomoravské mezofytikum | Moravské podhůří Vysočiny (68) | Cca 100 jedinců |
| Lokalita u obce Kryry (lokalita č. 6) | 350–370 | Teplomilná doubrava | České termofytikum | Podbořanská kotlina (2b) | Cca 40 jedinců |

V tabulce č. 5 je uvedeno k jednotlivým lokalitám několik základních informací jako je nadmořská výška, druh biotopu, fytogeografický obvod a okres a počet jedinců druhu *Orchis purpurea* na lokalitě.

4.3.1 Přírodní rezervace Milská stráň

PR Milská stráň je součástí přírodního parku Džbán, který byl vyhlášen v roce 1994. PP Džbán se rozkládá na území rozhraní tří okresů. Zaujímá celkovou rozlohu 41 578 ha (Mackovčín, 1999). Jedná se o oblast s bohatou přírodovědeckou hodnotou. Vyskytují se zde stepní a teplomilná společenstva severního bezlesého Džbánu, džbánské pahorkatiny petrofyty (skalní druhy), podhorské a horské druhy a džbánské slatiny a rašeliny (Houda, 1969).

PR Milská stráň se nachází ve Středočeském kraji v okrese Rakovník, necelý kilometr západním směrem od obce Milý a má rozlohu 13,1653 ha. Orgánem ochrany přírody je Krajský úřad Středočeského kraje. Předmětem ochrany jsou teplomilná travinná a křovinná společenstva rostlin a živočichů slínovcových, tzv. bílých stráňí včetně výskytu střevíčníku pantoflíčku. První vyhlášení PR nastalo 23. 9. 1988 a poslední vyhlášení se odehrálo 11. 4. 2011 (www.drusop.nature.cz).

Milská opuková stráň je strmý a protáhlý svah, v délce 930 m od východního okraje zástavby obce Milý. Nachází se zde suťový les a křoviny s teplomilnými trávničky s bohatou populací *Orchis purpurea* a výskytem dalších vzácných a ohrožených druhů. A jak již bylo zmíněno, Milská stráň se řadí mezi tzv. bílé stráňe, které se vytvářejí na křídových slínitých pískovcích a jsou typické osypy a sesuvy na pohyblivých svazích (Kubíková a kol., 2016).

Milská stráň je významným biotopem, ve kterém se vyskytuje mnoho vzácných a ohrožených druhů rostlin například *Veratrum nigrum*, *Epipactis muelleri*, *Orchis militaris*, *Orchis purpurea*, *Anemone nemorosa*, *Aster amellus*, *Cephalanthera damasonium*, *Clematis recta*, *Melittis melissophyllum*, *Cornus mas*, *Lilium martagon*, *Stachys germanica*, *Gentianopsis ciliata*, *Juniperus communis*, *Lithospermum purpureocaeruleum*, *Epipactis helleborine* agg. a *Epipactis distans*. Roste zde pravděpodobně nejpočetnější populace *Orchis purpurea* v ČR a je to jedna z nejdéle obhospodařovaných chráněných lokalit, jelikož s postupným prořezem

křovin se začalo zhruba v polovině sedmdesátých let a rozsáhlé managementové zásahy byly započaty rokem 1996 (Štefánek, 2016).



Obrázek 9: PR Pohled na Milskou stráň v první polovině dubna v roce 2019

Geologii Milské stráně popisuje Ložek a kol. (2005), který uvádí, že strmý strukturní svah je tvořen křídovými písčitymi slínovci a pískovci, kde převládají pararendziny promíšené opukovou sutí. Příměs skeletu v půdě klesá od vrcholu k patě svahu.

Již od minulosti bylo území hojně využíváno člověkem: udržovaly se zde ovocné sady, v níže položených partiích se pěstovaly zemědělské plodiny, území bylo pravděpodobně vypásáno. Je zde i zřejmý vliv těžby opuk (www.botany.cz).

Také Ložek a kol. (2005) uvádí, že tyto opukové stráně na okraji Džbánu se vyvíjely pod dlouhodobým tlakem osídlení a užívání krajiny již od pravěku. Stráň byla v minulosti odlesněna a vypásána, částečně i obdělávána.

V současné době provádí management lokality PR Milská stráň pozemkový spolek Launensia (www.launensia.cz), který si klade za cíle vykoupovat ohrožené cenné přírodní lokality, kterým hrozí akutní nebezpečí a zajistit těmto pozemkům vhodnou péči a propagovat myšlenku pozemkových spolků v rámci široké veřejnosti.



Obrázek 10: Milská stráně, rostliny druhu *Orchis purpurea* rostoucí na xerothermním stanovišti

Cílem ochrany Milské stráně je udržet biologickou rozmanitost celého území v dlouhodobém horizontu. Jedná se o jemnozrnnou mozaiku menších porostů křovin, teplomilných typů lesů (dubohabřiny, doubravy) a trávníků, poskytující toulavý stín vhodný pro mnoho vzácných druhů, které se zde vyskytují (Štefánek, 2016).

Na této lokalitě (N 50°14.1', E 13°52.1') byly sledovány parametry fitness a odebrány tobolky pro pokusy výsevu ze tří stanovišť. První stanoviště se vyskytuje na xerothermních trávnících, druhé pod starými ovocnými stromy a třetí v suťovém lese.

4.3.2 Národní přírodní rezervace Karlštejn

NPR Karlštejn spadá do chráněné krajinné oblasti Český kras, která byla vyhlášena již v roce 1972. Celková rozloha CHKO činí 13225 ha, CHKO se nachází ve Středočeském kraji a zasahuje i na území hlavního města Prahy a zaujímá část území obcí s rozšířenou působností Beroun a Černošice. Jedná se o největší vápencové území v Čechách se zachovalými rozsáhlými plochami společenstev skalních stepí, lesostepí a listnatých lesů s velmi bohatou přirozenou florou a faunou (Anonymus1, 2017).

NPR Karlštejn je rozsáhlé lesnaté území rozdělené údolními potoky Budňanského, Bubovického a Loděnice. Jeho rozloha činí 1556 ha, nadmořská výška se pohybuje mezi 215-440 m. n. m. Orgánem ochrany přírody je AOPK ČR – RP Střední Čechy.

Vyskytuje se zde soubor ekosystémů s vápencovým podložím a reliéfovou různorodostí, jejichž součástí jsou okrotivé bučiny, černýšové dubohabřiny, mochnové doubravy, šipákové doubravy a kostřavové a pěchavové skalní stepi. Z chráněných druhů rostlin se zde vyskytuje například *Dracocephalum austriacum*, *Adenopora liliifolia*, *Prunella gradiflora*, *Festuca amethystina*, *Potentilla alba*, *Orchis purpurea*, *Inula salicina* a *Orchis mascula* (Anonymus2, 2017).

Z historických průzkumů je v lesích doložena pastva dobytka a různé způsoby umělé obnovy a zakládání porostů včetně dovozu osiva. Dubohabřiny, které se zde hojně vyskytují, byly po staletí obhospodařovány výmladkovým způsobem, což podpořilo převahu habru a umožnilo zachování bohatého bylinného patra. (Anonymus2, 2017).



Obrázek 11: Lokalita v NPR Karlštejn, foto Radka Broumová

Konkrétní lokalita (N 49°56.0', E 14°11.9'), kde byly sledovány parametry fitness a odebírány tobolky pro pokusy výsevu se nachází na jižním okraji NPR Karlštejn, východně od města Karlštejn. Jedná se o lesnaté stanoviště subteromorfních doubrav, kde se vyskytuje populace čítající kolem 60 jedinců druhu *Orchis purpurea*.

4.3.3 PP Chotuc

PP Chotuc se nachází ve Středočeském kraji, v okrese Nymburk. PP má výměru 28,6 ha, nachází se v nadmořské výšce 199-253 m a byla vyhlášena v roce 1999. Předmětem ochrany jsou teplomilná společenstva na jižních svazích a křoviny a trávníky s mnoha vzácnými druhy rostlin. Původně teplomilné doubravy a habrové

doubravy zde nahradily teplomilné trávníky pravděpodobně z důvodů vybudování hradiště, trávníky následně byly využívány jako pastviny a sady. Na severních svazích se vyskytuje původní dubohabrový les. (Ložek a kol., 2005).

Vstavač nachový je jeden z nejcennějších druhů, který se na této lokalitě vyskytuje poměrně ve velkém zastoupení, v průměru 80 kvetoucích jedinců. Ze zvláště chráněných a vzácných druhů rostlin se vyskytují například *Lilium martagon*, *Stipa Capillata*, *Cirsium acaule*, *Lavatera thuringiaca*, *Thalictrum minus*, *Filipendula vulgaris* a další (Karlík, 2018).

Geologické podloží na této lokalitě je tvořené svrchnoturonskými až coniackými slínovci, ve vrcholové části s polohami křemitých jílovců (Karlík, 2018).



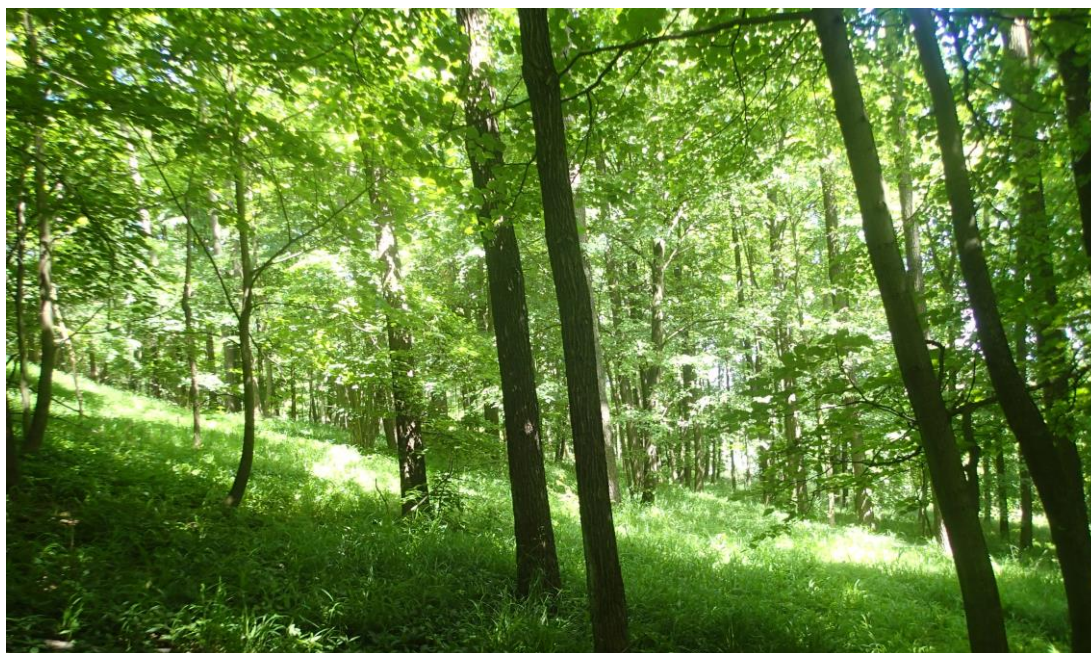
Obrázek 12: Odkvétající jedinci druhu *Orchis purpurea* v PP Chotuc, foto Radka Broumová

V rámci cílů a ochrany území vyžaduje lokalita zavedení občasně extenzivní pastvy a regulaci zarůstání křovinami (Ložek a kol., 2005). Také v plánu péče o PP Chotuc je uvedeno, že dlouhodobým cílem je zachování nelesních biotopů xerothermních trávníků a teplomilných lemů s roztroušenými ovocnými dřevinami a dále zachování a zlepšení kvality teplomilných doubrav až dubohabřin.

Konkrétní lokalita (N 50°15.9', E 15°7.0'), kde byly sledovány parametry fitness a odebírány tobolky pro pokusy výsevu se vyskytuje převážně v luční vegetaci xerothermního typu, kde roste populace *Orchis purpurea*, která čítá přes 200 jedinců.

4.3.4 NPR Čtvrtě

Národní přírodní rezervace Čtvrtě se vyskytuje ve Středočeském kraji v okrese Nymburk a spadá do správy CHKO Kokořínsko. Předmětem ochrany jsou především přirozená lesní společenstva, zejména kamejkové habrodřínové doubravy a jasanové prameniště olšiny, kde žije mnoho chráněných a ohrožených rostlinných druhů, například *Leucjum vernum*, *Epipactis microphylla*, *Orchis purpurea*, *Epipactis purpurea*, *Epipactis microphylla*, *Cephalanthera rubra*, *Cephalanthera damasonium*, *Platanthera bifolia*, *Lithospermum purpurocaeruleum* (www.kokorinsko.ochranaprirody.cz).



Obrázek 13: Lokalita v NPR Čtvrtě, foto Radka Broumová

Jedná se o lesní porost na jižním okraji Jabkenické plošiny na jižních svazích mezi obcemi Studce a Mcely. Nadmořská výška se zde pohybuje mezi 218-270 m, výměra rezervace činí 95,3 ha a byla vyhlášena v roce 1989. Geologie na této lokalitě se vyznačuje terasovitými štěrkopísky a křídovými nepropustnými horninami, součástí kterých jsou vodonosné horizonty s četnými prameny (Ložek a kol., 2005).

Orchideje upřednostňují prosvětlené lesní porosty. Ty zde byly v minulosti udržovány ve formě hospodaření nízkého lesa (pařezení). Po převodu na vysokokmenný les se zvyšujícím se zastíněním tyto druhy z bylinného patra ustoupily. Některé historicky udávané druhy, se již v území pravděpodobně nevyskytují. V těchto částech je proto les jednotlivým a skupinovým výběrem účelově prosvětlován tak, aby byly vytvořeny příznivější světelné podmínky pro vzácné druhy organismů (www.kokorinsko.ochranaprirody.cz).

Jak také uvádí Ložek a kol. (2005), NPR Čtvrtě je potřeba citlivě lesnický obhospodařovat. Postupně se musí odstranit výsadby smrku a udržovat dále nízký typ lesa.

Konkrétní lokalita (N 50°17.7', E 15°3.8'), kde byly sledovány parametry fitness a odebírány tobolky pro pokusy výsevu se nachází v lesních porostech bazifilních doubrav, ve které roste populací s více jak 100 kvetoucími jedinci.

4.3.5 Skalička

Lokalita u obce Skalička (N 49°21.5', E 16°31.4') se nachází v Jihomoravském kraji v okrese Brno-venkov. Lokalita čítá více jak 100 jedinců v zapojené dubohabřině.

Tato lokalita není v žádném zájmu ochrany přírody. Nadmořská výška se pohybuje okolo 320 metrů. Lokalita se vyskytuje východně v těsné blízkosti obce Skalička a pod ní protéká potok Lažánka.



Obrázek 14: Druh *Orchis purpurea* na lokalitě u obce Skalička, foto Radka Broumová

Vyskytují se zde druhy rostlin například *Alliaria petiolata*, *Astragalus glycyphyllos*, *Bromus benekenii*, *Convalaria majalis*, *Fragaria moschata*, *Galium aparine*, *odoratum a sylvaticum*, *Impatiens parviflora*, *Melitis melissophyllum*, *Orchis purpurea*, *Polygonatum multiflorum*, *Pulmonaria obscura*, *Epipactis helleborine*.

Dle geologické mapy se jedná o zpevněný sediment obsahující slínovce a vápence, soustava český masiv, region česká křídová pánev (www.mapy.geology.cz).

4.3.6 Kryry

Lokalita u města Kryry (N 50.1626694, E 13.4400397) se nachází se v okrese Louny na rozhraní Ústeckého a Středočeského kraje. Tato lokalita se nachází v blízkosti města Kryry přibližně 1,3km jihozápadním směrem od železničního nádraží. Jedná se o svah nad silnicí na Březnici.

Orchis purpurea se zde tedy vyskytuje na jižně orientovaném svahu v nadmořské výšce přibližně 350-375 m., v dubovém velmi prosvětleném lesostepním porostu.

Pod touto strání protéká potok Březnice a Podvinecký. Lokalita čítá přibližně okolo 20-40 kvetoucích jedinců za rok. Lokalita není v žádném zájmu ochrany přírody.

Z bylin se na této lokalitě vyskytuje například *Anthericum liliago*, *Anthericum ramosum*, *Securigera varia*, *Scabiosa canescens*, *Aster amellus*, *Trifolium alpestre*, *Geranium sanguineum*, *Stipa pennata*, *Anthriscus sylvestris*, *Astragalus cicer*, *Astragalus glycyphyllos*, *Melittis melissophyllum*, *Cephalanthera damasonium*, *Inula hirta*, *Carex humilis*, *Myosotis sparsiflora*, *Veronica teucrium*, *Veronica vindobonensis*, *Anemone sylvestris*, *Cotoneaster integerrimus*, *Peucedanum cervaria*, *Salvia verticillata*, *Vincetoxicum hirundinaria*, *Platanthera chlorantha* (ojediněle), *Orobanche kochii*, *Thalictrum minus*, *Orchis purpurea*.

Dle geologické mapy se jedná o sediment zpevněný, hnědočervené jílovce, prachovce a pískovce. Jedná se o soustavu Český masiv, oblast svrchní karbon a perm, region středočeské a západočeské mladší paleozoikum, souvrství líňské (www.mapy.geology.cz).



Obrázek 15: Stráž u města Kryčkov

5 Metodika

5.1 Terénní práce:

U námi zkoumaného druhu *Orchis purpurea* probíhá období kvetení v rozmezí od poloviny dubna do konce června a dozrávání tobolek a vypadávaní semen probíhá v rozmezí května a srpna, v tato období musí tedy proběhnout terénní práce.

Terénní práce spočívaly ve zhodnocení stanovištních podmínek a stavu populace druhu *Orchis purpurea*, a to změřením parametrů fitness a odebráním tobolek *pro in situ* a *ex situ* výsevy semen.

Na každé z šesti zkoumaných lokalit byly určeny tři rostliny z každé z kategorií podle rozdílných parametrů fitness (viz tabulka č. 6). Rostliny musely splňovat kritéria pro zařazení do jednotlivých kategorií pro malé, průměrné a velké rostliny. U jedinců, kteří splňovali parametry fitness podle jednotlivých kategorií, byly odebírány tobolky pro následné výsevy semen. Na každé lokalitě byly tedy odebrány z každé kategorie rostlin dvě tobolky ze tří rostlin. Tobolky byly odebírány ze spodní strany květenství z důvodů předpokládané větší zralosti, jelikož květy se začínají rozvíjet od spodu květenství.

Tabulka 6: Rozměry kategorií rostlin podle kategorií parametrů fitness

| Kategorie parametrů fitness | Výška prýtu (cm) | Počet listů (cm) | Počet květů (ks) |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Malé rostliny | do 34 | do 3 | do 35 |
| Střední rostliny | 35-69 | 4-5 | 36-55 |
| Velké rostliny | 70 a více | 6 a více | 56 a více |

Tobolky byly sbírány skalpelem, ukládány do papírových sáčků a následně měsíc přichycené ve volném prostoru pro doschnutí a dozrání (1 měsíce) a poté uskladněny ve 4°C ve tmě v chladničce.

Terénní práce probíhaly v letech 2020 a 2021.

5.2 Laboratorní práce

Laboratorní práce se skládaly z pokusu výsevů metodou *in vitro* a *ex situ*. Postupy jednotlivých pokusů jsou uvedeny níže.

5.2.1 Výsevy semen metodou *in vitro*

V září roku 2020 byla provedena první část pokusu výsevů semen metodou *in vitro*. V tomto roce byl pokus zaměřen mimo jiné na různé způsoby stratifikace semen, konkrétně způsoby povrchové sterilizace a skarifikace semen rozlišených podle doby účinku používaných látek a podle použití chlornanu vápenatého spolu s kyselinou sírovou, nebo pouze chlornanu vápenatého. Semena v tomto roce byla tedy sledována v závislosti na jednotlivých lokalitách, parametrech fitness rostlin a způsobu povrchové sterilizace a skarifikace semen. V tomto roce bylo vyseto 324 vzorků (vysetá semena do živného média v Petriho miskách). U každé z šesti lokalit byla semena rozdělena podle parametrů fitness a stratifikována šesti způsoby popsané níže. Pro každý druh stratifikace semen byly vysety tři vzorky.

V září roku 2021 proběhla druhá část pokusu výsevu touto metodou. V tomto roce byl již použit pouze jeden způsob stratifikace semen, a to konkrétně **varianta d** popsaná níže. Semena byla tedy v tomto roce sledována v závislosti na jednotlivých lokalitách a parametrech fitness rostlin. V tomto roce bylo vyseto 54 vzorků (zasetá semena do živného média v Petriho miskách). U každé z šesti lokalit byla semena rozdělena podle parametrů fitness a pro každou sledovanou skupinu byly vysety tři vzorky.

Dále v tomto roce proběhl přidružený pokus zaměřující se na druhy médií. Tento pokus si kladl za cíl prokázat účinnost kinetinu (cytokinin) a aktivního uhlí přidaných do média BM1 na životaschopnosti a klíčivosti semen. V tomto pokusu byla semena rozdělena podle jednotlivých lokalit, stratifikována stejným způsobem (varianta d, uvedeno níže) a vyseta na čtyři druhy médií (viz. tab. č. 8). Dohromady bylo vyseto 72 vzorků.

5.2.1.1 Příprava živných médií

Živná média pro *in vitro* výsevy semen druhu *Orchis purpurea* byla připravována smícháním média BM1 (Phygenera), kinetinu (dále už jen KIN), MES (2-ethansulfonová kyselina) a aktivního uhlí (dále už jen AC). V následující tabulce č. 7

je uvedeno přesné složení a množství jednotlivých látek. Hladina pH médií bylo stabilizováno na rozmezí 5,5– 5,6.

Média byla připravována následovně:

- Pro sterilizaci médií v autoklávu byly používány pro to určené uzavíratelné láhve s objemem 0,5 litru, proto je nejprve nutné přepočítat množství přidávaných látek na 0,5 litru.
- Nejprve bylo do skleněné kádinky přidáno 21,191 (g/l) BM1 (složení viz. tabulka č. 7) a MES (2-ethansulfonová kyselina) (1 g/l) a doplněno demineralizovanou vodou do přibližně tří čtvrtin potřebného konečného množství média. Dále byl přimíchán kinetin (1 mg/l) a demineralizovaná voda doplněna do 0,4 l.
- Následně bylo pH měřeno pomocí pH metru a stabilizováno na rozmezí 5,5– 5,6 pomocí hydroxidu draselného (mol^{-1}) při potřebě zvýšení nebo kyseliny chlorovodíkové (mol^{-1}) při potřebě snížení.
- Dále bylo přidáno aktivní uhlí (0,5 g/l) a následně gerlit (5 g/l).
- Všechny přidávané látky byly následně rozmíchávány na ohřívací magnetické míchačce.
- Poté bylo ze skleněné kádinky připravené médium přelito do připravených uzavíratelných láhví (0,5 l). Tyto naplněné láhve byly vloženy do autoklávu na 15 minut při teplotě 121°C. Důležité je nezapomenout povolit uzavíratelná víčka sklenic.
- Po dokončení autoklávování je nutné počkat, než teplota a tlak klesne na nulu, poté se dvířka povolí a sklenice se musí nechat vychladnout na cca 40°C. Následně se média opatrně ve Flow boxu rozlévala do jednotlivých Petriho misek (20 ml na jednu Petriho misku).
- Rozlitá média uzavřena druhou částí Petriho misky byla následně uzavřena v polyetylenových sáčkách a uložena ve tmě. Pro samotný výsev je potřeba nechat média několik dní utuhnout a sledovat, zda se neprojeví kontaminace.

Tabulka 7: Složení a množství látek obsažených v živném médiu, upravená tabulka z webové stránky www.phygenera.de

| | mg/l |
|--|--------------|
| Složení komerčního média BM1 | |
| Kyselina boritá | 10 |
| Chlorid kobaltový•6H ₂ O | 0,25 |
| Síran měďnatý•5H ₂ O | 0,25 |
| Na ₂ EDTA•2H ₂ O | 37,25 |
| Síran železnatý•7H ₂ O | 27,85 |
| Síran hořečnatý | 100 |
| Síran manganatý•H ₂ O | 25 |
| Kyselina molybdická •2H ₂ O | 0,25 |
| Fosforečnan draselný | 300 |
| Síran zinečnatý•7H ₂ O | 10 |
| D-Biotin | 0,05 |
| Kasein enzymatický hydrolyzát | 500 |
| Kyselina listová | 0,5 |
| L-glutamin | 100 |
| Glycin | 0,5 |
| Myo-inositol | 100 |
| Kyselina nikotinová | 5 |
| Pyridoxin•HCl | 0,5 |
| Sacharóza | 20000 |
| Thiamin•HCl | 0,5 |
| Celkem | 21191 |
| Další přidané látky | |
| Gerlit | 5000 |
| MES | 1000 |
| Aktivní uhlí | 500 |
| Kinetin | 1 |

Pro přidružený pokus na druhy médií, který si kladl za cíl prokázat účinnost kinetinu (cytokinin) a aktivního uhlí přidaných do média BM1. Byly připraveny čtyři druhy médií (viz tabulka č. 8). Médium číslo 4 obsahující kinetin i aktivní uhlí bylo používáno v hlavních pokusech výsevů in vitro v roce 2020 a 2021.

Tabulka 8: Tabulka zobrazující druhy médií a jejich složení, které byly použity pro přidružený pokus, který si kladl za cíl prokázat účinnost kinetinu a aktivního uhlí přidávaných do média BM1 na životaschopnost a klíčivost semen

| Číselné označení média | Základní médium | Přidávané látky, u kterých byla zjišťována jejich účinnost | |
|------------------------|---|--|--------------|
| Médium č. 1 | BM1 (21,191 g/l) + MES (1 g/l) + Gerlit (5 g/l) | AC (0,5 g/l) | |
| Médium č. 2 | BM1 (21,191 g/l) + MES (1 g/l) + Gerlit (5 g/l) | | |
| Médium č. 3 | BM1 (21,191 g/l) + MES (1 g/l) + Gerlit (5 g/l) | KIN (1 mg/l) | |
| Médium č. 4 | BM1 (21,191 g/l) + MES (1 g/l) + Gerlit (5 g/l) | AC (0,5 g/l) | KIN (1 mg/l) |

5.2.1.2 Stratifikace (povrchová sterilizace a skarifikace semen)

Povrchová sterilizace a skarifikace semen byla prováděna šesti způsoby. K povrchové sterilizaci a skarifikaci semen byl použit 70% líh, 2% kyselina sírová (H_2SO_4) a 2 % chlornan vápenatý $Ca(OCl)_2$.

Varianty použitých druhů povrchové sterilizace a skarifikace semen: používané látky jsou uvedené v pořadí, ve kterém byly nabírány.

- a) líh: 4-5 minut, H_2SO_4 : 10 minut, $Ca(OCl)_2$: 5 minut
- b) líh: 4-5 minut, H_2SO_4 : 10 minut, $Ca(OCl)_2$: 8 minut
- c) líh: 4-5 minut, H_2SO_4 : 10 minut, $Ca(OCl)_2$: 11 minut
- d) líh: 4-5 minut, $Ca(OCl)_2$: 5 minut**
- e) líh: 4-5 minut, $Ca(OCl)_2$: 8 minut
- f) líh: 4-5 minut, $Ca(OCl)_2$: 11 minut

K povrchové sterilizaci a skarifikaci semen byly použity: Laurentovi plastové injekční stříkačky (objem 5ml), dva rozměry nástavných injekčních jehel (větší: G1,2 pro stratifikaci, menší: G1,6 pro výsevy), nylonová síťovina sloužící při nabírání a proplachování sterilizačních látek, tak aby semena nepropadávala, připravené

povrchově sterilizační a skarifikační látky a demineralizovaná voda viz obrázek č. 16.

Povrchová sterilizace a skarifikace semen probíhá následovně:

- Příprava sterilizačních a skarifikačních látek: rozředění 96 % lihu na 70 %, rozředění 33 % kyseliny sírové (H_2SO_4) na 2 % a příprava 2% roztoku chlornanu vápenatého ($Ca(OCl)_2$) (rozředění 10 g chlornanu vápenatého v 50 ml destilované vody a po 60 minutách přefiltrování filtračním papírem do nové baňky).
- Příprava sterilní destilované vody autoklávováním (121 °C po dobu 15 minut) destilované vody, sloužící k proplachování dezinfekčních látek.
- Nastříhání nylonové síťoviny s okem 42 mikrometru na malé čtverce o rozměrech 2x2 cm.
- Homogenizace semen dle jednotlivých kategorií určených podle lokality, rozdílných parametrů fitness a druhu dezinfekce. Homogenizace probíhala promícháním semen z tobolek ze tří rostlin dle jednotlivých kategorií.
- Umístění semen do injekčních stříkaček vysunutím a zpětným zasunutím pístu stříkačky a přiložení nylonové síťoviny ke špičce stříkačky, kterou následně upevní nasazená injekční jehla (užší).
- Příprava Petriho misek: popis misek dle kategorií semen a jejich umístění do laboratorní digestoře.
- Příprava stopek a soupisu časů jednotlivých dezinfekčních látek pro možnost výsevu u více vzorků najednou. Konkrétně byly u každé kategorie vysety semena do tří Petriho misek.
- Povrchová sterilizace a skarifikace semen: probíhala nabíráním jednotlivých látek do injekční stříkačky a ponecháváním semen v používaných látkách po stanovené časové rozhraní. Mezi jednotlivými látkami je potřeba semena 3x propláchnout v připravené sterilní destilované vodě. Po konečném propláchnutí se opatrně odebere jehla se síťovinou a připevní se samotná jehla (větší) skrze kterou se následně vysévají semena do připravených

živných médií v Petriho miskách v aseptických podmínkách laminárního boxu s horizontálním prouděním vzduchu (Flow boxu).



Obrázek 16: Připravená média, dezinfekční látky a semena druhu *Orchis purpurea* v injekčních stříkačkách pro výsevy v roce 2020

5.2.1.3 Dokončení práce po výsevu semen a uskladnění vzorků

Po dokončení výsevů je nutné mít připravené nastříhané pásy Parafilmu (šířka 2–3 cm a délka 10 cm), kterými upevníme horní část Petriho misky na spodní, ve které proběhl výsev do živného média. Parafilmové pásy byly na jeden vzorek použity dva kusy.

Vzorky byly následně uskladněny v klimaboxech 12 měsíců ve tmě při teplotě $22 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

5.2.1.4 Vyhodnocení vzorků

Po uplynutí 12 měsíců uskladnění byly jednotlivé vzorky semen viz obrázek č. 17 foceny digitálním mikroskopem typu Leica DVM6 M. Fotky semen a protokormů byly následně okulárně vyhodnocovány. U každého vzorku byla počítána semena životaschopná, neživotaschopná a protokormy do 100 kusů. Z výsledných dat byla vyhodnocována životaschopnost a klíčivost semen. Životaschopnost semen byla

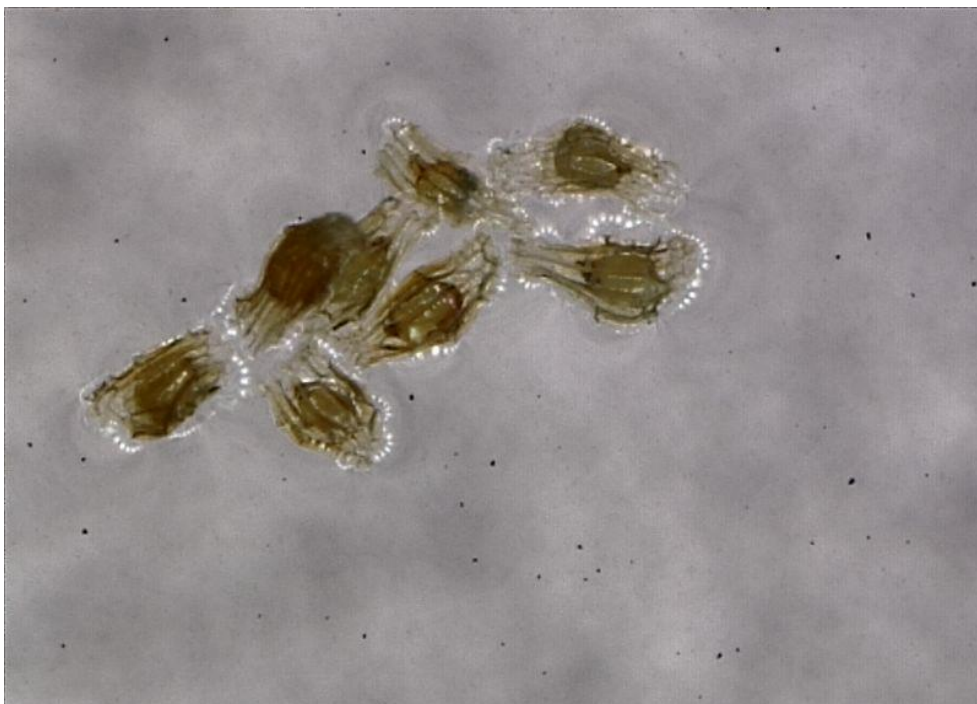
počítána z životaschopných semen včetně protokormů a klíčivost semen pouze z protokormů.



Obrázek 17: Vzorky semen a protokormů druhu *Orchis purpurea* připravené k focení na mikroskopu Leica

5.2.1.4.1 Životoschopná a neživotoschopná semena

Jako životaschopná semena byla určena semena, u kterých je patrné, že se uvnitř vyskytuje embryo a vyvinuté protokormy a jako neživotoschopná byla určena semena poloprázdná a prázdná. Ukázka vyhodnocování semen je znázorněna v níže vložených fotografiích č. 18 a 19 z mikroskopu Leica DVM6 M.



Obrázek 18: Životaschopná semena (semena s vyvinutým embryem) druhu *Orchis purpurea*



Obrázek 19: Neživotaschopná semena (semena s nevyvinutým embryem) druhu *Orchis purpurea*

5.2.1.4.2 Protokormy

Protokormy jsou semena, která začala klíčit ve formě stádia nezeleného výhonku neboli protokormu (viz obrázky č. 20 a 21).



Obrázek 20: Vyvinuté protokormy druhu *Orchis purpurea* foceny mikroskopem Leica DVM6 M



Obrázek 21: Vyvinutý protokorm druhu *Orchis purpurea* focen mikroskopem Leica DVM6 M

5.2.2 Výsevy semen metodou *ex situ*

Pro pokus výsevů semen metodou *ex situ* byla semena opět rozlišena podle jednotlivých lokalit a parametrů fitness.

K pokusu byly potřeba diarámečky, nylonová síťovina, odebrané (dezintegrované) půdy z jednotlivých lokalit, netkaná textilie a zahradní bedýnka.

V tomto pokusu bylo vyseto šest vzorků (diarámečků se semeny v nylonové síťovině) se semeny podle jednotlivých lokalit, které obsahovaly 100 ks.

Samotný pokus probíhal následovně:

- Odebrání dezintegrovaných vzorků půdy z jednotlivých lokalit.
- Příprava zahradní bedýnky, do které byly umístěny sešité kapsy z netkané textilie naplněné půdou z jednotlivých lokalit.
- Příprava diarámečků a nastříhání nylonové síťoviny s okem 42 mikrometrů v takové velikosti, aby se síťovina dala překlopit a zároveň byla o přibližně centimetr větší než samotný diarámeček.
- Semena podle jednotlivých kategorií v závislosti na lokalitě a parametrech fitness rostlin byla spočítána po 100 kusech pod binolupou.
- Každá kategorie semen byla následně vložena do síťoviny a vložena do otevřeného diarámečku, který následným zaklapnutím upevní semena v síťovině.
- Připravené diarámečky se semeny byly uloženy do připravené půdy v kapsách z netkané textilie. Tyto kapsy byly uloženy v zahradní bedýnce a umístěny do připraveného vykopaného otvoru v půdě.
- Po dvou letech byly diarámečky vyjmuty. Samotné rámečky se musely nejprve omýt, následně opatrně rozevřít a nechat pár minut vyschnout síťovinu se semeny. Následně byla semena opatrně štětečkem přesunuta do Petriho misky.
- Semena v Petriho miskách po jednotlivých variantách dle různých lokalit a parametrů fitness byla přesunuta pod binolupou. Pod misku byl položen černý

papír, aby byla semena dobře vidět. Následně byla semena spočítána a vyhodnocena na životaschopná, neživotaschopná a protokormy.

5.2.2.1 Práce s daty

Výsledná data byla zpracovávána v programu Statistika 14. K zobrazení výsledků byly použity krabicové grafy.

Normalita dat byla zjišťována pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. Za účelem zlepšení distribuce hodnot proměnných s jiným, než normálním rozdělením byla provedena transformace dat (odmocnění, zlogaritmování), normality dat ale nebylo dosaženo.

Byly prováděny analýzy porovnávající více výběrů. Při testování rozdílů hodnot byla v případě normálního rozdělení dat použita parametrická analýza variance, konkrétně F test (ANOVA), v opačném případě Kurskal-Wallisův test. Konkrétní rozdíly mezi jednotlivými lokalitami, kategoriemi parametrů fitness rostlin a druhy médií byly zjišťovány pomocí post hoc testů konkrétně LSD Fisher testu.

Ve výsledných grafech jsou porovnávány a očíslovány konkrétní lokality, kategorie parametrů fitness a druhů médií. Legenda označení je popsána následovně v tabulce č. 9.

Tabulka 9: Používané číselné označení porovnávajících kategorií

| Číslo označení | Lokalita | Druh média | Kategorie parametrů fitness |
|----------------|--------------------|-------------|-----------------------------|
| 1 | PR Mílská stráň | BM1+AC | Malé rostliny |
| 2 | NPR Karlštejn | BM1 | Střední rostliny |
| 3 | PP Chotuc | BM1+KIN | Velké rostliny |
| 4 | NPR Čtvrť | BM1+KIN+ AC | |
| 5 | Skalička | | |
| 6 | Kryry | | |

6 Výsledky

6.1 Výsevy semen metodou ex situ

Hlavním cílem tohoto experimentu bylo zjistit klíčivost semen, tedy zda po období, kdy jsou semena zakopána v půdě, se ze semen vyvinou protokormy. Dalším krokem bylo určit, zda existují rozdíly v podílu životaschopných semen (nevyklíčená semena s plně vyvinutým embryem plus semena ze kterých se vyvinuly protokormy) mezi jednotlivými lokalitami.

Další testovanou otázkou bylo, zda závisí životaschopnost semen na kategorii parametrů fitness rostlin, ze kterých byla semena sebrána. Pro každou ze šesti lokalit byly vytvořeny tři rámečky podle parametrů fitness matečných rostlin (kategorie malé, střední a velké rostliny). Celkem bylo analyzováno 18 vzorků.

Ani po dvou letech trvání experimentu nevznikl jediný protokorm. Klíčivost semen byla tedy nulová. Značné množství semen však zůstalo v životaschopném stavu.

Bylo tedy alespoň analyzováno, zda je podíl životaschopných semen rozdílný v závislosti na lokalitě, nebo kategorii fitness. Ani jedna z těchto dvou analýz nepřinesla signifikantní rozdíly mezi lokalitami (tabulka č. 10).

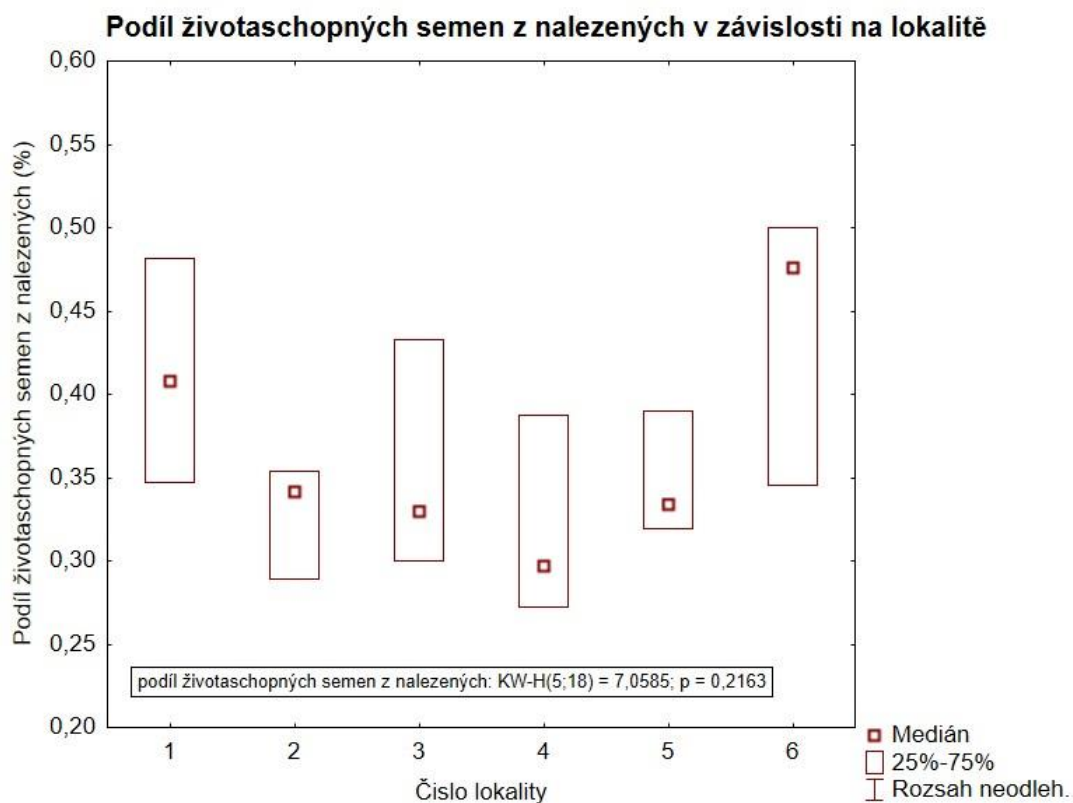
U zkoumání vlivu lokality na životaschopnost semen se pohybovaly hodnoty podílu životaschopných semen od 0,32 % do 0,44 % a mezi lokalitami byly zjevné rozdíly (nejvyšší životaschopnost lokalita č. 4 a nejnižší č. 6). Hlavním důvodem nesignifikantního výsledku je nízký počet vzorků a zejména opakování (obr. č. 22 a 23).

U vlivu parametrů fitness se zdá, že mezi jeho kategoriemi nejsou téměř žádné významné rozdíly, jelikož rozmezí hodnot životaschopnosti je poměrně úzké a pohybuje se od 0,33 % do 0,38 %.

Protokormy pro určení klíčivosti semen nebyly nalezeny na žádné ze sledovaných lokalit.

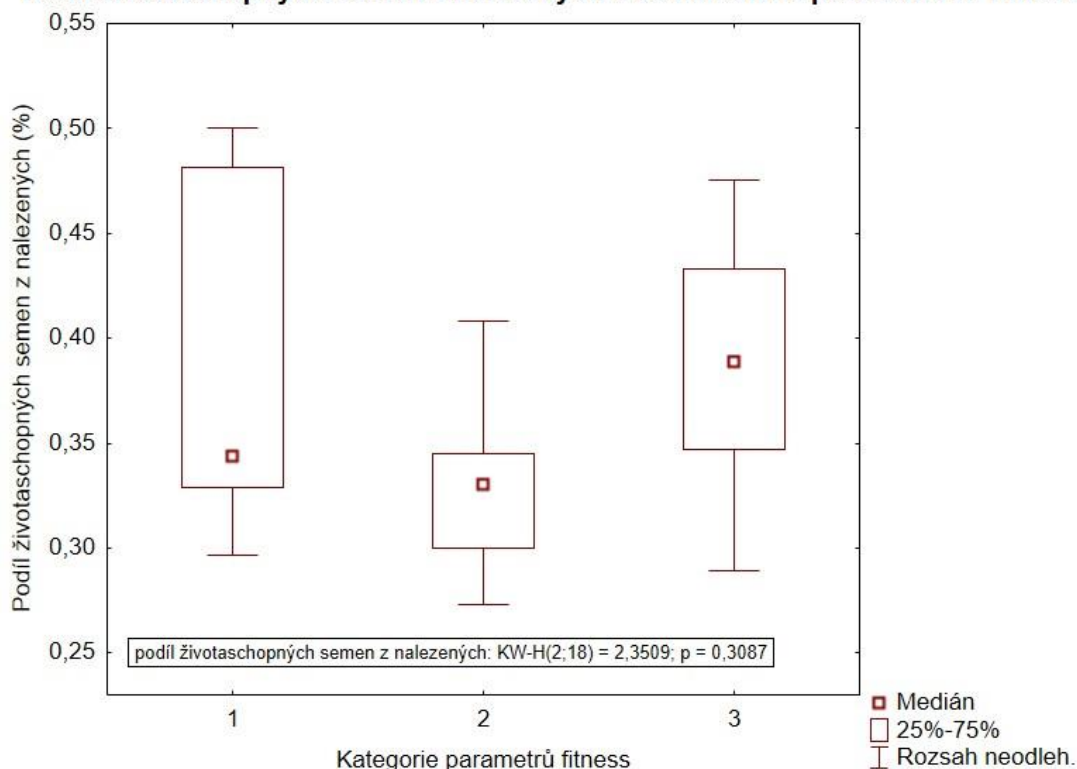
Tabulka 10: Výsledky statistických analýz z výsevů ex situ

| Výsevy ex situ | F-test | KW-H | Hladina významnosti p |
|---|--------|------|-----------------------|
| Podíl životaschopnosti semen z nalezených v závislosti na lokalitě | | 7,06 | 0,216 |
| Podíl životaschopnosti semen z nalezených v závislosti na parametrech fitness | | 2,35 | 0,309 |



Obrázek 22: Graf popisující podíl životaschopných semen z nalezených v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráž), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p = 0,216$.

Podíl životaschopných semen z nalezených v závislosti na parametrech fitness



Obrázek 23: Graf popisující podíl životaschopných semen z nalezených v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení parametrů fitness je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p = 0,309$.

6.2 Výsevy semen metodou in vitro

Vyhodnocování dat bylo rozděleno do tří pokusů. První pokus zaměřující se na klíčivost a životaschopnost semen v závislosti na druhu stratifikace (konkrétně povrchové sterilizace a skarifikace semen), lokalitě a kategoriích parametrů fitness rostlin probíhal v roce 2020. Druhý pokus zkoumající životaschopnost a klíčivost semen v závislosti na lokalitě a kategorii parametrů fitness rostlin následoval v roce 2021, a třetí také v roce 2021, avšak jednalo se o přidružený pokus zkoumající především účinnost kinetinu (cytokinin) a aktivního uhlí přidávaných do média BM1. U tohoto pokusu byla semena rovněž vysazována dle jednotlivých zkoumaných lokalit.

Výsledky statistických analýz zobrazující závislosti životaschopnosti a klíčivosti semen na konkrétní zkoumané lokalitě, fitness rostlin, stratifikaci nebo druhu média jsou shrnuty v tabulce č. 11.

Životaschopnost semen znamená, že bylo počítáno s životaschopnými semeny (semena, která mají vyvinuté embryo) včetně protokormů. Klíčivost semen byla zjišťována pouze z počtu vyklíčených protokormů.

Tabulka 11: Výsledky statistických analýz z výsevů in vitro

| Výsevy in vitro | F-test | KW | Hladina významnosti p |
|---|--------|-------|-----------------------|
| Životaschopnost semen v závislosti na způsobu stratifikace, 2020 | 0,58 | | 0,720 |
| Klíčivost semen v závislosti na způsobu stratifikace, 2020 | | 4,72 | 0,451 |
| Životaschopnost semen v závislosti na lokalitě, 2020 | 11,79 | | <0,001 |
| Klíčivost semen v závislosti na lokalitě, 2020 | | 52,53 | <0,001 |
| Životaschopnost semen v závislosti na parametrech fitness, 2020 | 4,51 | | 0,012 |
| Klíčivost semen v závislosti na parametrech fitness, 2020 | | 10,45 | 0,005 |
| Životaschopnost semen v závislosti na lokalitě, 2021 | 7,79 | | <0,001 |
| Klíčivost semen v závislosti na lokalitě, 2021 | | 9,68 | 0,085 |
| Životaschopnost semen v závislosti na parametrech fitness, 2021 | 5,22 | | 0,009 |
| Klíčivost semen v závislosti na parametrech fitness, 2021 | | 5,01 | 0,082 |
| Životaschopnost semen v závislosti na lokalitě, pokus média, 2021 | 15,26 | | 0,002 |
| Klíčivost semen v závislosti na lokalitě, pokus média, 2021 | | 19,23 | 0,002 |
| Životaschopnost semen v závislosti na duhu média 2021 | 3,65 | | 0,017 |
| Klíčivost semen v závislosti na duhu média 2021 | | 7,04 | 0,071 |

6.2.1 Závislost životaschopnosti a klíčivosti semen na lokalitě

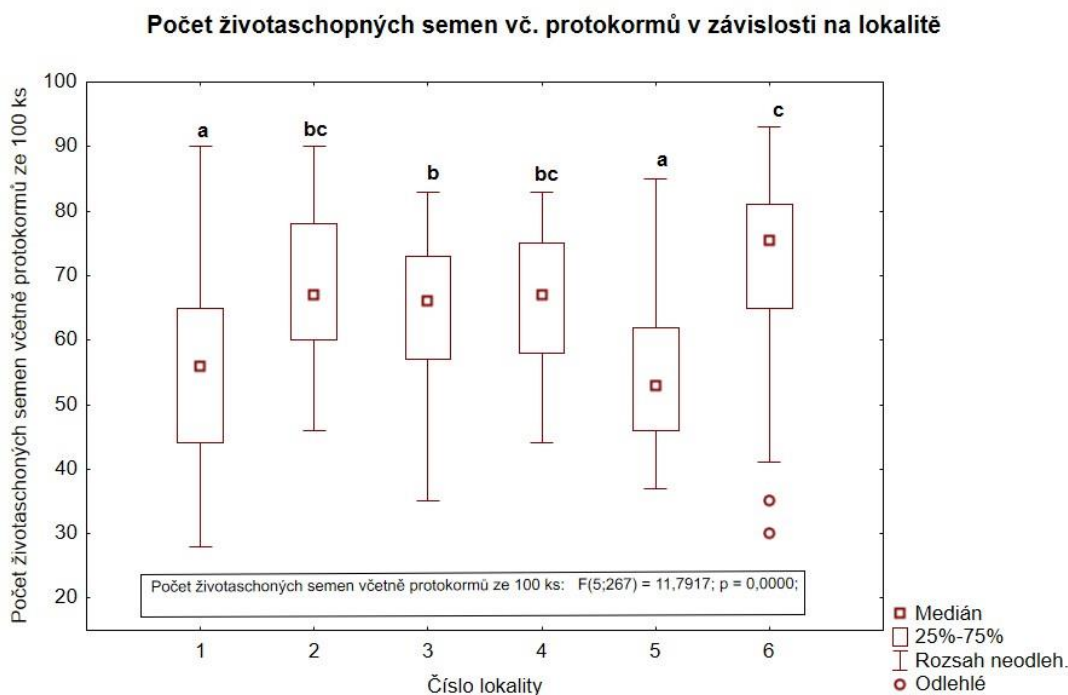
Výsledky statistických analýz zobrazující životaschopnost semen v závislosti na lokalitě byly ve všech případech signifikantní.

Lokalita č. 5 měla opakovaně jednu z nejnižších podílů životaschopnosti semen. Nízkou životaschopnost semen měla také v roce 2020 lokalita č. 1 a v roce 2021 lokality č. 2 a 3. Nejvyšší životaschopnost semen měla opakovaně lokalita č. 4 a

v roce 2020 lokalita č. 6. Poměrně vysokou životaschopnost semen měla opakovaně také lokalita č. 1.

Výsledky statistických analýz zobrazující klíčivost semen v závislosti na lokalitě byly signifikantní v roce 2020 a 2021 u pokusu s druhy médií. V roce 2021 vyšla analýza nesignifikantní, avšak hladina pravděpodobnosti se pohybovala v těsné blízkosti hladině průkaznosti, proto jsou výsledky i přes to uvedeny pro případné podpoření trendů z ostatních analýz.

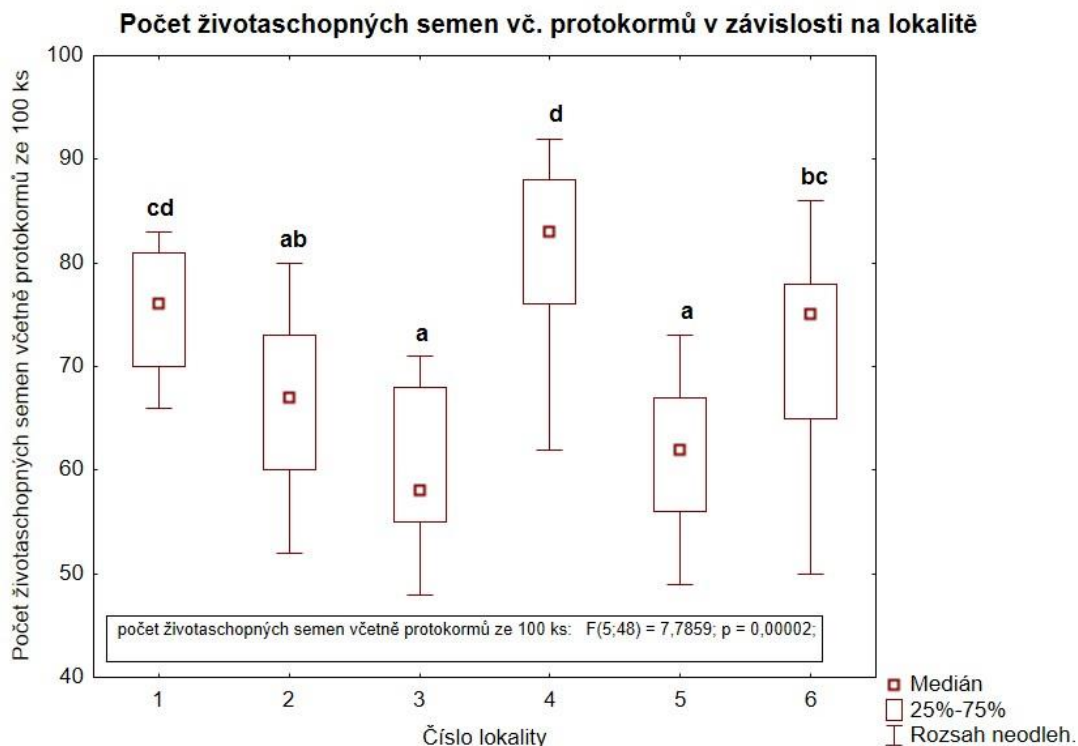
Nejnižší životaschopnost semen měla ve všech případech lokalita č. 6. Nízkou životaschopnost semen měla také opakovaně lokalita č. 4. Nejvyšší životaschopnost semen měla ve všech případech lokalita č. 5. Poměrně vysokou životaschopnost semen měly opakovaně také lokality č. 1 a 2.



Obrázek 24: Graf popisující životaschopnost semen (počet životaschopných semen vč. protokormů) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrť), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p < 0,001$.

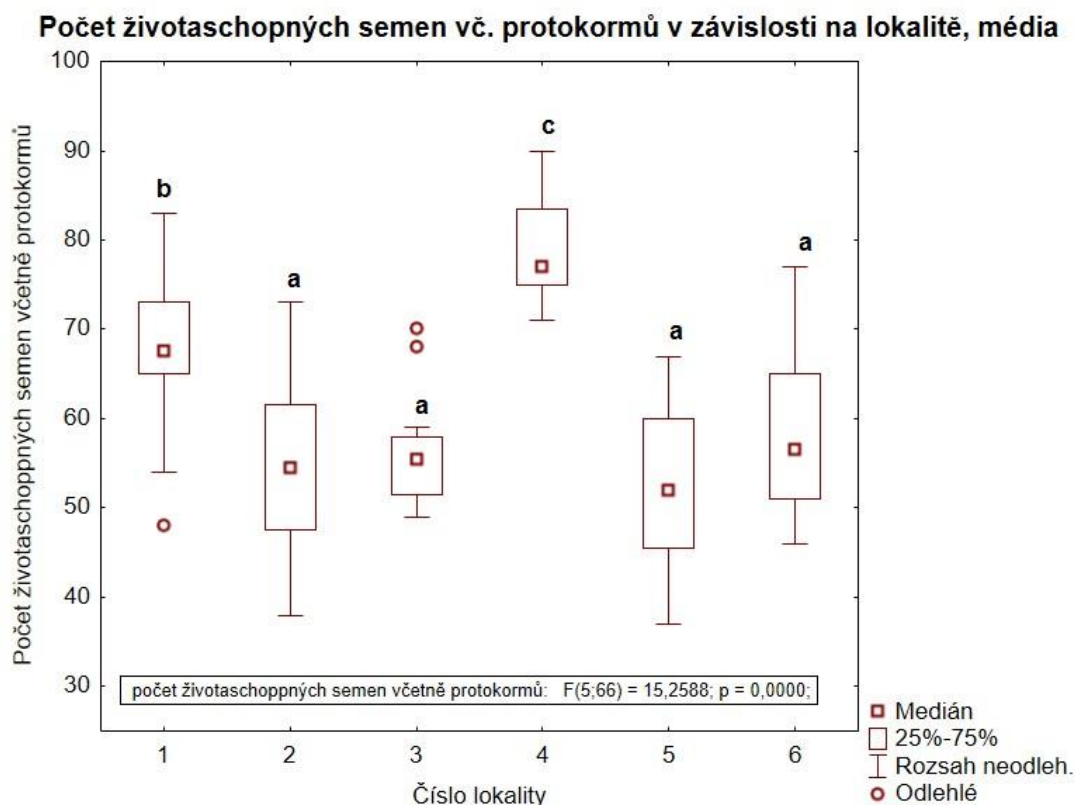
Obrázek číslo 24 zobrazuje krabicový diagram porovnávající životaschopnost semen v závislosti na lokalitě u druhu *Orchis purpurea* v roce 2020. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují lokalita č. 1 a 5, 2 a 4 a zároveň lokality č. 2 a 4 s lokalitou č. 3. Nejvyšší životaschopnost semen měly

rostliny na lokalitě č. 6 (Kryrská stráň) s průměrem 69,87 ks ze 100, nejnižší životaschopnost naopak lokalita č. 1 (PR Milská stráň) s průměrem 55,18 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = <0,001$.



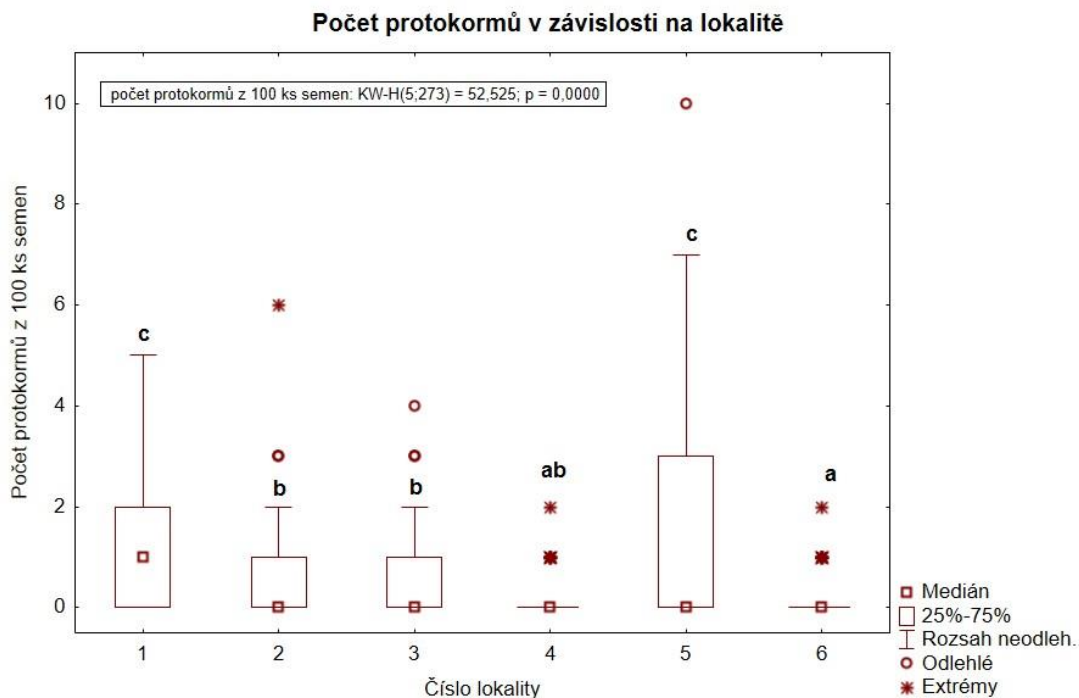
Obrázek 25: Graf popisující životaschopnost semen (počet životaschopných semen vč. protokormů) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrť), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = <0,001$.

Obrázek číslo 25 zobrazuje krabicový diagram porovnávající životaschopnost semen v závislosti na lokalitě u druhu *Orchis purpurea* v roce 2021. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují lokalita č. 3 a 5, zároveň tyto lokality s lokalitou č. 2, dále lokality č. 2 a 6, 1 a 6. Nejvyšší životaschopnost semen měly rostliny na lokalitě 4 (NPR Čtvrť) s průměrem 81 ks ze 100 a nejnižší klíčivost naopak lokalita 3 (PP Chotuc) s průměrem 59,56 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = <0,001$.



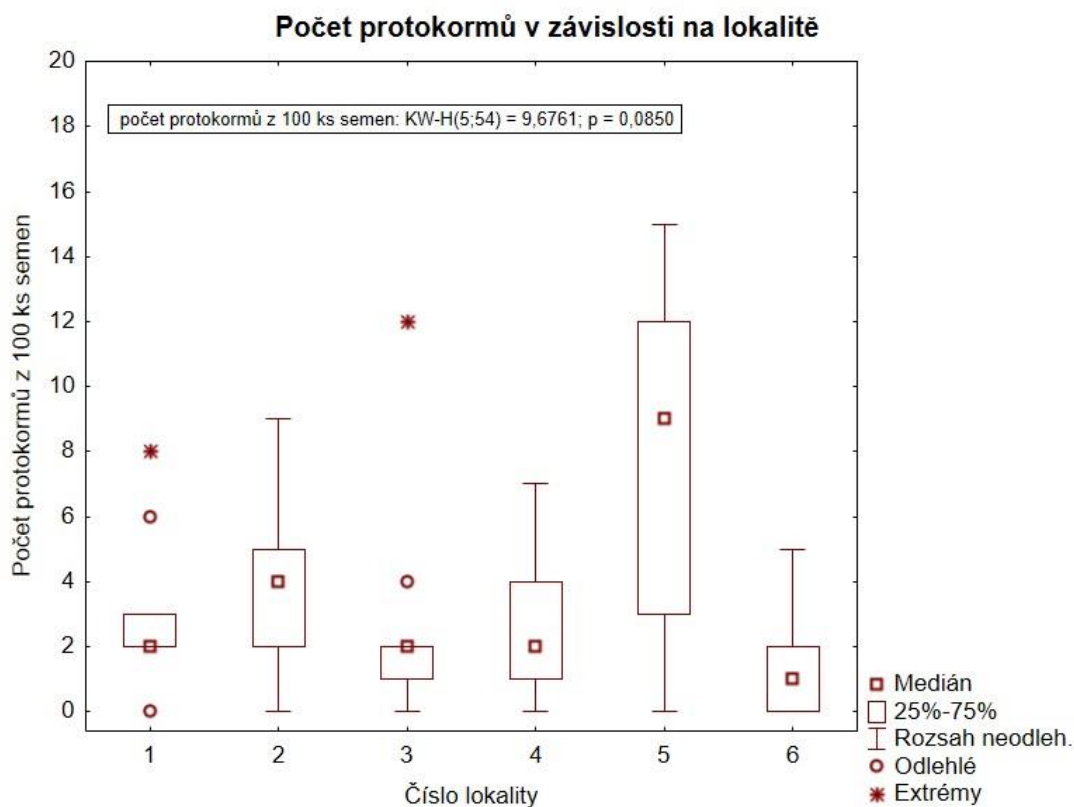
Obrázek 26: Graf popisující životaschopnost semen (počet životaschopných semen vč. protokormů) v závislosti na lokalitě. K této analýze byl použit soubor dat určený primárně k zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1 v závislosti na životaschopnosti a klíčivosti semen. Jednalo se o celkové počty životaschopných semen včetně protokormů z výsevů na médiích 1 až 4. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráž), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrť), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p < 0,001$.

Obrázek číslo 26 zobrazuje krabicový diagram porovnávající životaschopnost semen v závislosti na lokalitě u druhu *Orchis purpurea* v roce 2021. Data byla získána z pokusu týkající se účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v médiu BM1 na životaschopnost a klíčivost semen. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují lokalita č. 2, 3, 5 a 6. Nejvyšší životaschopnost semen měly rostliny na lokalitě 4 (NPR Čtvrť) s průměrem 79,08 ks ze 100, nejnižší klíčivost naopak lokalita 5 (Skalička) s průměrem 52,50 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p < 0,001$.



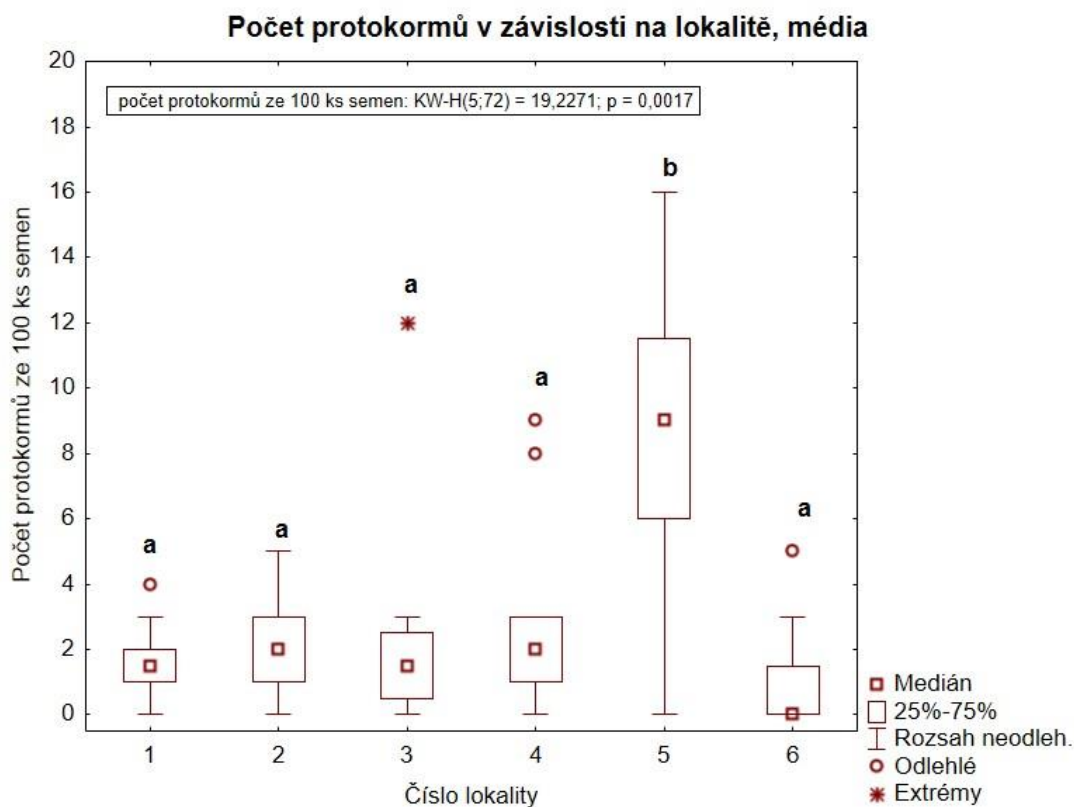
Obrázek 27: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráň), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrť), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = <0,001$.

Obrázek číslo 27 zobrazuje krabicový diagram porovnávající klíčivost semen v závislosti na lokalitě u druhu *Orchis purpurea* v roce 2020. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují lokality č. 2 a 3 a zároveň lokality č. 2 a 3 s lokalitou č. 4, dále lokality č. 1 a 5 a 4 a 6. Nejvyšší klíčivost semen měly rostliny na lokalitě č. 5 (Skalička) s průměrem 1,72 ks ze 100, nejnižší klíčivost naopak lokalita 6 (Kryry) s průměrem 0,15 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = <0,001$.



Obrázek 28: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na lokalitě. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokality je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráž), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrť), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p = 0,085$.

Obrázek číslo 28 zobrazuje krabicový diagram porovnávající klíčivost semen v závislosti na lokalitě u druhu *Orchis purpurea* v roce 2021. Nejvyšší klíčivost semen měly rostliny na lokalitě č. 5 (Skalička) s průměrem 8,0 ks ze 100, nejnižší klíčivost naopak lokalita 6 (Kryry) s průměrem 1,44 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p = 0,085$.



Obrázek 29: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na lokalitě. K této analýze byl použit soubor dat určený primárně k zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1 na životaschopnosti a klíčivosti semen. Jednalo se celkové počty vyklíčených semen z výsevů na médiích 1 až 4. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení lokalit je zobrazeno číselně: lokalita č. 1 (PR Milská stráž), lokalita č. 2 (NPR Karlštejn), lokalita č. 3 (PP Chotuc), lokalita č. 4 (NPR Čtvrť), lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička), lokalita č. 6 (lokalita u města Kryry). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p=0,002$.

Obrázek číslo 29 zobrazuje krabicový diagram porovnávající počet protokormů v závislosti na lokalitě u druhu *Orchis purpurea* v roce 2021. Data byla získána z pokusu týkající se zkoumání účinnosti kinetinu a aktivního uhlí přidaných do média BM1 na životaschopnost a klíčivost semen. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují lokality 1, 2, 3, 4 a 6. Nejvyšší klíčivost semen měly rostliny na lokalitě 5 (Skalička) s průměrem 8,5 ks ze 100, nejnižší klíčivost naopak lokalita 6 (Kryry) s průměrem 0,92 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p=0,002$.

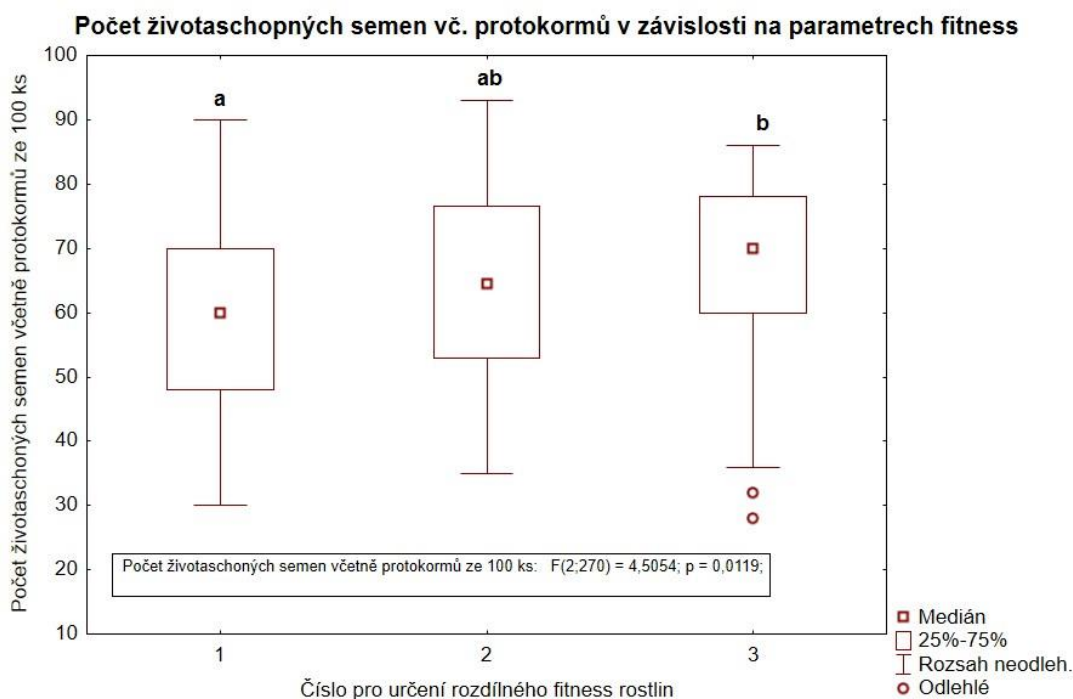
6.2.2 Závislost životaschopnosti a klíčivosti semen na parametrech fitness

Výsledky statistických analýz zobrazující životaschopnost semen v závislosti na lokalitě byly ve všech případech signifikantní.

Nejvyšší životaschopnost semen byla v roce 2020 u kategorie parametrů fitness č. 3 a nejnižší u kategorie parametrů fitness č. 1. V následujícím roce 2021 vyšly trendy parametrů fitness přesně naopak.

Výsledky statistických analýz zobrazující klíčivost semen v závislosti na kategorii parametrů fitness byly signifikantní v roce 2020. V roce 2021 vyšla analýza nesignifikantní, avšak hladina pravděpodobnosti se pohybovala v těsné blízkosti hladině průkaznosti, proto jsou výsledky v tabulce i přes to uvedeny, pro případné podpoření trendů z ostatních analýz.

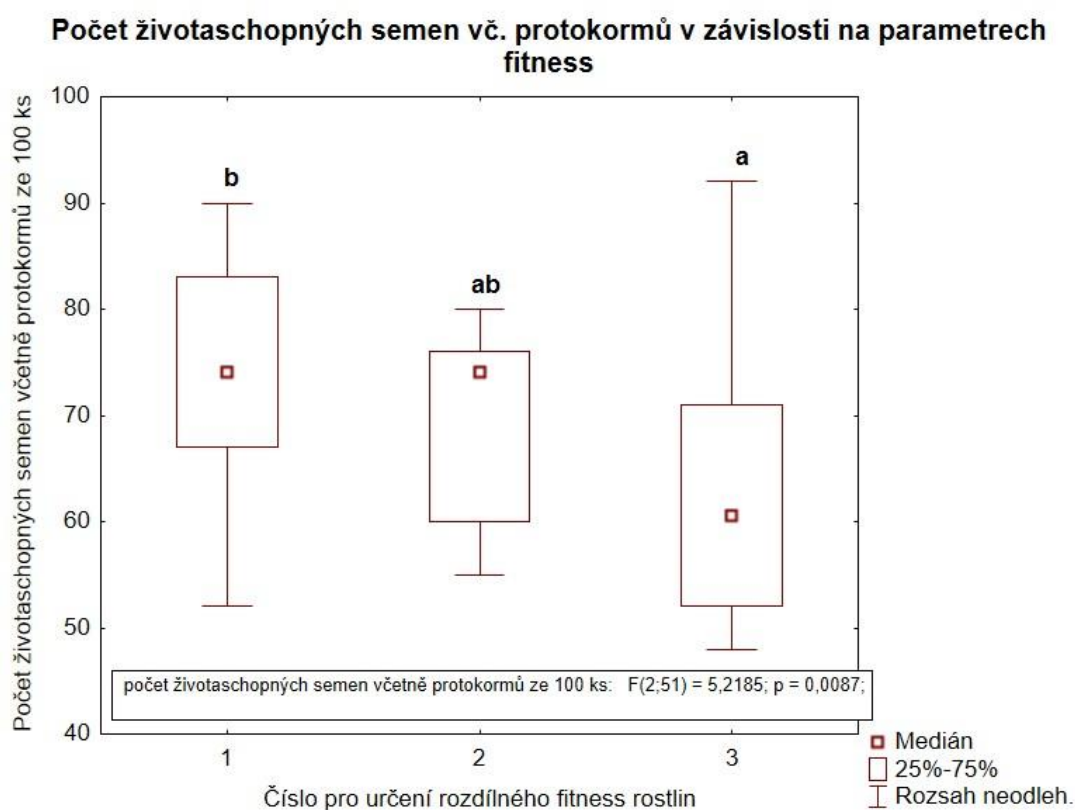
Nejvyšší klíčivost semen měla v roce 2020 kategorie fitness rostlin č. 2 a v roce 2021 lokalita č. 1. Nejnižší klíčivost měla v obou případech kategorie fitness rostlin č. 3.



Obrázek 30: Graf popisující životaschopnost semen (životaschopná semena vč. protokormů) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,012$.

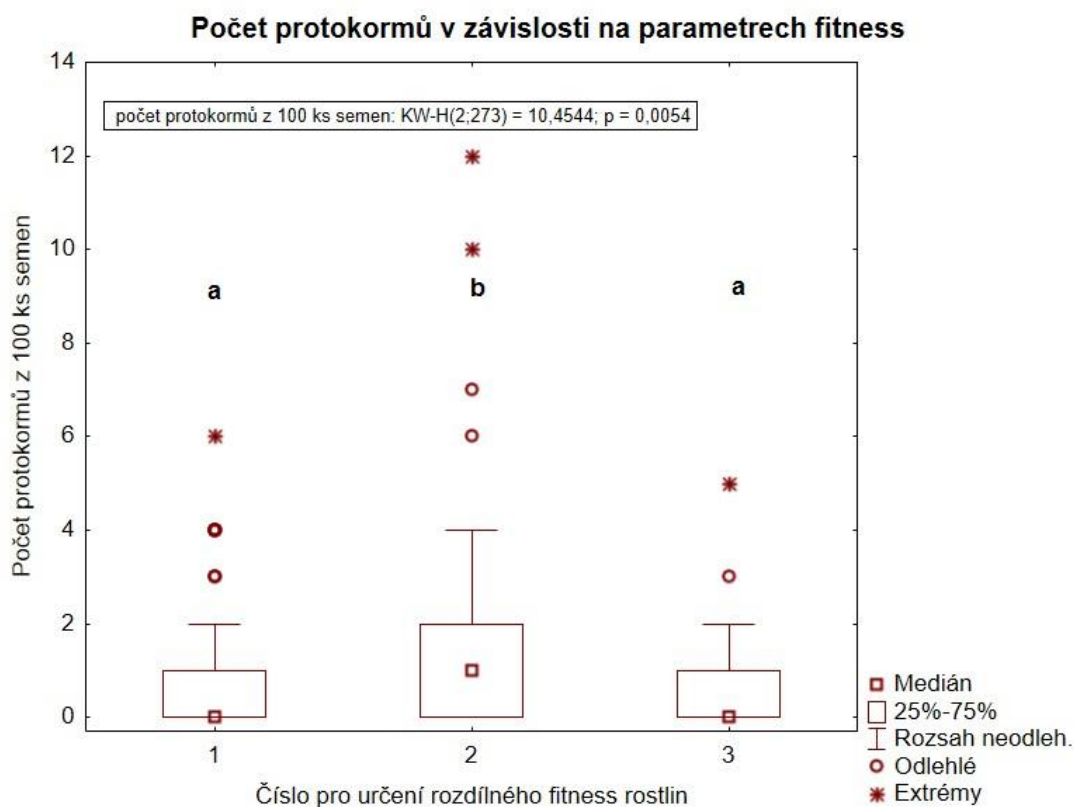
Obrázek číslo 30 zobrazuje krabicový diagram porovnávající životaschopnost semen v závislosti na parametrech fitness rostlin u druhu *Orchis purpurea* v roce 2020.

Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují fitness rostlin č. 1 a 2. Nejvyšší životaschopnost semen měly rostliny s parametry fitness č. 3 (největší rostliny) s průměrem 66,67 ks ze 100, nejnižší životaschopnost naopak rostliny s parametry fitness č. 1 s průměrem 60,42 ks ze 100 (nejmenší rostliny). Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,012$.



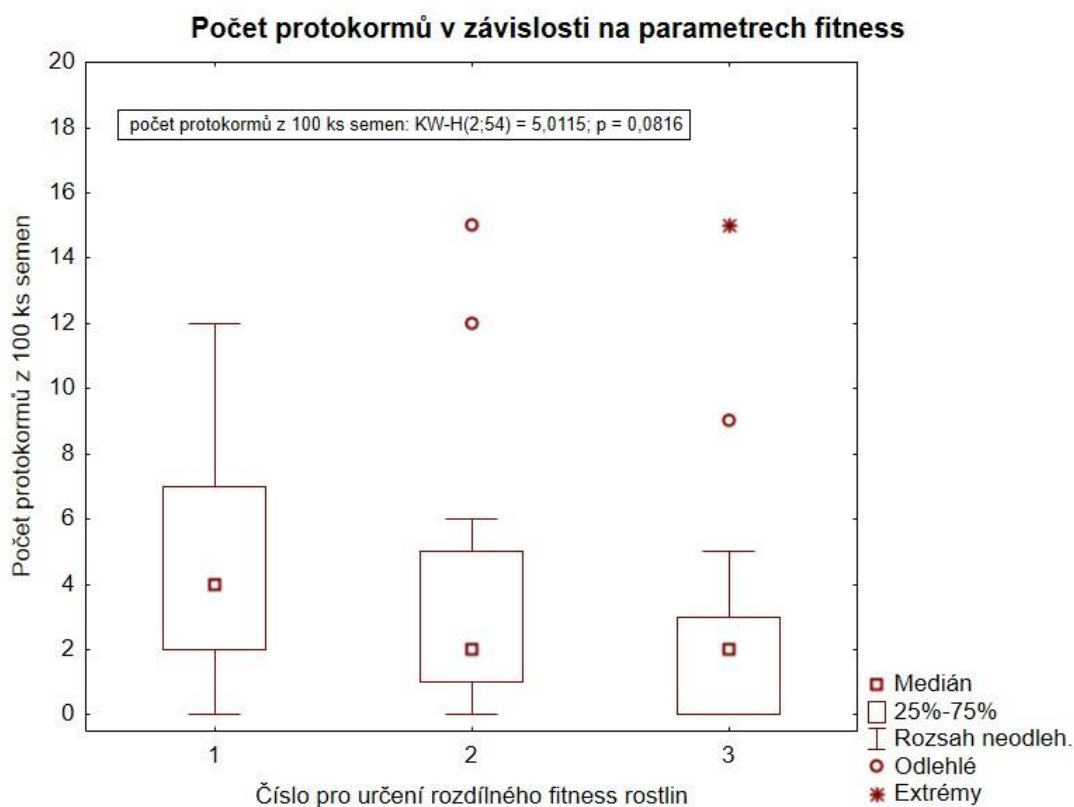
Obrázek 31: Graf popisující životaschopnost semen (životaschopná semena vč. protokormů) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,009$.

Obrázek číslo 31 zobrazuje krabicový diagram porovnávající životaschopnost semen v závislosti na parametrech fitness rostlin u druhu *Orchis purpurea* v roce 2021. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují fitness rostlin č. 2 a 3. Nejvyšší životaschopnost semen měly rostliny s parametry fitness č. 1 (nejmenší rostliny) s průměrem 74,56 ks ze 100, nejnižší životaschopnost naopak rostliny s parametry fitness č. 3 s průměrem 63,11 ks ze 100 (nejmenší rostliny). Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,009$.



Obrázek 32: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2020. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p=0,005$.

Obrázek číslo 32 zobrazuje krabicový diagram porovnávající klíčivost semen v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. *Orchis purpurea* v roce 2020. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují fitness rostlin č. 1 a 3. Nejvyšší klíčivost semen měly rostliny s parametry fitness č. 2 s průměrem 1,24 ks ze 100, nejnižší klíčivost naopak lokalita 3 s průměrem 0,49 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p=0,005$.



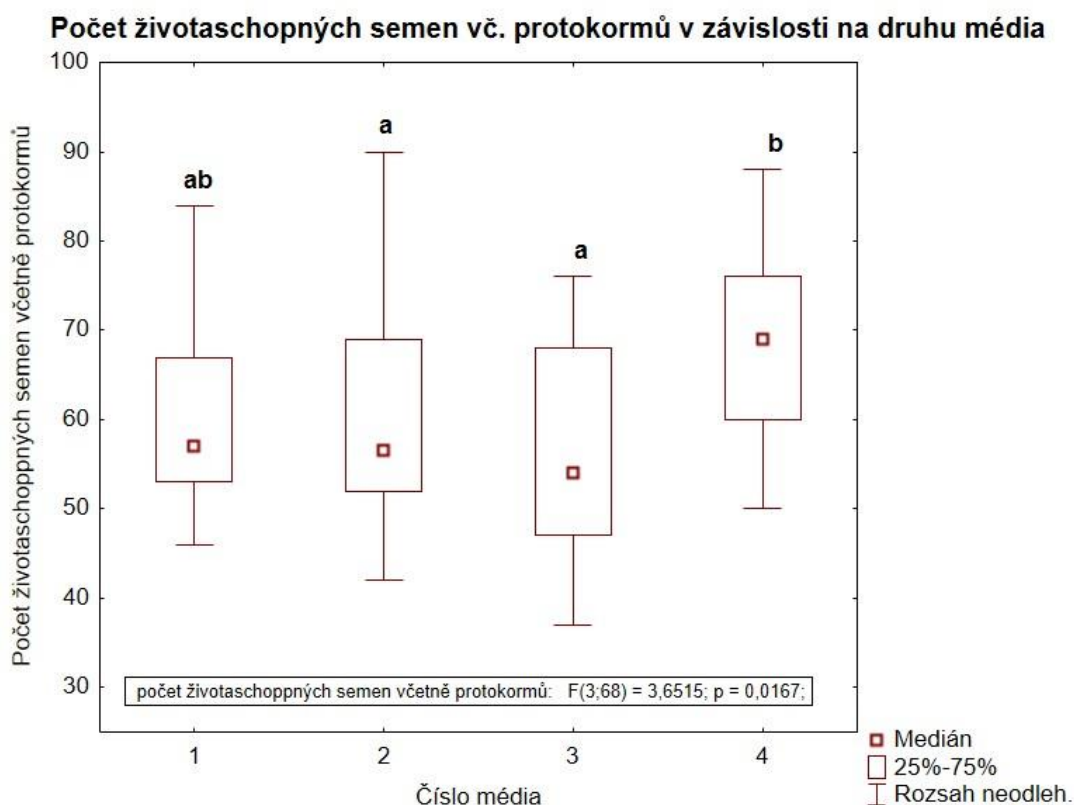
Obrázek 33: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení kategorií parametrů fitness rostlin je zobrazeno číselně: kategorie č. 1 (malé rostliny), kategorie č. 2 (střední rostliny), kategorie č. 3 (velké rostliny). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p=0,082$.

Obrázek číslo 33 zobrazuje krabicový diagram porovnávající klíčivost semen v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin. *Orchis purpurea* v roce 2021. Nejvyšší klíčivost semen měly rostliny s parametry fitness č. 1 s průměrem 4,67 ks ze 100, nejnižší klíčivost naopak lokalita 3 s průměrem 2,78 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p=0,082$.

6.2.3 Závislost životaschopnosti a klíčivosti semen na druhu média

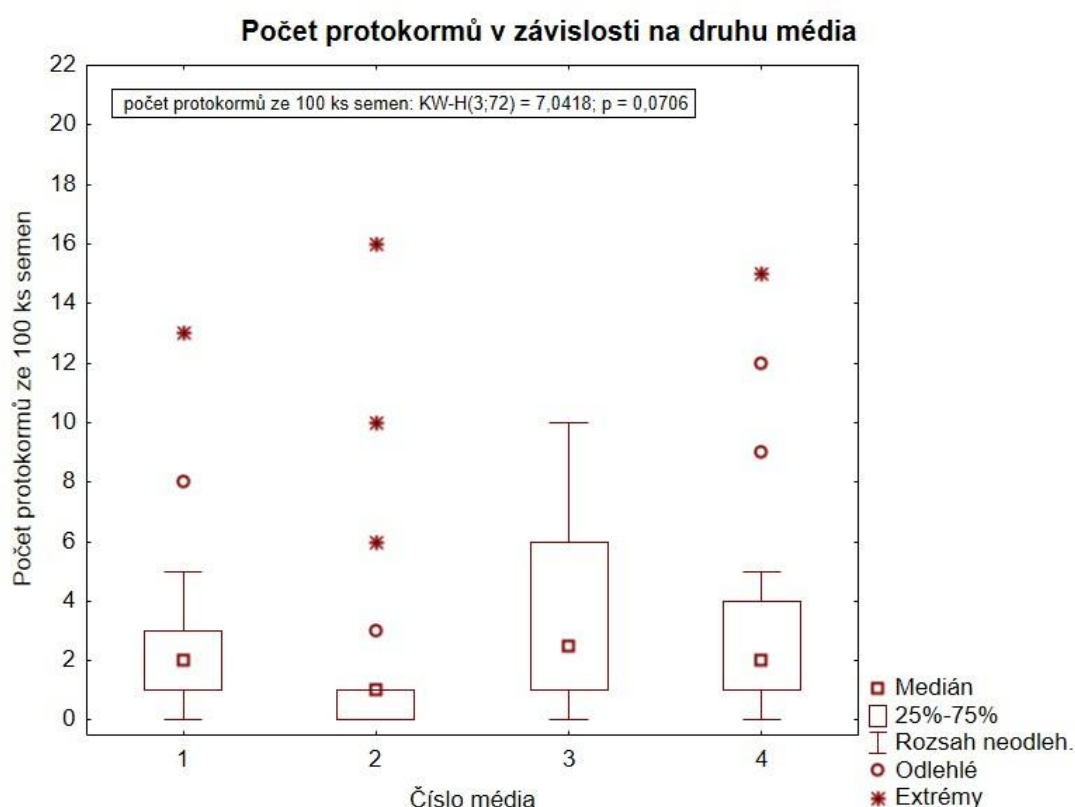
Výsledky statistických analýz zobrazující životaschopnost semen v závislosti na přidání kinetinu a aktivního uhlí do média BM1 byly signifikantní v případě životaschopnosti semen. V případě klíčivosti semen vyšla analýza nesignifikantní, avšak hladina pravděpodobnosti se pohybovala v těsné blízkosti hladině průkaznosti, proto jsou výsledky i přes to uvedeny, pro případné podpoření trendů z ostatních analýz.

Nejvyšší životaschopnost semen byla pozorována u média č. 4, stejně tak i klíčivost semen byla u tohoto média vyšší. Nejnížší životaschopnost semen byla pozorována u média č. 3., nižší životaschopnost semen byla také semena pěstována na médiu č. 2, stejně tak mělo toto médium nejnížší klíčivost semen. Nejvyšší klíčivost měla semena pěstována na médiu č 3.



Obrázek 34: Graf popisující životaschopnost semen (životaschopnost semen vč. protokormů) v závislosti na druhu média. K této analýze byl použit soubor dat určený ke zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení médií je zobrazeno číselně: médium č. 1 (BM1+AC), médium č. 2 (BM1), médium č. 3 (BM1+KIN), médium č. 4 (BM1+AC+KIN). Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p = 0,017$.

Obrázek číslo 34 zobrazuje krabicový diagram porovnávající životaschopnost semen v závislosti na druhu média u druhu *Orchis purpurea* v roce 2021. Průkaznost rozdílů je vyznačena standardní písmenkovou konvencí, kdy se shodují druhy médií č. 2 a 3, a zároveň druhy médií č. 2 a 3 s médiem č. 1. Nejvyšší životaschopnost semen měla semena rostoucí na médiu č. 4 s průměrem 68,72 ks ze 100, nejnižší životaschopnost naopak semena rostoucí na médiu č. 3 s průměrem 55,56 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy průkazná na hladině $p=0,017$.



Obrázek 35: Graf popisující klíčivost semen (protokormy) v závislosti na druhu média. K této analýze byl použit soubor dat určený ke zjištění účinnosti kinetinu a aktivního uhlí v používaném médiu BM1. Sběr tobolek a výsev semen probíhal v roce 2021. Označení médií je zobrazeno číselně: médium č. 1 (BM1+AC), médium č. 2 (BM1), médium č. 3 (BM1+KIN), médium č. 4 (BM1+AC+KIN). Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p=0,071$.

Obrázek číslo 35 zobrazuje krabicový diagram porovnávající životaschopnost semen v závislosti na druhu média u druhu *Orchis purpurea* v roce 2021. Nejvyšší životaschopnost semen měla semena rostoucí na médiu č. 3 s průměrem 3,67 ks ze 100, nejnižší životaschopnost naopak semena rostoucí na médiu č. 2 s průměrem 2,28 ks ze 100. Signifikace rozdílů je pro všechny případy neprůkazná na hladině $p=0,071$.

7 Diskuse

7.1 *Ex situ* výsevy semen

Výsevy semen metodou *ex situ* probíhaly vysazováním semen v nylonové síťovině do diarámečků, která byla následně pěstována v sešitých kapsách z netkané textilie naplněných dezintegrovanou půdou z jednotlivých zkoumaných lokalit. Tyto boxy byly kultivovány v jednotných podmínkách na záhonech v areálu šlechtitelské stanice Truba. Cílem tohoto pokusu bylo zjistit životaschopnost a klíčivost semen z jednotlivých lokalit.

Výsledky statistických analýz zobrazující životaschopnost semen v závislosti na lokalitě byl nesignifikantní, jelikož byl zpracován a vyhodnocen příliš nízký počet vzorků. Klíčivost semen nebyla vyhodnocena, protože u všech zkoumaných lokalit nebyly nalezeny žádné protokormy.

Jacquemyn a kol. (2007) při *in situ* (přímo na lokalitách) výsevech druhu *Orchis purpurea* obdobným způsobem (pomocí diarámečků) a také u dvou lokalit nezaznamenal žádný výskyt protokormů. Důvody, proč semena neklíčila, si autoři vysvětlují například nevhodnými abiotickými podmínkami nebo absencí vhodných hub.

Velmi pravděpodobně v našem případě semena také neklíčila z důvodů nevhodných podmínek a nedostatku houbových symbiontů. Navíc na rozdíl od tohoto autora jsme experiment prováděli v *ex situ* podmínkách a semena jsme v půdě ponechali o půl roku méně. Půdu pro tento experiment jsme nakopali na zdrojových lokalitách, která byla dezintegrována (nebyly odebírány půdní nenarušené monolity) a semena byla následně pěstována v jiných podmínkách (viz. výše).

Dalším možným vysvětlením neklíčivosti semen může být inbrední deprese (Reed a Frankham, 2003),

7.2 *In vivo* výsevy semen

Vyhodnocování dat bylo rozděleno do tří pokusů. První pokus zaměřující se na klíčivost a životaschopnost semen v závislosti na druhu stratifikace (konkrétně povrchové sterilizace a skarifikace semen), lokalitě a kategoriích parametrů fitness rostlin probíhal v roce 2020. Druhý pokus zkoumající životaschopnost a klíčivost

semen v závislosti na lokalitě a kategorii parametrů fitness následoval v roce 2021, a třetí také v roce 2021, avšak jednalo se o přidružený pokus kladoucí si za cíl především prokázat účinnost kinetinu a aktivního uhlí přidaných do média BM1, u kterého byla rovněž semena vysazována dle jednotlivých zkoumaných lokalit.

Výsevy semen *in vitro* probíhaly nejprve stratifikací semen v podobě povrchové sterilizace a skarifikace a následným výsevem semen do připravených médií v Petriho miskách v aseptických podmínkách. Petriho misky s vysetými semeny byly uloženy v klima boxech ve tmě při teplotě $22\pm 0,2$ °C po dobu jednoho roku.

7.2.1 Životoschopnost a klíčivost semen v závislosti na způsobu stratifikace

V rámci výsevů semen metodou *in vitro* v roce 2020 byl proveden pokus zabývající se způsoby stratifikací, konkrétně závislostí na způsobu stratifikace rozdělené podle času působení povrchově sterilizačních a skarifikačních látek a použití 2% kyseliny sírové (H_2SO_4) i 2% chlornanu vápenatého ($Ca(OCl)_2$), nebo pouze 2% chlornanu vápenatého.

Výsledky statistických analýz zobrazující závislost životoschopnosti a klíčivosti semen na způsobu stratifikace semen nebyly signifikantní. U žádné ze sledovaných variant tedy nebyla zjištěna významně rozdílná schopnost životoschopnosti a klíčivosti semen.

Doba působení lihu je u mnoha autorů podobná, například Ponert a kol. (2011) u druhu *Anacamptis morio* zaznamenal mírně vyšší procento klíčivosti semen při aplikaci 2 minuty, a u druhu *Orchis purpurea* použil 2-5 minut 70% líh před použitím chlornanu vápenatého. Podobně také Vejsadová (2006) u druhů *Dactylorhiza incarnata* a *Dactylorhiza maculata* použila před povrchovou sterilizací chlornanem vápenatým nebo chlornanem sodným 70% líh po dobu tří minut. V našem výzkumu jsme proto použili také 70% líh po dobu pěti minut.

Použití 2% kyseliny sírové u druhu *Orchis purpurea* neprokázala vyšší míru klíčivosti ve srovnání pouze s použitím chlornanů, jako u jiných druhů, jak uvádí Malmgren (1996). Nejčastěji je používán chlornan vápenatý nebo chlornan sodný. Rasmussen (1995) uvádí, že semena mají vyšší klíčivost spíše při použití chlornanu vápenatého než při použití chlornanu sodného. Pozitivní účinky chlornanu vápenatého potvrdila ve své vědecké publikaci například Vejsadová (2006), která

dosáhla nevyšší klíčivosti u druhů *Dactylorhiza incarnata*, *Dactylorhiza maculata* a *Liparis loeselii* se 7,2% roztokem $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (40-50 minuty) v kombinaci se 70% ethanolem (3 minut). Naopak při použití 0,5% chlornanu sodného nebylo pro tyto druhy prstnatic vhodné, jelikož v některých případech poškodilo embrya a snížilo míru klíčivosti až o 50 %. V tomto výzkumu byl používán 2% chlornan vápenatý po dobu 5, 8 a 11 minut.

Výsledky tohoto pokusu ukazují, že pro životaschopnost a klíčivost semen není rozdíl v použití 2% chlornanu vápenatého v rozmezí 5 až 11 minut a ani v použití 2% kyseliny sírové před použitím chlornanu vápenatého nebo pouze chlornanu vápenatého. Výsledky naznačují, že u druhu *Orchis purpurea* není 2% kyselina sírová při povrchové sterilizaci a skarifikaci semen potřeba používat.

7.2.2 Životaschopnost a klíčivost semen v závislosti na lokalitě

Výsevy semen *in vitro* měly jako jeden z cílů zjistit, zda existuje závislost životaschopnosti a klíčivosti semen druhu *Orchis purpurea* na konkrétní z šesti zkoumaných lokalit. Také, zda malé vymírající populace mají nižší životaschopnost a klíčivost semen, než větší a chráněné populace.

Nejvíce životaschopných semen, což jsou semena, která nejsou poškozena, tedy mají vyvinuté embrya, měla opakovaně lokalita č. 4 (NPR Čtvrtě). Vysokou životaschopnost semen měla opakovaně také lokalita č. 1 (Milská stráň). Nejnižší životaschopnost semen měla opakovaně lokalita č. 5 (lokalita u obce Skalička).

Nejvyšší klíčivost semen měla jednoznačně a opakovaně v obou sezónách lokalita č. 5 (Skalička) s nejvyšším procentem klíčivosti 8,5 % což je velmi malé procento, například oproti výsledkům Ponerta a kol. (2011), který prováděl *in vitro* výsevy semen druhu *Orchis purpurea* z Albánie na médiu Michl-15 (složení média viz. tabulka č. 3) s ošetřením 2-5 minut 70 % lihem a 5 minut $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ s výslednou 30 % klíčivostí. Tento rozdíl může být způsoben rozdílnými světelnými podmínkami, použitím jiného druhu média nebo geografickým původem semen. Nejnižší klíčivost semen měla ve všech případech malá, vymírající a nechráněná lokalita č. 6 (Kryry). Velmi nízkou klíčivost měla také lokalita č. 1 (PR Milská stráň), což je velmi překvapivé, jelikož je to nejpočetnější lokalita v České republice.

Důvodem proč v našem výzkumu semena i přes to, že mají většinu semen životaschopných, tak klíčivost semen nikdy nepřesáhla 10 % může být také způsobeno tím, že jsme nepoužili střídavé světelné podmínky a semena byla uložena ve tmě. Jelikož například výzkumy Duliče a kol., (2019) u druhu *Spiranthes spiralis* (16 hodin světlo, 8 hodin tma) a Chena a kol. (2015) u druhu *Paphiopedilum spicerianum* (12 hodin světlo a 12 hodin tma) prokázaly pozitivní vliv střídání světelných podmínek na klíčení semen.

Poměrně překvapivý a zajímavý je vysoký podíl klíčivosti semen na lokalitě č. 5 (Skalička) oproti ostatním lokalitám. Jelikož tato lokalita je malá a nechráněná, a proto by šlo předpokládat spíše nízkou klíčivost semen. Vysoká míra klíčivosti semen může být způsobena například tím, že se jako jediná lokalita dle fytoocenolografického členění České republiky nachází v Českomoravském mezofytikum, oproti ostatním lokalitám nacházejících se v termofytyku.

V otázce, zda na větších lokalitách v porovnání s maloplošnými vymírajícími lokalitami jsou rostliny stále schopny vyprodukovat tobolky se životaschopnými semeny, přičemž bylo předpokládáno, že tyto lokality trpí vzhledem k své velikosti inbrední depresí, se tento předpoklad jednoznačně neprokázal. Výsledky ukazují, že i malé vymírající lokality, viz. lokalita č. 5 (Skalička), mohou mít vysokou klíčivost semen a že velké lokality např. lokalita č. 1 (PR Milská stráň) mohou mít klíčivost semen poměrně nízkou, avšak u druhé malé nechráněné lokality u města Kryry bylo zjištěno velmi nízké procento klíčivosti a působení inbrední deprese na životaschopnost semen je velmi pravděpodobné. A zároveň bylo zjištěno, že lokality, které měly nízké procento životaschopnosti semen, měly zároveň vysoké procento klíčivosti a naopak, což znamená, že vysoká životaschopnost semen nemusí znamenat, že semena budou mít zároveň vysokou klíčivost semen.

Rozdílné výsledky v životaschopnosti a klíčivosti semen v závislosti na lokalitě mohou být způsobeny například nepříznivými historickými událostmi, kterými se mimo jiné zabýval například výzkum Jacquemyna a kol. (2006). Výsledky tohoto výzkumu naznačují, že opakující se populační propady a obnovy mohou silně ovlivnit genetickou diverzitu a prostorově genetickou strukturu populací druhu *Orchis purpurea*.

Například dnes velká populace mohla projít významným efektem hrdla lahve v minulosti, což se v důsledku inbrední deprese (příbuzenské křížení) projevuje ztrátou genetické diverzity a snížením reprodukční životaschopnosti semen (to znamená, že vyšší podíl semen nevytvoří embryo). Tato skutečnost však nesouvisí s klíčivostí semen. I když je málo životaschopných semen, tak díky příznivým podmínkám jich může velký počet vyklíčit (tj. vytvořit protokormy). V důsledku územní ochrany a vhodného managementu lokality následně mohlo dojít k výraznému zvýšení populace druhu, byť životaschopnost semen zůstala i nadále nízká.

7.2.3 Životaschopnost a klíčivost semen v závislosti na parametrech fitness

Dalším cílem výsevů semen *in vitro* bylo zjistit, zda existuje závislost životaschopnosti a klíčivosti semen ze zkoumaných lokalit na kategorii parametrů fitness rostlin u druhu *Orchis purpurea*.

Různé výsledky analýz zkoumající životaschopnost semen v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin jsou překvapivé, obě analýzy (v roce 2020 i 2021) vyšly signifikantní, avšak jsou s protichůdným trendem.

Výsledky statistických analýz zobrazující klíčivost semen v závislosti na kategorii parametrů fitness byly signifikantní v roce 2020. V roce 2021 vyšla analýza nesignifikantní, avšak hladina pravděpodobnosti se pohybovala v těsné blízkosti hladině průkaznosti, proto byly výsledky brány v úvahu. Nejvyšší klíčivost semen měla kategorie fitness rostlin č. 2 v případě signifikantní analýzy a nejnižší klíčivost měla v obou případech kategorie fitness rostlin č. 3.

Výsledky prokazují závislost kategorie parametrů fitness na životaschopnosti a klíčivosti semen. Kategorie parametrů fitness č. 2 (střední rostliny) měla v případě životaschopnosti semen průměrný podíl, a u klíčivosti semen procentuální podíl v obou případech nejvyšší, což naznačuje, že rostliny s průměrnými parametry fitness mají nejkvalitnější semena.

Překvapivý výsledek, že rostliny s nejvyšší fitness neměly opakovaně nejvyšší životaschopnost semen a opakovaně měly nejnižší klíčivost semen může souviset se zjištěním z předcházející bakalářské práce (Kozlovská, 2019). Zde bylo zjištěno, že nejvíce dozrálých tobolek se vyskytuje u druhu *Orchis purpurea* v xerothermních a

roztroušeně křovinatých prosvětlených biotopech. Jedinci rostoucí v těchto biotopech jsou velikostně menší a mají obecně nižší až průměrné parametry fitness. Hlavními parametry fitness, podle kterých byla semena zařazována do jednotlivých kategorií, byla výška prýtu, počet květů a listů. Takovéto parametry nemusejí být rozhodující pro míru životaschopnosti a klíčivosti semen. Domníváme se, že drobnější rostliny z xerothermních stanovišť rostoucích v ekologickém optimu své realizované niky, mohou být zvýhodněny jinak, například díky charakteru biotopů mohou dosahovat lepšího opylení.

Zároveň je pravděpodobné, že rostliny na stinnějších a mezofilnějších stanovištích mají sice nejvyšší parametry fitness a zároveň z důvodu horšího opylení málo a hůře opylených tobolek. Vypadaná semena v přirozených podmínkách však mají větší pravděpodobnost vyklíčit, protože v zástinu je vlhčí půda a ta vyhovuje houbám, které svou mykorhizní symbiózou pomáhají semenům vyklíčit. Tento předpoklad popisuje také Batty a kol., (2001), který uvádí, že teplota a vlhkost substrátu jsou sezónní podněty, které mohou uvolnit dormanci semen anebo zvýšit klíčivost semen, stejně tak Diez (2007) ve svém výzkumu zjistil zvýšenou klíčivost na místech s vyšší vlhkostí půdy a organickým obsahem konkrétně u druhu *Goodyera pubescens*. Také Rasmussen, a kol. (2015) uvádí, že je velmi pravděpodobné, že účinky teploty a vlhkosti substrátu prospívají přežití a růstu mycelia hub.

7.2.4 Životaschopnost a klíčivost semen v závislosti na druhu média

Přidruženým pokusem v rámci *in vitro* výsevů semen druhu *Orchis purpurea* byl pokus zjišťující životaschopnost a klíčivost semen v závislosti na přidání kinetinu a aktivního uhlí do média BM1. Semena orchidejí byla vyseta na čtyři druhy médií, a to konkrétně médium č. 1 (BM1+AC), č. 2 (BM1), č. 3 (BM1+KIN), č. 4 (BM1+AC+KIN).

Výsledky ukazují, že médium č. 4 (BM1+KIN+AC), které bylo používáno v hlavních pokusech výsevů *in vitro* mělo vysoké procento životaschopnosti i klíčivosti semen. Výsledky tedy naznačují, že přidání kinetinu spolu s aktivním uhlím podporuje životaschopnost semen a s velkou pravděpodobností i klíčivost semen. Médium č. 3 (BM1+KIN) mělo také vysoké procento klíčivosti.

Příznivé působení cytokininů pro zvýšení procenta klíčivosti semen se shoduje s popisem Vejsadové (2006), která uvádí, že cytokininy (např. benzyladenin nebo kinetin) se nejčastěji přidávají do živných médií, ke zvýšení procenta klíčení nebo ke stimulaci, podpoře vývoje výhonků a dělení buněk. Pauw a kol. (1995) u druhu *Cypripedium candidum* také uvádí, že se protokormy vyvíjely rychleji a produkce protokormů se zvýšila při přidání cytokininu v porovnání s kontrolou. Dále pak u výzkumu Stewart a Kane (2006) byla u druhu *Habenaria macroceratitis* při použití konkrétně kinetinu zjištěna zlepšená klíčivost semen o 47,2 %.

Aktivní uhlí (AC) bylo v našem případě přidáno do médií 0,5 g/l. Je možné, že přidáním většího množství by se účinky aktivního uhlí zvýšily, jelikož například Ponert a kol. (2011) použil u výsevů druhu *Orchis purpurea* 1,2 g/l. Také Kim a kol. (2019) při výsevech druhu *Pecteilis radiata* dosáhl nejvyššího procenta (91,7) klíčivosti při použití 2 g/l AC.

8 Závěr

Výzkum výsevů *in vitro* prokázal, že životaschopnost a klíčivost semen druhu *Orchis purpurea* závisí na konkrétní lokalitě, kategorii parametrů fitness rostlin a na přidání kinetinu a aktivního uhlí do média BM1.

Bylo zjištěno, že při stratifikaci semen není potřeba používat 2% kyselinu sírovou před použitím 2% chlornanu vápenatého.

Výsledky dále ukazují, že i malé vymírající lokality mohou mít vysokou klíčivost semen a že velké lokality mohou mít klíčivost semen poměrně nízkou. A zároveň bylo zjištěno, že vysoká životaschopnost semen nemusí znamenat, že semena budou mít také vysokou klíčivost. Rozdíly v životaschopnosti semen v závislosti na lokalitě mohou být způsobeny nepříznivými historickými událostmi, například opakujícími se populačními pády a obnovami, které mohou silně ovlivnit genetickou diverzitu a prostorově genetickou strukturu populací, nebo vlivem inbrední deprese (příbuzenské křížení), která se projevuje ztrátou genetické diverzity a snižuje reprodukční způsobilost.

Dalším zjištěním bylo, že rostliny s průměrnými parametry fitness mají nejkvalitnější semena. Domníváme se, že drobnější rostliny z xerothermních stanovišť rostoucích

v ekologickém optimu své realizované niky, mohou být zvýhodněny, například díky charakteru biotopů mohou dosahovat lepšího opylení. Zároveň je pravděpodobné, že rostliny na stinnějších a mezofilnějších stanovištích mají sice nejvyšší parametry fitness a zároveň z důvodu horšího opylení málo a hůře opylených tobolek.

Pokus, který byl zaměřen na účinnost kinetinu a aktivního uhlí přidaného do média BM1, prokázal, že přidání kinetinu spolu s aktivním uhlím příznivě podporuje životaschopnost semen a s velkou pravděpodobností i klíčivost semen.

Závěrem bych ráda podotkla, že malé, vymírající a nechráněné populace u obce Skalička a města Kryry by si rozhodně zasloužily stát se předmětem ochrany. Zajištění ochrany je žádoucí především pro lokalitu u obce Skalička, které v brzké době hrozí zánik postupující výstavbou v okolí, a která zároveň měla opakovaně nejvyšší klíčivost semen oproti ostatním lokalitám.

Zjištěné poznatky lze uplatnit při cílenější ochraně tohoto druhu, a to jak v praktické územní ochraně, tak i v případných záchranných programech *in vitro*. A zároveň by se na tuto práci dalo navázat, rozšířit a prohloubit ve víceletém výzkumu populací druhu *Orchis purpurea*, ale i dalších druhů ohrožených terestrických orchidejí.

9 Citovaná literatura

- 1) ANONYMUS1. *Plán péče o CHKO Český kras na období 2020–2029*. 2017. Dostupné také z: <https://ceskykras.ochranaprirody.cz/res/archive/224/070895.pdf?seek=1581680385>
- 2) ANONYMUS2. *Plán péče o Národní přírodní rezervaci Karlštejn na období 2017-2025*. 2017. Dostupné také z: <https://ceskykras.ochranaprirody.cz/res/archive/365/055012.pdf?seek=1502801739>
- 3) ARDITTI, Joseph a Adbul Karim Abdul GHANI. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist* 2000. Cambridge University Press, 2000, **145**(3), 367-421. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- 4) BARSBERG, Søren, Hanne N. RASMUSSEN a Nate KODAHN. Composition of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) seeds analyzed by attenuated total reflectance IR spectroscopy: In search of understanding longevity in the ground. *American Journal of Botany*. 2013, **100**(10), 2066-2073. Dostupné z: doi:10.3732/ajb.1200646
- 5) BASKIN, Carol C. a Jerry M. BASKIN. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Kentucky: Academia press, 2001. ISBN 0-12-080263-5.
- 6) BAUMANN, Helmut, Siegfried KUNKELE a Richard LORENZ. *Orchideje Evropy a přilehlých oblastí*. Praha: Academia, 2009. ISBN 978-80-200-1692-8.
- 7) BEKTAŞ, Ersan a Atalay SÖKMEN. In vitro seed germination, plantlet growth, tuberization, and synthetic seed production of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. *Turkish Journal of Botany*. 2016, **40**, 584-594. Dostupné z: doi:10.3906/bot-1512-13
- 8) BURGEFF, Hans. *Samenkeimung und Kultur europäischer Erdorchideen : nebst Versuchen zu ihrer Verbreitung*. Stuttgart: G. Fischer, 1954.
- 9) ÇIĞ, Arzu a Hüdai YLMAZ. In vitro Symbiotic Culture Studies of Some Orchid Species. *In vitro Symbiotic Culture Studies of Some Orchid Species*. 2017, **23**(4), 453-463. Dostupné z: doi:10.1007/s11557-017-1512-13
- 10) ČAČKO, Ľubor. Jedinečné způsoby opylování květů orchidejí: Naše příroda, ročník 2013, číslo 3. *Naše příroda* [online]. 2013 [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: <http://www.nasepriroda.cz/artkey/npr-201303-0001.php>

- 11) DIENGDOH, Reema Vareen, Suman KUMARIA, Pramod TANDON a Meera Chettri DAS. Asymbiotic germination and seed storage of *Paphiopedilum insigne*, an endangered lady's slipper orchid. *South African Journal of Botany*. 2017, **112**, 215-224. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.028>
- 12) DIEZ, Jeffrey M. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology*. 2007, **95**(1), 195-170. Dostupné z: doi:[10.1111/j.1365-2745.2006.01194.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01194.x)
- 13) DULIĆ, Jovana, Mirjana LJUBOJEVIĆ, Vladislav OGNJANOV, Goran BARAĆ a Tamara DULIĆ. 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*. 2019, **55**(4), 380-391. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s11627-019-09997-z>
- 14) DYKYJOVÁ, Dagmar. *Ekologie střeoevropských orchidejí*. České Budějovice: KOPP, 2003. ISBN 80-7232-202-8.
- 15) EYMAR, Enrique, Jesus ALEGRE, Mariano TORIBIO a Dolores López VELA. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on in vitro nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000, **63**(1), 57-65. Dostupné z: doi:[10.1023/A:1006471519609](https://doi.org/10.1023/A:1006471519609)
- 16) FIGURA, Tomáš, Martin WEISER a Jan PONERT. Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content. *Plant Biology*. 2019, **22**(1), 21-29. Dostupné z: doi:[10.1111/plb.13044](https://doi.org/10.1111/plb.13044)
- 17) GAY, Alfred. Further Notes on *Orchis purpurea* Herbivory and Conservation. *Journal of the hardy orchid society*. 2013, **10**(1), 12-16.
- 18) GODO, Toshinari, Miho KOMORI a Emi NAKAOKI. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro, Tomohisa Yukawa, Kazumitsu Miyoshi. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 2010, **46**(3), 323-328. Dostupné z: doi:[10.1007/s11627-009-9271-1](https://doi.org/10.1007/s11627-009-9271-1)
- 19) GRULICH, Vít. Červený seznam cévnatých rostlin ČR. *Příroda*. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 2017, (35), 76-132. ISSN 1211-3603.
- 20) GUPTA, Ashish. Asymbiotic Seed Germination in Orchids: Role of Organic Additives. *International Advanced Research Journal in Science*. 2016, **3**(5), 143-147. Dostupné z: doi:[10.17148/IARJSET.2016.3530](https://doi.org/10.17148/IARJSET.2016.3530)
- 21) HOUDA, Josef. *Džbán: Ochránářská studie*. Louny: Okresní národní výbor a pedagog. středisko (Louny), 1969.

- 22) HUH, Yoon Sun, Joung Kwan LEE, Joung Kwan NAM, Kee Yoeup PAEK a Gang Uk SUH. Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. *Journal of Plant Biotechnology*. 2016, **41**(1), 138-145. Dostupné z: doi:10.5010/JPB.2016.43.1.138
- 23) CHEN, Ying, Uromi Manage GOODALE, Xu-Li FAN a Jiang-Yun GAO. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*. 2015, (3), 367-378. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002
- 24) CHYTRÝ, Milan, Tomáš KUČERA a Martin KOČÍ, ed. *Katalog biotopů České republiky: Interpretační příručka k evropským programům Natura 2000 a Smaragd*. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 2001. ISBN 978-80-87457-03-0.
- 25) JACQUEMYN, Hans, Katrien VANDEPITTE, Rein BRYS, Olivier HONNAY a Isabel ROLDÁN-RUIZ. Fitness variation and genetic diversity in small, remnant populations of the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Biological conservation*. 2007, **139**(1-2), 203-210. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocon.2007.06.015
- 26) JACQUEMYN, Hans, Rein BRYS a Olivier HONNAY. Large population sizes mitigate negative effects of variable weather conditions on fruit set in two spring woodland orchids. *Biology Letters*. 2009, **5**(4), 495-498. Dostupné z: doi:10.1098/rsbl.2009.0262
- 27) JACQUEMYN, Hans, Rein BRYS, Katrien VANDEPITTE a Oliver HONNAY. Ublishing Ltd Fine-scale genetic structure of life history stages in the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. *Molecular Ecology*. 2006, **15**, 2801-2808. Dostupné z: doi:doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02978.x
- 28) JATIOVÁ, Matilda a Jindřich ŠMITÁK. *Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a ve Slezsku*. Třebíč: Arca JiMf, 1996. ISBN 80-85766-35-3.
- 29) JERSÁKOVÁ, Jana a Pavel KINDLMANN. *Zásady péče o orchidejová stanoviště*. České Budějovice: KOPP, 2004. ISBN 80-7232-254-0.
- 30) JEŽEK, Zdeněk. *Encyklopedie orchidejí*. Čestlice: Rebo, 2003. ISBN 80-7234-305-X.
- 31) JEŽEK, Zdeněk. *Na lovu mexických orchidejí*. Brno: Moravské vydavatelství Květen, 1996. ISBN 80-901383-4-9.
- 32) JEŽEK, Zdeněk. *Orchideje praktická encyklopedie*. 6. vyd. Praha: Rebo Productions CZ, 2012. ISBN 978-80-255-0627-1.

- 33) KARLÍK, Petr. *Plán péče o přírodní památku Chotuc*. 2018. Dostupné také z: <https://portal.gov.cz/zverejnene-informace/85882>
- 34) KIM, D. H., K. W. KANG, G. ENKHTAIVAN, U. JAN a I. SIVANESAN. Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron on non-symbiotic in vitro seed germination of *Pecteilis radiata* (Thunb.) Raf. *South African Journal of Botany*. 2019, **124**, 144-150. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.04.015>
- 35) KNUDSON, Lewis. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*. 1946, **15**, 214-217.
- 36) KNUDSON, Lewis. Nonsymbiotic Germination of Orchid Seeds. *Botanical Gazette*. 1922, **73**(1), 1-25. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.2307/2394015>
- 37) KOZLOVSKÁ, Dominika. *Charakteristika výskytu vstavače nachového v pohoří Džbán*. Praha, 2019. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita. Vedoucí práce Petr Karlík.
- 38) KUBÍKOVÁ, Jarmila, Josef SPILKA a Pavel ŠPRYŇAR. *Perly středočeské přírody: Novinky v síti chráněných území ve Středočeském kraji*. Nymburk: Vega-L, 2016. ISBN 978-80-88072-15-7.
- 39) LAUZER, Denis, Sébastien RENAUT, Marc ST-ARNAUD a Denis BARABÉ. In vitro asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *Journal of the Torrey Botanical Society*. 2007, **134**(3), 344-348. Dostupné z: doi:10.3159/1095-5674(2007)134[344:IVAGPD]2.0.CO;2
- 40) LOŽEK, Vojen, Jarmila KUBÍNOVÁ a Pavel ŠPRYŇAR. *Střední Čechy, Chráněná území ČR, XIII*. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 2005. ISBN 80-86064-87-5.
- 41) MACKOVČIN, Peter, ed. *Chráněná území ČR. Sv. 1, Ústecko*. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 1999. ISBN 80-86064-37-9.
- 42) MALMGREN, Svante. Orchid Propagation: Theory and Practice. In: *North American Native Terrestrial Orchids: Propagation and Production*. Germantown: The North American Native Terrestrial Orchid Conference, 1996, s. 63-71. ISBN 0-9655075-0-5.
- 43) MCCORMICK, Melissa K., Kenneth L. PARKER,, Katalin SZLAVECZ a Dennis F. WHIGHAM. Native and exotic earthworms affect orchid seed loss. *AoB PLANTS*. 2013, (5), 1-11.
- 44) NANEKAR, Vikas, Varsha SHRIRAM, Vinay KUMAR a P. B. Kavi KISHOR. Asymbiotic In vitro Seed Germination and Seedling Development of *Eulophia nuda* Lindl., An Endangered Medicinal Orchid. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences volume.* 2014, **84**(3), 837-846. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1007/s40011-014-0353-4>
- 45) NASH, Ned a Isobyl LA CROIC, ed. *Orchideje více než 1500 druhů orchidejí.* Brno: CPress, 2007. ISBN 978-80-251-1459-9.
- 46) PAUW, M. A. de, W. R. RAMPHREY a C. E. PALMER. The Cytokinin Preference for in vitro Germination and Protocorm Growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany.* 1995, **75**(3), 267-275.
- 47) PONERT, Jan, Stanislav VOSOLSOBĚ, Kateřina KMECOVÁ a Helena LIPAJSKÁ. European orchid cultivation – from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences.* 2011, **1**(2), 95-107. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.14712/23361964.2015.52>
- 48) PONERT, Jan, Tomáš FIGURA, Stanislav VOSOLOSOBĚ, Helena LIPAJSKÁ, Martin VOHNÍK a Jana JERSÁKOVÁ. Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany-Botanique.* 2013, **91**(10), 662-670. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0082>
- 49) PROCHÁZKA, František a Václav VELÍSEK. *Orchideje naší přírody.* Praha: Academia, 1983. ISBN 21-018-83.
- 50) PROCHÁZKA, František. *Naše orchideje.* Pardubice: Muzeum východních Čech, 1980.
- 51) PRŮŠA, David. *Orchideje České Republiky.* Brno: Computer Press, 2005. ISBN 80-251-0726-4.
- 52) RASMUSSEN, Hanne N a Dennis F. WHIGHAM. Seed ecology of dust seeds in situ: A new study technique and its application in terrestrial orchids. *Ecology and Phytogeography.* 1993, **80**(12), 1374-1378. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1993.tb15381.x>
- 53) RASMUSSEN, Hanne N. *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant.* New York: Cambridge University Press, 1995. ISBN 978-0521451659.
- 54) RASMUSSEN, Hanne N., Kingsley W. DIXON, Jana JERSÁKOVÁ a Tamara TĚŠITELOVÁ. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany.* 2015, **116**(3), 391-402. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- 55) REED, David H. a Richard FRANKHAM. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology.* 2003, **17**(1), 230-237.

- 56) SGARBI, Elisabetta, Maddalena GRIMAUDDO a Carlo Del PRETE. In vitro asymbiotic germination and seedling development of *Limodorum abortivum* (Orchidaceae). *Plant Biosyst.* 2009, **143**(1), 114-119.
- 57) SKALICKÝ, Vladimír (1988) Regionálně fytogeografické členění [Regional phytogeographic division]. – In: Hejný S., Slavík B., Chrtek J., Tomšovic P. a Kovanda M. (eds), *Květena České socialistické republiky*: Academia, Praha.
- 58) STERN, William Louis. *Anatomy of the Monocotyledons Volume X: Orchidaceae*. New York: Oxford University Press, 2014. ISBN 978-0199689071.
- 59) STEWART, Scott L. a Michael E. KANE. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2006, **86**, 147-158. Dostupné z: doi:10.1007/s11240-006-9098-y
- 60) ŠTEFÁNEK, Michal. *Plán péče o přírodní rezervaci Milská stráž 2016-2025*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 2016. Dostupné také z: https://drusop.nature.cz/ost/chrobjekty/zchru/index.php?SHOW_ONE=1&ID=1086
- 61) ŠTĚPÁNKOVÁ, Jitka, ed. *Květena České republiky 8*. Praha: Academia, 2010. ISBN 978-80-200-1824-3.
- 62) ŠTÍPKOVÁ, Zuzana a Pavel KINDLMANN. Orchid Extinction over the Last 150 Years in the Czech Republic. *The Ecology and Diversity of Orchids*. 2021, **13**(2), 1-15. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.3390/d13020078
- 63) TLUSTÁK, Vlastimil a Ivana JONGEPIEROVÁ-HLOBILOVÁ. *Orchideje Bílých Karpat*. Olomouc: Krajské vlastivědné muzeum, 1990. ISBN 80-85037-02-5.
- 64) TRAXMANDLOVÁ, Iva, Pavel KINDLMANN a Zuzana ŠTÍPKOVÁ. Effect of global change on orchid diversity: A meta-analysis. In: *Global Change & Ecosystems, Volume 1: Predictions on Terrestrial Ecosystems*. Brno: Global Change Research Centre, Czech Academy of Sciences. 2015, s. 175-184. ISBN 978-80-87902-14-1.
- 65) Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin: *Přílohy I, II a III*. In: 1992, ročník 2019, číslo 572. Dostupné také z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/cites_cesky_text_umluvy/\\$FILE/ODOIMZ-CITES_prilohy_revize_po_CoP18-20191126.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/cites_cesky_text_umluvy/$FILE/ODOIMZ-CITES_prilohy_revize_po_CoP18-20191126.pdf)
- 66) VEJSADOVÁ, Hana. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. *Acta biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2006, **48**(1), 109-113. ISSN 0001-5296.

- 67) Vyhláška ministerstva životního prostředí České republiky, kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny. In: 1992, číslo 395. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-395>
- 68) WAES, J. M. Van a P. C. DEBERGH. In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*. 1986, **67**(2), 253-261. Dostupné z: doi:DOI:10.1111/J.1399-3054.1986.TB02452.X
- 69) WALSH, Ryan P. a Helen J. MICHAELS. When it pays to cheat: Examining how generalized food deception increases male and female fitness in a terrestrial orchid. *PLoS ONE*. 2017, **12**(1), 1-15. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171286
- 70) YODER, Jay A., Lawrence W. ZETTLER a Scott L. STEWART. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*. 2000, **156**(2), 145-150. Dostupné z: doi:10.1016/s0168-9452(00)00246-6
- 71) YONG, Jean W. H., Liya GE, Yan Fei NG a Swee Ngian TAN. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules*. 2009, **14**(12), 5144-5164. Dostupné z: doi:10.3390/molecules14125144
- 72) ZELMER, Carla D., Lisa CUTHBERTSON a Randy S. CURRAH. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*. 1996, **37**(4), 439-448. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1007/BF02461001
- 73) ZNANIECKA, Joanna a Ewa LOJKOWSKA. Establishment of in vitro culture collection of endangered European orchids. *Bulletin of Botanical Gardens*. 2004, **13**, 69-73.

10 Seznam internetových zdrojů

- 1) www.botany.cz: HRDLIČKA, Daniel. Džbán, Milská stráň – přírodní památka [online]. [cit. 2022-02-17]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/milka-stran/>
- 2) www.drusop.nature.cz: Maloplošná zvláště chráněná území: Milská stráň [online]. [cit. 2022-02-16]. Dostupné z: https://drusop.nature.cz/ost/chrobjekty/zchru/index.php?SHOW_ONE=1&ID=1086
- 3) www.kokorinsko.ochranaprirody.cz: Národní přírodní rezervace Čtvrtě. [online]. [cit. 2022-02-18]. Dostupné z: <https://kokorinsko.ochranaprirody.cz/mzchu/npr-ctvrte/>

- 4) www.launensia.cz [online]. 2010 [cit. 2022-02-17]. Dostupné z: <http://www.launensia.cz/>
- 5) [www.mapy.geology.cz](https://mapy.geology.cz): *Geovědní mapy 1 : 50 000* [online]. [cit. 2022-02-17]. Dostupné z: <https://mapy.geology.cz/geocr50/>
- 6) www.phygenera.de: BM1 | Terrestrial Orchid Medium, složení. [cit. 2022-04-04]. Dostupné z [BM1 | Terrestrial Orchid Medium \(phygenera.de\)](http://www.phygenera.de)
- 7) www.lidaforsgarden.com: MALMGREN, Svante a Henric NYSTRÖM. *Orchid propagation* [online]. [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: <http://www.lidaforsgarden.com/orchids/engelsk.htm>

11 Seznam příloh

Příloha č. 1: Primární data, výsevy in vitro, 2020

Příloha č. 2: Primární data, výsevy in vitro 2021

Příloha č. 3: Primární data, výsevy in vitro 2021, pokus média

Příloha č. 4: Primární data, výsevy semen ex situ, 2020

Příloha č. 5: Životoschopnost semen v závislosti na lokalitě, in vitro výsevy, pokusy z let 2020 a 2021, průměry a vyhodnocení LSD testu

Příloha č. 6: Klíčivost semen v závislosti na lokalitě, in vitro výsevy, pokusy z let 2020 a 2021, průměry a vyhodnocení LSD testu

Příloha č. 7: Životoschopnost semen v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin, in vitro výsevy, pokusy z let 2020 a 2021, průměry a vyhodnocení LSD testu

Příloha č. 8: Klíčivost semen v závislosti na kategorii parametrů fitness rostlin, in vitro výsevy, pokusy z let 2020 a 2021, průměry a vyhodnocení LSD testu

Příloha č. 9: Životoschopnost a klíčivost semen v závislosti na druhu média, in vitro výsevy, pokusy z let 2020 a 2021, průměry a vyhodnocení LSD testu

12 Přílohy

Přílohy jsou nahrány a uloženy v elektronické formě v univerzitním informačním systému.