

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE  
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ



**ASYMBIOTICKÉ KLÍČENÍ ZRALÝCH SEMEN  
VSTAVAČE KUKAČKY (*ANACAMPTIS MORIO*  
L.) V *IN VITRO* PODMÍNKÁCH**

*IN VITRO* ASYMBIOTIC SEED GERMINATION OF  
*ANACAMPTIS MORIO* L.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Bakalant: Anita Blažková

2022

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Anita Blažková

Environmentální vědy

Aplikovaná ekologie

Název práce

**Asymbiotické klíčení zralých semen vstavače kukačky (*Anacamptis morio* L.) v in vitro podmínkách**

Název anglicky

**In vitro asymbiotic seed germination of *Anacamptis morio* L.**

---

### Cíle práce

- 1) Vypracovat literární rešerši s ohledem na možnost klíčení orchidejí v ex situ podmínkách, zejména v in vitro kultuře
- 2) Výsev zralých semen *Anacamptis morio* L. na živná média
- 3) Sledovat vliv složení živných médií na indukci klíčení semen *Anacamptis morio* L.

### Metodika

- 1) Vytvoření literární rešerše o výskytu vstavače kukačky (*Anacamptis morio* L.) v ČR a možnostech jeho růstu v in situ a ex situ podmínkách, za účelem ověření životnosti a klíčivosti semen.
- 2) Vytvořit metodiku pro založení kultury in vitro *Anacamptis morio* L. na základě studia odborné literatury
- 3) Založit experimenty se zralými semeny *Anacamptis morio* L.
- 3) Průběžně sledovat vliv použitých živných médií na vysetá semena *Anacamptis morio* L.
- 4) Zpracovat a vyhodnotit získané informace z asymbiotického klíčení *Anacamptis morio* L. v in vitro kultuře
- 5) Vypracování a odevzdání bakalářské práce

---

**Doporučený rozsah práce**

40-50 stran

**Klíčová slova**

Orchideje, germinace, živná média, ex situ, Orchis

---

**Doporučené zdroje informací**

- Baskin C.C., Baskin J.M. (2014). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*, 2nd edn. Elsevier/Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 1586.
- Bozdemir H., Cig A., Turkoglu N. (2018). Effects of different concentrations of carbohydrate form on *Orchis sancta* L. propagation in vitro. *Appl Ecol Environ Res*, 16: 4849–4864.
- Dowling N., Jusaitis M. (2012). Asymbiotic in vitro germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany*, 60: 592– 601.
- Dulić, J., Ljubojević, M., Ognjanov, V. et al. (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.
- Godó T., Komori M., Nakaoki Y.T., Miyoshi K. (2010). Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 46: 323–328.
- Merritt D.J., Hay F.R., Swarts N.D., Sommerville K.D., Dixon K.W. (2014). Ex situ conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, 175: 46– 58.
- Ponert J., Figura T., Vosolsobě S., Lipavská H., Vohník M., Jersáková J. (2013). Asymbiotic germination of mature seeds and protocorm development of *Pseudorchis albida* (Orchidaceae) are inhibited by nitrates even at extremely low concentrations. *Botany-Botanique*, 91: 662– 670.
- Seaton P.T., Hu H., Perner H., Pritchard H.W. (2010). Ex situ conservation of orchids in a warming world. *Botanical Review*, 76: 193– 203.
- Vejsadova H. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchid cultured in vitro. *Acta Biol Crac*, 48: 109–113.
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2021/22 LS – FZP

**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 22. 2. 2021

**prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.**

Děkan

V Praze dne 30. 03. 2022

---

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Asymbiotické klíčení zralých semen vstavače kukačky (*Anacamptis morio* L.) v *in vitro* podmínkách vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědoma, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne: 31.3. 2022

Podpis:

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu Ing. Janu Vítámvásovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, trpělivost a vstřícnost při konzultacích. Mé poděkování patří i mým rodičům za podporu během celého studia.

## Abstrakt

Úbytek biologické rozmanitosti je celosvětový problém, který se týká i biotopů České republiky. Ve střední Evropě patřil vstavač kukačka (*Anacamptis morio*) k nejhojnějším druhům z čeledi vstavačovitých (*Orchidaceae*), nyní je na ústupu. Metoda *in vitro* je jedním z prostředků, jak ohrožené druhy zkoumat, množit a vrátit do přirozeného prostředí. Práce má vypracovanou literární rešerši se zaměřením na popis druhu vstavače kukačky a vyhodnocení možných způsobů asymbiotického množení, které je možné použít při výsevech *in vitro*. Byla použita 3 kultivační média pro výsevy semen odebraných z 10 jedinců vstavače kukačky z lokality NPP U Finů – základní BM-1 (van Waes a Debergh 1986), médium BM-1 s  $1\text{mg.l}^{-1}$  cytokininem kinetinem a médium BM-1 s  $0,5\text{ g.l}^{-1}$  aktivního uhlí. Při vyhodnocení se zohledňovala i morfologie, rostliny byly rozděleny do 3 skupin podle velikosti. Nejvíce semen v protokorm vyklíčilo na médiu BM-1 s aktivním uhlím 50 %. Dle fitness nejlépe klíčila semena odebraná z nejnižších rostlin (do 11, 5 cm), klíčivost byla 50 %. Korelace mezi počtem protokormů a výškou rostliny je záporná ( $r_{xy} < 0$ ). Vliv kinetinu v médiu se neprokázal, semena klíčila na médiu s kinetinem podobně (34 %), jako bez přidaných látek (35 %). Zjištěné poznatky mohou být uplatněny a zkoumány při experimentálních výsevech orchidejí.

**Klíčová slova:** Ex situ, germinace, Orchis, orchideje, živná média.

## Abstract

The loss of biodiversity is a global problem that also affects the Czech Republic's habitats. In Central Europe, the *Anacamptis morio* used to be one of the most abundant species of the orchid family (*Orchidaceae*), but now is in retreat. The *in vitro* method is one of the means how to study, evaluate and return endangered species into their natural habitat. This thesis consists of a literature research focusing on the description of *Anacamptis morio* and the evaluation of possible methods of asymbiotic proliferation that can be used in *in vitro* sowing. Three cultivation media were used for sowing seeds collected from 10 individuals of *Anacamptis morio* from the NPP site at Finn - BM-1 basal medium (van Waes and Debergh 1986), BM-1 medium with  $1\text{mg.l}^{-1}$  cytokinin kinetin and BM-1 medium with  $0.5\text{ g.l}^{-1}$  active charcoal.

Morphology is also considered in the evaluation, plants are divided into 3 groups according to its size. Most of the seeds in protocorm germinated on BM-1 medium with active charcoal 50 %. According to fitness, seeds collected from the lowest plants (up to 11.5 cm) germinated the most with a germination rate of 50 %. The correlation between the number of protocorms and a plants height was negative ( $r_{xy} < 0$ ). There was not approved the impact of kinetin in the medium. Seeds germinated on medium with kinetin (34 %) germinated very similarly as the seeds without added substances (35 %). These findings could be applied and examined in the experimental orchid sowings.

**Keywords:** Ex situ, germination, nutrient media, orchids, Orchis.

# Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>3</b>
<b>2 VSTAVAČOVITÉ (ORCHIDACEAE)</b> .....	<b>4</b>
<b>3 VSTAVAČ KUKAČKA (ANACAMPTIS MORIO (L.))</b> .....	<b>7</b>
3.1 TAXONOMIE .....	7
3.2 MORFOLOGIE .....	7
3.3 FENOLOGIE .....	8
3.4 BIOTOPY .....	9
3.4.1 Konkrétní biotopy .....	10
3.5 VÝSKYT V ČESKÉ REPUBLICE.....	14
3.5.1 Výskyt v krajích ČR.....	15
3.6 VÝSKYT VE SVĚTE.....	20
<b>4 MANAGEMENT OCHRANY IN SITU A EX SITU</b> .....	<b>21</b>
4.1 OCHRANA IN SITU .....	22
4.1.1 Managementy stanovišť výskytu vstavače kukačky .....	24
4.1.2 Zákony a úmluvy .....	25
4.2 OCHRANA EX SITU.....	26
<b>5 IN VITRO</b> .....	<b>29</b>
5.1 VYUŽITÍ V OCHRANĚ ROSTLIN.....	29
5.2 POSTUP A POTŘEBNÉ VYBAVENÍ.....	31
5.3 STAVBA SEMEN A KLÍČENÍ .....	32
5.4 STERILIZACE A STRATIFIKACE.....	34
5.5 SLOŽENÍ ŽIVNÝCH MÉDIÍ .....	36
5.5.1 Anorganické látky .....	37
5.5.2 Abiotické faktory .....	41
5.6 PŘÍPRAVA MÉDIA .....	42
<b>6 METODIKA</b> .....	<b>44</b>
6.1 SBĚR A SKLADOVÁNÍ SEMEN .....	44
6.2 ROZDÍLNÉ FITNESS .....	44
6.3 STERILIZACE A STRATIFIKACE SEMEN .....	45
6.4 PŘÍPRAVA MÉDIÍ.....	46
6.5 VÝSEVY SEMEN.....	47
6.6 KULTIVACE – PODMÍNKY A POZOROVÁNÍ.....	48
6.7 STATISTIKA .....	48
<b>7 VÝSLEDKY</b> .....	<b>50</b>
7.1 VLIV SLOŽENÍ MÉDIÍ NA KLÍČENÍ.....	50



7.2 Vliv fitness na klíčení .....	58
<b>8 DISKUSE.....</b>	<b>62</b>
<b>9 ZÁVĚR.....</b>	<b>67</b>
<b>PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>68</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>78</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>79</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ.....</b>	<b>80</b>
<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>81</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>98</b>

## Úvod

Vstavač kukačka (*Anacamptis morio*) patřil k nejhojnějším orchidejím v Čechách i na Moravě. V důsledku změn hospodaření a dalších environmentálních faktorů se mění i ekosystémy výskytu našich orchidejí (Jersáková et Průša 2021; Seaton et al. 2010). Pro vstavač kukačka je zaznamenán úbytek přirozených stanovišť až o 60 % (Sagittaria 2010c). V současnosti se nejpočetněji vyskytuje v Bílých Karpatech, v oblasti Podýjí a Jihočeském kraji (Kostiuková 2022).

Pomocí ochrany *in situ* můžeme podpořit populace na chráněných územích. Důležité je pravidelné kosení a odstranění náletových dřevin (Průša 2019). Ne vždy je aktivní péče o území dostačující, obzvláště v současné době. Rostliny z čeledi vstavačovité (*Orchideaceae*) nejsou zdaleka jedinými ohroženými druhy. Úbytek biologické rozmanitosti je celosvětový problém dnešní doby (Merrit 2014a).

Ke zdokonalování ochrany rostlin je potřeba důsledný monitoring a ochrana mimo přirozené prostředí tzv. *ex situ* (Jersáková et Kindlmann 2004; Vejsadová 2009).

Jedním z odvětví je klíčení semen *in vitro* neboli ve skle (VŠÚO 1). Máme příležitost zkoumat nároky, vývoj a životaschopnost rostlin v laboratorních podmínkách (Fay 2018). Pomocí metod *ex situ* lze navrátit druhy zpět na území, kde už populace vyhynuly (MŽP 2014).

K úspěšnému *in vitro* klíčení semen vstavače kukačky je potřeba sterilní prostředí a zajištění správného množství živin v živném médiu (Jevšnik et Luthar 2015). Orchideje v *in vitro* podmínkách můžeme množit i asymbioticky (bez houbového symbiota). Existuje mnoho dostupných komerčních živných médií, které obsahují potřebné látky pro úspěšné klíčení semen orchidejí (Sarasan et al. 2006). Není to ovšem jediný faktor, který ovlivňuje úspěšnost klíčení semen. Do média můžeme přidat různé rostlinné hormony vitamíny nebo ovlivnit abiotické podmínky (teplota, osvit) (Kováč 1992). Bakalářská práce obsahuje rešerši o úspěšných, či neúspěšných pokusech *in vitro* pěstování.

V metodice byly použity 3 varianty živného média pro zjištění vlivu přidaných látek na klíčivost semen. Jako základ bylo použito živné médium BM-1 (kontrola), s přidáním kinetinu a nebo aktivního uhlí. Kinetin patří do skupiny cytokininů, které podporují buněčné dělení a tvorbu adventních pupenů (Rasmussen 1995). Aktivní uhlí díky své struktuře dokáže vstřebat toxické látky, ovšem i látky potřebné ke klíčení (Kováč 1992). Při posuzování úspěšnosti při klíčení se zohledňovali i morfologické vlastnosti mateřských rostlin (fitness).

# 1 Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši o výskytu vstavače kukačky v České republice. Zjistit na jakých lokalitách se vyskytuje a nastínit důvody úbytku populací.
2. Popsat ochranné managementy *in situ* a *ex situ*. Zejména možnosti klíčení orchidejí v *in vitro* kultuře. Nastudovat rozdílné metody kultivace, různá složení živných médií a podmínky klíčivosti pro orchideje.
3. Vytvořit metodiku pro založení kultury *in vitro* na výsev semen vstavače kukačky na základě odborné literatury. Následně uskutečnit výsevy semen na živná média a sledovat jejich vliv na klíčení.
4. Zpracovat a vyhodnotit získané informace z asymbiotického klíčení vstavače kukačky v *in vitro* kultuře.

## 2 Vstavačovité (*Orchidaceae*)

### Obecná charakteristika

Zástupci čeledi vstavačovité (*Orchideaceae*) jsou považovány za nejkrásnější rostliny planety Země (Procházka 1980). Mimo to patří také k těm nejzajímavějším a bohužel i k těm nejohroženějším. Jsou nebývale krásné a žijí neobvyklými životními strategiemi (Průša 2019). Ježek (2003) je dokonce ve své encyklopedii nazývá královnami rostlinné říše a také symbolem vznešenosti a luxusu.

Latinské slovo „*Orchis*“, od kterého je odvozený název *Orchideaceae* znamená v českém překladu varle, což by mělo odkazovat na podobnost podzemních hlíz s mužskými pohlavními žlázami (Ježek 2003). Čeleď byla známá již ve středověku, kořenové hlízy některých druhů se používaly k výrobě salepu. Věřilo se, že má léčebné účinky a funguje jako afrodiziakum. I dnes čelíme problémům s nezákonným obchodem orchidejí a s tím spojeným ničením lokalit jejich výskytu (Průša 2019).

V současnosti se využití čeledi vstavačovitých (*Orchideaceae*) uchytilo především v zahradnictví a květinářství. Čeleď má zástupce i v potravinářství. Vanilovník plocholistý (*Vanilla planifolia*) je epifytická liánovitá orchidej, která se pěstuje pro plody, ze kterých se vyrábí koření (Průša 2019).

U nás známe terestrické (v zemi rostoucí) orchideje, ale existují i epifytické (žijící na jiných rostlinách) (Ježek 2003). Vstavačovité (*Orchideaceae*) patří mezi druhově nejpestřejší v čeledích rostlinné říše, odhaduje se kolem 30 000 druhů. Nalézt je můžeme téměř po celé zeměkouli, především kolem rovníku. Směrem k pólu jejich výskyt ubývá (Průša 2005). Velice hojně se objevují v tropických a subtropických oblastech Ameriky, Asie, Afriky i Austrálie (Průša 2019). Zde nejvíce rostou jako epifyty přichycené na jiné rostlině. V České republice nalezneme pouze terestrické orchideje, přibližně 70 druhů a poddruhů z čeledi vstavačovitých (*Orchideaceae*) (Procházka et Velíšek 1983).

Jak už bylo zmíněno, jedná se o druhově velice bohatou čeleď, nespíše protože je vývojově jednou z nejmladších. Vyčnívá svojí genetickou nestálostí, což můžeme

pozorovat například na variabilitě květních orgánů, popřípadě na fyziologických funkcích nebo celkové ekologii života (Dykyjová 2003).

### **Mykorrhiza**

Klíčovým faktorem v životě orchideje je vazba na mykorrhizní symbiózu s houbami. Jedná se o druh soužití orchidejí s podhoubím určitých druhů hub (Ježek 2003). U endomykorrhizy dochází k pronikání vláken houby až do nitra buněk kořenů cévnaté rostliny (Průša 2005). To umožňuje přenos organických látek, fosforu, dusíku i vody do orchideje. Většina orchidejí může poskytnout uhlíkaté látky houbě a navzájem se podporují v růstu. Tento symbiotický vztah je velice citlivý a může být jednoduše narušen. Může dojít k parazitismu, nebo dokonce k zániku (Průša 2005).

Míra závislosti orchidejí na mykorrhizu je v průběhu ontogenetického vývoje různá:

1. Plně mykotrofní (druhy jsou po celý život heterotrofně závislé na houbách).
2. Druhy závislé po celou dobu ontogeneze. Orchideje zčásti fotosyntetizují, ale ve všech fázích života potřebují doplnit látky pomocí hub.
3. Třetí skupinou jsou orchideje, které jsou závislé do vytvoření listového aparátu. Rostlina se stává zcela autotrofním organismem a zajistí si potřebné látky sama (Průša 2005).

### **Morfologie**

Jedná se o jednoděložné, vytrvalé byliny. Morfologie vstavačovitých má mnoho podob, ať už kvůli rozdílným životním strategiím, způsobu výživy nebo výskytem v různých podnebných pásích, či stanovištích (Průša 2005).

Lodyha bývá vzpřímená, listnatá, občas šupinatá. Po celé délce stejně široká a oblá, může se vyskytovat i tupě hranatá. Podzemní stonek neboli oddenek se objevuje v různých tvarech (Průša 2005). Některé jsou mohutné, jiné velmi tenké (Procházka 1980).

Listy jsou přisedlé, často pochvaté, střídavé, někdy dvouřadé, jednoduché, celistvé, celokrajné. U nezelených druhů jsou listy zakrnělé (Průša 2005).

Květy vyrůstají v úžlabí listů a většinou jsou oboupohlavné a zrcadlově symetrické. U terestrických orchidejí květy tvoří klasy, klasové hrozny, až hrozny (Procházka et Velíšek 1983). Květenství je vzpřímené, terminální, květ bývá zakrnělý. Květ vstavačovitých bývá tvořen z šesti lístků, pět z nich je k sobě skloněných a tvoří tzv. „přílbu“. Prostřední okvětní list na květu bývá zvětšený nazývá se „pysk“. Často je prodloužený dozadu v ostruhu (Procházka 1980).

Tyčinky srůstají s čnělkou a bliznou ve „sloupek“. Blizna je prohnutá s výrůstkem, který má žlásky spojené se splenými pylovými zrny (brylky) (Procházka 1980).

### **Opylování**

Rostliny z čeledi vstavačovité jsou nejčastěji opylovány řádem blanokřídlých (převážně vosami, včelami, kutilkami, čmeláky). Mezi opylovače orchidejí dále řadíme motýly a dvoukřídlé. Čeď také používá tzv. šálivé květy. Význam spočívá v nalákání opylovačů na odměnu v podobě nektaru, který ve skutečnosti rostlina neobsahuje (Procházka 1980).

U mnoha druhů orchidejí dochází ke samosprašnosti (autogamii), a to v otevřených i zcela zavřených květech. Jsou známé i druhy tropických orchidejí, které jsou opylovány ornitofolně, prostřednictvím kolibříků (Procházka a Velíšek 1983).

Orchideje se snaží nalákat opylovače tvarem, vůní a barvou květu. Prostřední okvětní lístek je zvětšený v pysk (jak již bylo zmíněno v morfologii), kde přistává opylovač a je naveden přímo do středu květu. (Dykyjová 2003). Strčí sosák do ostruhy a následně narazí do kapsičky, která ukrývá brylky. Nárazem kapsička pukne, což způsobí uvolnění terčů, jež nesou stopky brylek. Terčíky se lepivou hmotou přitisknou na sosák nebo čelo hmyzu ve vzpřímené poloze jako „roh“. Hmyz přisedne na jiný květ, kde se stopečky odtrhnou z hmyzu a přilepí na bliznu květu se všemi pylovými zrny. Cílem je přenést co nejvíce pylových zrn a následná produkce semen (Průša 2005).

### 3 Vstavač kukačka (*Anacamptis morio* (L.))

Vstavač kukačka (*Anacamptis morio*) patří do čeledi vstavačovitě (*Orchidaceae*) jedná se o jednoděložnou, vytrvalou terestrickou bylinu (Procházka et Velíšek 1983). Česká botanická společnost v roce 2021 vyhlásila vstavač kukačka za rostlinu roku (Jersáková et Průša 2021).



Obrázek 1: *Anacamptis morio* (Dohnal 1971)

#### 3.1 Taxonomie

*Anacamptis morio* je novější ustálený název. Dlouhou dobu se používal název *Orchis morio*. V posledních letech došlo k velkému pokroku v oblasti molekulární fylogenetiky. Při rozboru bylo zjištěno, že vstavač kukačka (*Anacamptis morio*) je více příbuzný s rodem rudohlávka (*Anacamptis*) než s ostatními vstavači (*Orchis*) (Jersáková et Průša 2021).

#### 3.2 Morfologie

Velikost vstavače kukačky se pohybuje kolem 8–25 cm, ovšem může dorůst až do velikosti 30–40 cm. Hlízy má kolovité a nedělené. Kořeny jsou krátké, málo početné a silné. Má přímou, světle zelenou lodyhu s jemným rýhováním. V horní části je lodyha



načervenalá, až nafialovělá, s malými listy. V dolní části rostliny jsou listy růžicově nahloučené (až 14 cm), kopinatého tvaru a sivozelené barvy (Průša 2005).

Květenství nese 7–25 květů, tvoří válcovitý, až vejčitý tvar dlouhý 13 cm. Listeny jsou kopinaté s nádechem fialové barvy. Válcovitý semeník má dlouhý kolem 1 cm. Je lysý a zkroucený (Průša 2005).

Květy jsou středně veliké, nápadné, se zelenou žilnatinou. Mohou se chlubit fialovou barvou, jsou známé i růžové, vzácněji bílé varianty. Vnější okvětní lístky jsou tupé, vejčité 5–8 mm dlouhé, směrem ke středu se velikost okvětních lístků zmenšuje a mění tvar v užší a prodlouženější. Dohromady jsou skloněné do tvaru přílby. Trojlaločný pysk (6–10 mm) má tmavě skvrnitý střed a „okřídlené“ vnější okvětní lístky. Pysk je spíše širší než delší. Ostruha má válcovitou podobu, je cca 8–11 cm dlouhá, směřující lehce vzhůru nebo rovně (Průša 2005). Výška sloupku se pohybuje okolo 4 mm. Má modrozelené brylky se žlutavými stopečkami. Plod má podobu zelené tobolky se semeny (Průša 2005).

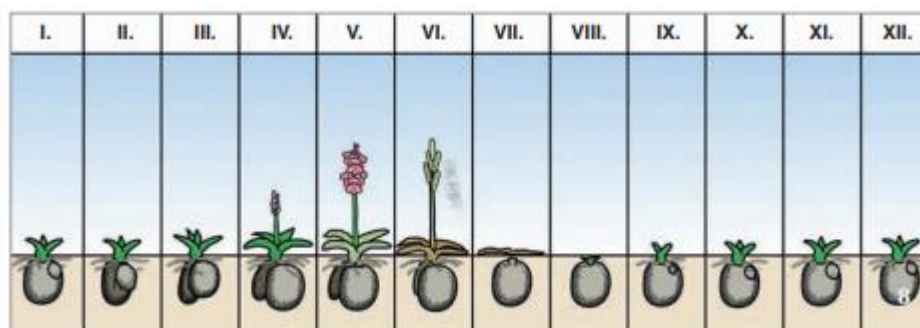


Obrázek 2: Květ *Anacamptis morio* (Jeřábková 2021)

### 3.3 Fenologie

1. **Září** – růst nadzemních orgánů (listy, lodyha) (Procházka et Velíšek 1983).
2. **Září až začátek dubna** – v tomto období listy zůstávají zelené a plní svoji funkci po celou zimu a začátek jara (Procházka et Velíšek 1983).
3. **Polovina dubna** – může nastat tzv. vedlejší doba kvetení, což znamená, že jedinec nebo celá populace začne kvést dříve, než je obvyklé (Průša 2005).

4. **Květen** – hlavní doba kvetení, u vstavače kukačka může toto období trvat až 20 dní. V této době je rostlina schopna opylení a následně oplodnění (Průša 2005). U vstavače kukačka bylo vypořádáno, že pokud k opylení dojde čtvrtý den od začátku kvetení, dojde k oplodněným všem vajíčkům v semeníku (Průša 2005).
5. **Začátek až polovina června** – opět může nastat vedlejší doba kvetení, která nastane později (Průša 2005).
6. **Polovina května, až polovina července** – dozrávání a následně otvírání semeníku. Rostlina začíná usychat a uvolňují se semena z tobolek (Jersáková et Kindlmann, 2004).



Obrázek 3: Fenologie *Anacamptis morio* (Jersáková et Průša 2021)

### 3.4 Biotopy

Původně se orchideje vyskytovaly v přirozených lesích, na lesních světlínách a v přirozených trávnicích nad horní hranicí lesa. Rovněž na územích spásaných divokou zvěří, místech narušených záplavami, lavinami či požáry (Jersáková et Kindlmann 2004).

V rané historii se člověk příliš nepodílel na změně krajiny, změna nastala, až když se lidé začali usazovat na jednom místě. S tím přišel počátek zemědělství, vytváření pastvin a polí na úkor lesní půdy (Procházka et Velíšek 1983). Orchideje tak posunuly svá místa výskytu a otevřel se jim nový terén k náletům semen (Dykyjová 2003). Přesídlily se na stanoviště luk a pastvin (Jersáková et Kindlmann 2004). S nástupem průmyslové revoluce přišla velkovýroba, scelování polí, těžká technika, pesticidy a regulování vodních toků (Průša 2019). Spolu s tím nastal i zánik polopřirozených stanovišť (Jersáková et Kindlmann 2004).

Přestože krajina kolem nás je více či méně ovlivněná člověkem, existují zde stanoviště, na kterých se velice daří vstavačovitým. Zástupcům vstavače kukačky vyhovují oblasti od nížin do podhůří (Průša 2005). Je to charakteristický druh pro acidofilní trávníky, vřesoviště, křovinaté stráně. Širokolisté suché trávníky a louky, občas i vlhčí stanoviště. (Hrouda 2013).

### 3.4.1 Konkrétní biotopy

**Acidofilní suché trávníky** – Původně území výskytu teplomilných a acidofilních doubrav. Nyní se jedná se o sekundární vegetaci, dříve biotop využíván jako ovčí pastviny (Chytrý et al. 2010).

Slunná místa, se suchomilnými a teplomilnými travami. Podloží tvoří kyselé silikátové horniny (žula, rula, granulit, pískovec, minerálně slabší vulkanity, porfyrit, algonkická břidlice), vzácněji i písky (Chytrý et al. 2010).

Dominantními druhy jsou ovsíř luční (*Avenula pratensis*), kostřava ovčí (*Festuca ovina*), kostřava žlábkatá (*F. rupicola*) nebo bojínek tuhý (*Phleum phleoides*). K acidofilním druhům rostoucím na biotopu patří psineček obecný (*Agrostis capillaris*), psineček tuhý (*A. vinealis*), pavinec horský (*Jasione Montana*), smolníčka obecná (*Lychnis viscaria*) a šťovík menší (*Rumex acetosella*). Na skalních výchozech se mohou nacházet efemérní jednoleté rostliny. Důležitým zástupcem jsou i mechy, například rokyt cypřišovitý (*Hypnum cupressiforme*).

V České republice se biotop vyskytuje na území Českého středohoří, Ralské pahorkatiny, v podhůří Doupovských hor, na Křivoklátsku, v okolí města Prahy, dále Podbrdsko, Plzeňsko, Pootaví, Střední Povltaví, Střední a Dolní Posázaví, Znojemsko, Moravskokrumlovsko, Třebíčsko, Brněnsko, obvody Dražanské vrchoviny, Přerovsko, Niva Dolní Dyje (Chytrý et al. 2010).

**Kostřavové louky s mochnou bílou** – Stanoviště se vyskytuje v údolních polohách na nezaplavovaných říčních terasách. Středně vysoké rostliny i druhy vyššího vzrůstu se na biotopu objevují, ale ve větším počtu se vyskytují rostliny nižšího vzrůstu až 90 % z území. Na biotopu se daří nižším druhům. Díky absenci vyšších jedinců dopadá

více slunečního záření na druhově bohaté nízké trávy. Půdním typem je fluvizem, půda je vlhčí v jarních měsících a na konci léta může vysychat.

K dominantním druhům patří kostřava červená (*Festuca rubra* agg.), psinečka obecná (*Agrostis capillaris*), řebříček obecný (*Achillea millefolium*), máchelka srstnatá (*Leontodon hispidus*) a jetel luční (*Trifolium pratense*). K diagnostickým druhům na lokalitě řadíme např. smldník olešníkovitý (*Peucedanum oreoselinum*) a mochna bílá (*Potentilla alba*).

Kostřevové louky s mochnou bílou jsou v ČR rozšířené především v západní polovině země, hlavně v oblasti řeky Berounky. K dalším lokalitám se řadí okolí menších toků v oblasti Brd a Krušných hor (Chytrý et al. 2010).

**Podhorské kostřavovo-trojštětové louky** – Dříve se jednalo o vegetaci acidofilních bučin, jedlin, jedlových a acidofilních doubrav. Nyní jsou tvořeny společenstvem květnatých luk a rozsáhlými pastvinami, rostoucími na oligotrofních kambizech a minerálně chudším podloží. Půda v létě mírně vysychá. Biotop leží na vrchovině a v podhorské oblasti do 800 m n. m.

Dominantními druhy společenstva jsou kostřava červená (*Festuca rubra* agg.), ovsík vyvýšený (*Arrhenatherum elatius*), psineček obecný (*Agrostis capillaris*) a trojštět žlutavý (*Trisetum flavescens*).

Před první sečí, která se provádí v červenci jsou louky pokryté pestrými barvami květů kopretiny bílé (*Leucanthemum vulgare* agg.), pryskyřníkem prudkým (*Ranunculus acris*) a zvonkem rozkladitým (*Campanula patula*). Před druhou sečí, která se provádí v srpnu dominuje porostu psineček obecný (*Agrostis capillaris*), kvetoucí řebříček obecný (*Achillea millefolium*), třezalka skvrnitá (*Hypericum maculatum*) a máchelka srstnatá (*Leontodon hispidus*). V sušších oblastech roste například hvozdík kropenatý (*Dianthus deltoides*) i mateřídouška vejčitá (*Hymus pulegioides*).

Na území České republiky se biotop vyskytuje v okrajových pohořích Českého masivu, ve větším množství i na Plzeňsku a Křivoklátsku, Českomoravské vrchovině,

v Železných horách, na Dražanské vrchovině, v Hostýnských vrších, Vsetínských vrších a v Bílých Karpatech (Chytrý et al. 2010).

**Úzkolisté suché trávníky** – Asociace je vázaná na velice prosluněné svahy orientované na jih s průměrnou roční teplotou nad 8 °C. Půda je mělká až středně hluboká, druhem jsou rendziny, pararendziny, rankery nebo černozemě. Podloží je bazické nebo neutrální. Základem jsou vápence, čediče, vápnité pískovce, spraše, splity a amfibolity. Na nejsušších místech kyselejší horniny, žuly i žnělce (Chytrý, 2007). Složení vegetace se liší podle mineralizace podloží. Původní vegetací byly teplomilné doubravy, které dříve sloužily jako ovčí pastva (Chytrý et al. 2010).

Jedná se o nízké trávníky s dominancí úzkolistých trsnatých trav, košťavy walliské (*Festuca valesiaca*), ostřice nízké (*Carex humilis*), kavylu vláskovitého (*Stipa capillata*), také druhy kavylů (*Stipa*). Důležitými jsou i druhy vytrvalých bylin, na jaře se vyskytují efemerní jednoletky. Druhy jsou vázanější na biotop v teplejších a sušších oblastech, než v relativně chladnějších a vlhčích. Od poloviny května přes letní měsíce usychá část nadzemní biomasy (Chytrý et al. 2010; Chytrý et al. 2007).

Biotop se vyskytuje na nejteplejších a nejsušších místech naší republiky. Slunné oblasti severních Čech, středních Čech a jižní Moravy. V Čechách i na Moravě je vyzorován rozdíl mezi druhy rostlin v oblastech biotopu.

Konkrétními lokalitami jsou obvody Doupovských hor, Střední a Dolní Poohří, České středohoří, Slánsko, Dolní Pojizeří, Český kras a okolí Prahy, Křivoklátsko, jihovýchodní okraj Českého masivu mezi Brnem a Znojmem, Moravský kras, širší okolí Bučovic, Čejče, Hustopeč a Mikulova včetně Pavlovských vrchů, vzácně východní okraj Dražanské vrchoviny a jihozápadní výběžky Bílých Karpat (Chytrý et al. 2010).

**Širokolisté suché trávníky** – Lokality mají sekundární původ, dříve se jednalo o dubohabřiny a teplomilné doubravy i bučiny. Krom pastviny byl biotop dříve využíván jako jednosečná louka, kvůli větší primární produktivitě (Chytrý et al. 2007).

Nacházejí se zde svahy s více či méně zapojenými travnatými porosty, druhově bohaté s hojným počtem širokolistých vytrvalých bylin. Rostoucí na středně hlubokých, až hlubokých půdách. Půdním druhem je pararendzina nebo pelozem (Chytrý 2007). Podložím jsou měkké sedimentární horniny křídly, flyše, sedimenty mladších třetihor, spraše a podsvahové diluvium (Chytrý et al. 2010).

Dominantními druhy jsou válečky prapořité (*Brachypodium pinnatum*), případně sveřepy vzpřímené (*Bromus erectus*). V menším počtu kostřava žlábkatá (*Festuca rupicola*), ostřice nízká (*Carex humilis*), pýchava vápnomilná (*Sesleria caerulea*).

Na suchých loukách v Bílých Karpatech roste řada druhů z čeledi *Orchidaceae*, druhově bohaté jsou i suché lemy luk a podrosty teplomilných doubrav, kde se vyskytuje například ostřice horská (*Carex montana*), plamének přímý (*Clematis recta*), smdlník jelení (*Peucedanum cervaria*), mochna bílá (*Potentilla alba*), prvosenka jarní (*Primula veris*), srpice barvířská (*Serratula tinctoria*), jetel červenavý (*Trifolium rubens*) (Chytrý et al. 2010; Chytrý et al. 2007).

Biotop je rozšířený v nížinách a pahorkatinách, na mírnějších, i strmějších svazích v podstatě po celé České republice (Chytrý et al. 2007).

Konkrétními lokalitami jsou obvody Doupovských hor, širší okolí Podbořan, Žatce, Loun a Slaného, České středohoří, Kokořínsko, okolí Prahy a Český kras, Křivoklátsko, Pootaví, okolí Českého Krumlova, Dolní a Střední Pojizeří, povodí Cidlíny, okolí Hořic, podhůří Orlických a Železných hor, Litomyšlsko, Posvitaví, Moravský kras, okolí Brna, Znojma, Mikulova, Čejče, obvody Ždánického lesa a Litenčických vrchů, Bílé Karpaty, obvody Hostýnských vrchů a další nižší oblasti moravských Karpat, okolí Prostějova, Olomouce a Přerova (Chytrý et al. 2010).

**Mezofilní ovsíkové louky** – Dominující ovsík vyvýšený (*Arrhenatherum elatius*), na loukách v nížinách a pahorkatinách. Charakteristické jsou širokolisté byliny. Typický je bolševník obecný (*Heracleum spondylium*), chřástavec rolní (*Knautia arvensis*), jetel pochybný (*Trifolium dubium*), kakost luční (*Geranium pratense*), zvonek rozkladitý (*Campanula patula*) (Jersáková et Kindlmann 2004).

**Poháňkové pastviny** – Nízký, zapojený porost dominantních trav. V horských oblastech středně vysoké louky, hojně s jíllem vytrvalým (*Lolium perene*), kostřavou luční (*Festuca pratensis*), poháňkou hřebenitou (*Cynosurus cristatus*). Zastoupené jsou i vytrvalé růžicovité byliny a rostliny s plazivými nadzemními výběžky, jetel luční (*Trifolium pratense*), jetel plazivý (*Trifolium repens*), jitrocel větší (*Plantago major*) (Jersáková et Kindlmann 2004).

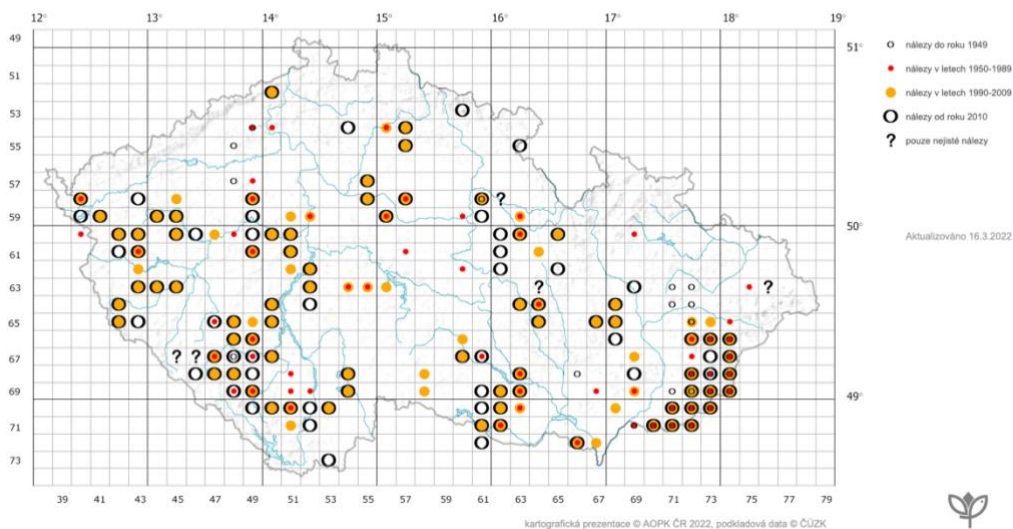
**Podhorské a horské smilkové trávníky** – Vyskytují se v sušších svahových polohách, jedná se o krátkostébelné smilkové louky a pastviny v podhorských až horských polohách. Dále se mohou vyskytovat na plochem terénu na střídavě vlhkých místech na obvodu rašelinných luk. Na biotopu se vyskytuje smilka tuhá (*Nardus stricta*), trojzubec poléhavý (*Danthonia decumbens*) i mnoho bylin např. hadí mor nízký (*Scorzonera humilis*), mateřídouška vejčitá (*Thymus pulegioides*), svízel hercynský (*Galium saxatile*) a violka psí (*Viola canina*) (Jersáková et Kindlmann 2004).

### 3.5 Výskyt v České republice

Vstavač kukačka patřil k nejhojnějšímu druhu z čeledi vstavačovitých, nyní je na ústupu. Vyhybnul na velké části lokalit, zejména kvůli intenzivnímu hospodaření, úbytku pastvy a kosení. Nyní se na řadě míst stal hlavním předmětem ochrany (Průša 2019). K roku 1996 je vstavači kukačka připisováno 181 lokalit výskytu. Historicky se vyskytoval na 524 lokalitách, ovšem z nich bylo potvrzeno pouze 82. Nově bylo objeveno 99 lokalit (Jatiová et Šmiták 1996).

Agentura ochrany přírody a krajiny ČR vytvořila přehlednou mapu o výskytu vstavače kukačky na našem území (Obr. 4). Na mapě jsou zaznamenány nálezy v určitých etapách. Z mapy lze vyčíst rozdíl výskytu od nejstarších dat do roku 1949 až po nejnovější od roku 2010 (Kostiuková 2022).

Z mapy vyplývá, že se druh velice hojně vyskytoval i vyskytuje ve Zlínském kraji. Dále je vysoký výskyt druhu na území Podyjí a v Jihočeském kraji. Další, četnější záznamy od roku 2010 pochází z Karlovarského a Plzeňského kraje (Kostiuková 2022).



Obrázek 4: Mapa výskytu (AOPK 2022)

### 3.5.1 Výskyt v krajích ČR

#### Zlínský kraj

Ve Zlínském kraji se vstavač kukačka vyskytuje na mnoha chráněných místech. Jedním z nich je **přírodní památka Růžděcký Vesník**. Jedná se o mozaiku travinobylinných společenstev, bývalých jalovcových pastvin a kosených květnatých luk. V západní části jsou kosené mezofilní ovsíkové louky a xerofilní luční porosty, na východní straně travinobylinná společenstva podobná mezofilním ovsíkovým loukám. Vyskytuje se zde několik druhů vstavačovitých. Jedním z nich je vstavač kukačka. V posledních letech se zde objevuje jen kolem 10 rostlin (ZO ČSOP Via Hulín 2021a).

Další lokality spadají pod **chráněnou krajinnou oblast Bílé Karpaty**. Rozsáhlým odlesňováním se krajina Bílých Karpat proměnila v tisíce hektarů květnatých luk. Jsou bohatá na rostlinná společenstva, včetně vstavačovitých. Symbolem Bílých Karpat se staly právě vstavačovitě rostliny (AOPK 2022a).

**Přírodní rezervace Hutě** je tvořena pestrou mozaikou suchomilných, mokřadních a ekotonálních druhů rostlin. Ze vstavačovitých je vstavač kukačka dominantním druhem (ZO ČSOP Via Hulín 2021b).

**Přírodní památka U Petrůvky** byla dříve využívána jako extenzivní pastva, dnes je na území vstavač kukačka předmětem ochrany (ZO ČSOP Via Hulín 2021c).



Dalším místem výskytu je luční chráněné území **Podsečí** v údolí poblíž obce Petrůvka (Rumplíková 2009).

**Přírodní památka Bílé potoky** je rozdělena na dvě luční oblasti – Fuksův láz a Bílé potoky. Okolí je zarostlé lesním porostem. Fuksův láz je převážně květnatá louka s výskytem orchidejí včetně vstavače kukačky. Bílé potoky jsou z větší části mokřady, vzácně mezofytní louky s orchidejemi (ZO ČSOP Via Hulín 2021d).

**Přírodní rezervace Javorůvky** je bohaté různorodé území. Mokřadní vegetace a bělokarpatská louka. Typický biotop pro severní část Bílých Karpat s výskytem chráněných druhů rostlin, včetně vstavače kukačky ZO ČSOP Via Hulín 2021e).

**Přírodní rezervace Horní louky** je tvořena šesti dílčími plochami, spojenými ochranným pásmem. Součástí jsou společenstva svazu *Trifolium medii* a květnaté louky. Vstavač kukačka se zde vyskytuje spolu s dalšími 232 taxony vyšších druhů rostlin (ZO ČSOP Via Hulín 2021f).

Květnatá louka **přírodní památky V Krátkých** je další oblastí se vstavačem kukačka. Roste zde na suchých svazčitých stanovištích (ZO ČSOP Via Hulín 2021g).

**Přírodní památka Dubiny**, vstavač kukačka je na zmíněném území součástí teplomilného travinobylinného porostu svazu *Cirsio-Brachypodium pinnati* (ZO ČSOP Via Hulín 2021h).

**Přírodní památka Mechnáček** široký členitý žleb s bělokarpatskými květnatými loukami. V 70. letech byla oblast poškozena hnojením a rozoráním. Obnova bude trvat několik let, přesto se zde objevuje řada chráněných rostlin (ZO ČSOP Via Hulín 2021ch).

## **Jihomoravský kraj**

V **národním parku Podyjí** je několik biotopů s výskytem vstavače kukačky. Vyskytuje se hlavně na vřesovištích (Němec 2012), v obcích na východním okraji Podyjí, Havraníky, Popice a Hnanice. Jedná se o druhotné biotopy, suché trávníky a vřesoviště, která vznikla potlačováním sukcese. Ostrůvky tohoto biotopu se vyskytují po celém chráněném území (Stejskal 2012)

Na Znojemsku patří zdejší populace k nejbohatším – přírodní rezervace **Cínová hora** v lomu a u **Popické kaple** (Němec 2012)

**Přírodní rezervace Horky u Milotic** v panonské oblasti, obsahuje řadu významných druhů včetně vstavače kukačky (Zimová 2010).

**Chráněná krajinná oblast Bílé Karpaty** zasahuje i do Jihomoravského kraje, **přírodní rezervace Kútky** je známá vysokým počtem druhů orchidejí, včetně vstavače kukačky (ZO ČSOP Via Hulín, 2021i).

V oblasti Lednicko-valtického areálu leží **národní přírodní památka Rendez-vous**, taktéž s výskytem vstavače kukačky (Cibulka 2015)

Okres Blansko zahrnuje **přírodní památku Dobrá studně**, vegetací jsou podhorské smilkové trávníky, z významnějších druhů zde roste vstavač kukačka (Ochoz u Tišnova 2020). K dalším **přírodním památkám** s výskytem vstavače kukačky patří **Biskupský kopec a Horky** (Martišek et Martišková 2010; ZO ČSOP Via Hulín, 2021j).

### **Jihočeský kraj**

V **národní přírodní rezervaci Velký a Malý Tisý** se nachází mnoho významných společenstev vázaných na vodní a mokřadní ekosystémy. Jedná se o komplex 11 různě velkých rybníků, jejich břehy slouží jako stanoviště pro vstavač kukačku i řadu jiných rostlin (AOPK 2022b)

V **národním parku Šumava** by se měl vyskytovat ve **Volyňském Předšumaví** v obci Šumavské Hoštice. U Mlynářovic v **Prachatickém Předšumaví** bylo zaznamenáno 6 exemplářů. V hojnějším počtu se druh vstavače zachoval v Šumavsko-novohradském podhůří, na šumavském Javorníku (Ekrt et Půbal 2008).

V obci Zábrdí, **přírodní památka V Polích** na květnatých mezofilních loukách (Střelec 2018).

Jedny z prvních údajů o výskytu vstavače kukačka na Šumavě pochází z obce Svatá Máří. Další informace o výskytu popsal Moravec o 10 let později, a to z území Pravětína, Drslavic, Záblatí, Kratušina, Šumavských Hoštic, z údolí potoka Naháč u Trhonína a od Vícemile. Lokality se nepodařilo ověřit, je pravděpodobné, že z těchto míst druh vymizel (Půbal 2006).

### **Karlovarský kraj**

Lokalita vstavače kukačky se nachází u Těšova a nazývá se „**Kukačková louka**“, jedná se o pravidelně obhospodařovaný svah s převahou travin (Brabec et al. 2008).

**Národní přírodní památka Komorní hůrka**, nachází se zde travnaté ekosystémy, lesní ekosystémy bučin a biotop vstavače kukačky, na území se vyskytuje více než 1000 jedinců (AOPK 2022c; Brabec et al. 2008).

Další lokality výskytu jsou **přírodní památka Hořečková louka na Pile**, zachovalé květnaté louky a pastviny (AOPK 2022d). **Přírodní rezervace Vladař**, v suchých trávnících roste vstavač kukačka (Anonymus 2016). Na louce nedaleko obce **Protivec** by se měl vyskytovat ve velkém počtu (v roce 2008 údajně zaznamenáno 300 jedinců). Méně jedinců by se mělo vyskytovat u obce **Štědrá na svazích Ptačího vrchu** (Brabec et al. 2008).

### **Plzeňský kraj**

Na území **chráněné krajinné oblasti Slavkovský les** najdeme řadu vzácných, a zvláště chráněných druhů včetně vstavače kukačky na některých loukách a pastvinách (AOPK 2022e)

V **Prachatickém Předšumaví** v obci Švihov, vstavač kukačka se zde vyskytuje ve svahu na prameništní louce; v osadě Chválov, na kosené louce mezi lesy (Půbal 2006). Asi kilometr od osady Albrechtice v předhůří Šumavy, se vstavač kukačka nachází v **národní přírodní památce Prameniště U Fínů**. Jedná se převážně o pastviny a vlhké louky (Moravec 2011).

Místem výskytu v okrese Klatovy, je **přírodní park Plánický hřeben**, na květnaté bučině v **přírodní rezervaci Velký kámen** (Valtr 2018).

### **Vysočina**

Důležitou lokalitou výskytu je **přírodní památka Kamenný vrch** blízko obce Heraltice, jedná se o významnou lokalitu. Vyskytuje se zde řada lučních druhů včetně populace vstavače kukačky (ČSOP Kněžice 2017).

V okrese Jihlava se vstavač objevuje na bývalé, extenzivně obhospodařované pastvině **přírodní památka Prosenka**, v posledních letech však nebyly spatřeny kvetoucí exempláře (Křivan et Jelínek, 2010).

Dále je populace jedince vstavače kukačky zaznamenaná v obci Lhánice na území **přírodní památky Kozének**, jedná se o mozaiku různých typů suchých trávníků (Morávková 2015).

Na krátkostébelných, suchých trávnících byl vstavač kukačka zaznamenan na území **přírodní památky Ptáčovské rybníky** (Anonymus 1). Následujícím okresem je Žďár nad Sázavou, konkrétně se jedná o **přírodní památku Křižník**, **přírodní památku Nad koupalištěm** v obou případech se jedná o suchomilná, travinná společenstva s výskytem vzácných bylin (Kraj Vysočina 1; Kraj Vysočina 2). **Národní přírodní**

**památku Švařec** je komplex polopřirozených suchomilných trávníků, křovin, extenzivně sečených luk v nížinách i podhůří (Kraj Vysočina 3).

### **Moravskoslezský kraj**

Vstavač kukačka se v kraji nevyskytuje příliš hojně. Byl zaznamenán **v chráněné krajinné oblasti Beskydy** ve středních polohách na vlhčích, až sušších loukách (Popelářová et Ohryzková 2013).

### **Olomoucký kraj**

V Olomouckém kraji se vstavač kukačka vyskytuje na území **přírodní rezervace Malý Kosíř**. Dříve byla lokalita využívána jako sady a pastvina, dnes se jedná suchomilnou vegetaci, která je ohrožena expanzí dřeva (*Sagittaria* 2010a). Druh také roste na území **přírodní rezervace Blatka**, která je tvořena lesy, loukami i vodními plochami (*Sagittaria* 2010b). **Přírodní památka Vápenice** je xerotemní tepní lokalita, nejrozsáhlejší jsou zde rostlinná společenstva, na kterých se vyskytuje vstavač kukačka (Trnka 2010).

### **Pardubický kraj**

Ojedinělým výskytem vstavače kukačky je **přírodní památka Vstavačová louka** v okrese Ústí nad Orlicí. Většinu území tvoří podmáčené bezkolencové stanoviště. (Rešlová 2010). Dalším územím výskytu je **přírodní rezervace Mazurovy chalupy**, které jsou tvořeny slatinnými a mezofilními loukami (Hroneš 2008).

### **Středočeský kraj**

Ve Středočeském kraji můžeme vidět vstavač kukačka v okrese Nymburk na lokalitě **národní přírodní památky Slatinná louka u Velenky**, jsou zde podmáčené slatinné louky (AOPK, 2022f). Vstavač kukačka se vyskytuje v **evropsky významné lokalitě Milovice – Mladá**, jedná se bývalý vojenský prostor. Rozsáhlé území suchých trávníků s listnatými acidofilními lesy (AOPK 2022g). Předmětem ochrany je v **národní přírodní památce Dlouhopolsko** na slatinných loukách (Anonymus 2014). Další lokalitou můžeme jmenovat **přírodní rezervaci Andělské schody**, kde se vyskytuje na nejsušších místech rezervace (Hrčka 2013). Také roste na v **přírodní památce Sládkova stráž**, charakteristická teplomilnými druhy s vysokou druhovou rozmanitostí, včetně vstavačovitých (Anonymus 2).

Vstavač kukačka roste v **chráněné krajinné oblasti Český kras** na suchých trávnících bývalých pastvin, je znamenáno kolem 30 jedinců. Roste na **Čabrku u Mořinky, evropsky významné lokalitě Kralické údolí**, nově v **přírodní rezervaci Kobyla**, na okraji Tobolského vrchu v **národní přírodní rezervaci Koda**. (AOPK 2018).

### **Ústecký kraj**

Vstavač kukačka se dříve v Ústeckem kraji vyskytoval ve větším počtu. V **Českém středohoří** se dnes vyskytuje pouze na jedné lokalitě na Bohyňských ladě na Děčínsku (Nepraš et Kroufek 2011).

### **Liberecký kraj**

Z Libereckého kraje nejsou skoro žádné záznamy, sporadicky se vyskytuje v **chráněné krajinné oblasti Český ráj** na výslunných loukách. Bylo potvrzeno 12 exemplářů (CHKO Český ráj 2004).

### **Karlovarský kraj**

Ve zmíněném kraji se vstavač kukačka) vyskytuje na vícero stanovištích, převážně na zvláště chráněných územích. Vstavač kukačka můžeme vidět v **přírodní památce Oborská luka**, jižně od obce Březka (Anonymus 3). Hlavním předmětem ochrany v **přírodní památce Na Hadovně** je populace vstavače kukačky na lokalitě přežívá několik posledních exemplářů, nebo je možná vyhynulí v roce 2016 se nepodařilo nalézt žádného jedince (Anonymus 4)

## **3.6 Výskyt ve světě**

Vstavač kukačka je rozšířený především po Evropě, nevyskytuje se pouze na nejsevernějších, nejvýchodnějších a nejj jižnějších oblastech Evropského kontinentu (Průša 2005).

Jatiová et Šmiták (1996) popisují výskyt vstavače kukačky ve světě takto: „*Na západě probíhá hranice areálu severní Afrikou, východním Španělskem a Francií. K severu*

*jde přes Irsko do jižní Skandinávie na jihovýchodě sahá až ke Kaspickému moři. Vyskytuje se roztroušeně po celém území Slovenské republiky.“*

## **4 Management ochrany *in situ* a *ex situ***

Bezlesé plochy jsou na území České republiky těmi slabšími a ubývajícími. Spolu s nimi i druhy, které na těchto plochách žijí (Vítková 2011). Bylo zmíněno, že populace vstavače kukačky patřila ve střední Evropě k hojnějším. Nyní jejich počet ubývá. Jedním z důvodů je zánik stanovišť, na kterých se vyskytoval. Na našem území je zaznamenán úbytek stanovišť o 60 % (Sagittaria 2010c).

K tomu, aby ke ztrátám druhů či lokalit nedocházelo, nám pomáhají tzv. managementy ochrany. Jedná se o neustálý proces, ve kterém se využívají nejlepší dostupné poznatky. Neustále se informace posuzují a obnovují. Zároveň se berou v úvahu ekologické, společenské a politické souvislosti (Pešout et Knižátková 2020). Na managementech ochrany se podílí řada vědeckých pracovníků a specialistů na jednotlivé druhy. Společně ověřují záchranné techniky péče v jejich přirozeném prostředí (*in situ*) i mimo prostředí (*ex situ*) (Miko et Hošek 2009).

Ve výzkumech *ex situ*, konkrétněji *in vitro* (neboli ve skle), se za realistických klimatických podmínek můžeme zabývat studiem druhů mnohem detailněji s přesnějšími výsledky (VŠÚO 1). Tato metoda je vhodná obzvláště pro ohrožené druhy, protože nemůžeme ohrozit jejich existenci v přirozeném prostředí.

Výzkumy *in situ* nám pomáhají pozorovat změny v přirozeném prostředí a zároveň změny ke kterým dochází v přirozené populaci. K získání poznatků je potřeba dlouhodobý, pravidelný a opakovaný **monitoring**. Tím můžeme sledovat změny v čase a vyhodnotit **fitness** populace (Jersáková et Kindlmann 2004). Jak reaguje na dlouhodobé, nepředvídatelné nebo krátkodobé události. Při hodnocení fitness populace je důležité znát její charakteristiku a charakteristiku prostředí. Dále pak biotické a abiotické podmínky, historii, velikost populace a způsob života druhu (Lienert et al. 2002; Hornemann et al. 2012 ex Morris et al. 2008). Se zdatností také souvisí vztahy v prostředí, ve kterém se druh vyskytuje (Lienert et al. 2002).

**Inventarzací** můžeme zjistit počet jedinců v populaci. Stanovíme tak, zda je populace stabilní, zda roste, či klesá. Při **výběrovém šetření** odhadneme hustotu druhu ve společenstvu. Po úsecích se spočítá počet jedinců (lze zprůměrovat) a rovnou odhadne velikost populace. Pro větší přesnost se používají statistické metody. **Demografické studie** zkoumají konkrétního jedince. Rychlost růstu, reprodukci a pravděpodobnost přežití. Takto individuálně se zkoumají jedinci různých věkových kategorií a velikostí, abychom mohli vytvořit ucelený výsledek o populaci (Jersáková et Kindlmann 2004).

Velikost stanoviště ovlivňuje genetickou variabilitu, která se zvyšuje společně s velikostí populace. Větší populace mají předpoklad pro zdravější jedince a větší životaschopnost. Zároveň mohou být atraktivnější pro opylovače (Hornemann et al. 2012). Orchideje jsou schopny poměrně dlouho snášet stres, v porostu nikdy nepřevažují nad ostatními rostlinami (Anonymus 5). Jejich semena by mohla cestovat i několik kilometrů daleko, protože jsou malá a lehká (Jersáková et Malinová 2007). Ale ve výzkumech, které zmiňuje Jersáková a Malinová (2007) bylo zjištěno, že semena nejspíš padají jen pár metrů od matečné rostliny. Novým jedincům by se tak mělo dařit více, jelikož v blízkosti ohniska orchidejí mají větší pravděpodobnost výskytu ideálního houbového symbiota (McCormick et al. 2016).

Víme, že snižování populace je způsobeno změnou využívání krajiny a úbytku opylovačů. Druh zmizel z luk, kde probíhá intenzivní obhospodařování. Špatně snáší hnojení a je konkurenčně velmi slabý (Härtel 2021). Na druhou stranu bylo pomocí monitoringu zjištěno, že populace vstavače kukačky mohou přežívat několik let i na nekosených místech, které jsou inhibovány suchem nebo jinými faktory. Z toho můžeme vyvodit, že populace vstavače kukačky jsou dlouhověké, minimálně se dožívají až 7 let. V Anglii probíhal monitoring 102 jedinců z nich se 42 % dožilo stáří 9 až 17 let (Jersáková et Kindlmann 2004).

#### **4.1 Ochrana *in situ***

Ochrana přírody v České republice sahá do první poloviny 19. století, kdy začala vznikat první územní ochrana. Ochrana přírody v té době spočívala v „zakonzervování“, bez zásahu i péče (Mackovčín 2005). Doba, kdy stačila pasivní ochrana je již dávno pryč (Procházka et Velíšek 1983). Aktivní péče o území začala v devadesátých letech 20. století (Mackovčín 2005).

Péče o stanoviště je pro orchideje nezbytná, musí být zajištěny komplexní opatření. Především územní ochrana spolu s aktivní péčí (management), která simuluje ekologické podmínky, jež vyhovují danému druhu (Procházka et Velíšek 1983). To zahrnuje vyloučení kontaminace hnojiv ze stanoviště a blokování sukcese kosením a pastvou (Průša 2005). Blokováním sukcese přestávají stanoviště zarůstat vyššími rostlinami. Na luční stanoviště začne dopadat dostatek světla, které je důležité pro růst vstavačovitých rostlin (Anonymus 5). Vždy je nutné respektovat typ stanoviště a druhy vstavačovitých, které se na něm vyskytují (Průša 2019).

Vstavač kukačka při absenci seče lokalit po dobu dvou let přestává kvést. Přechází do sterilního nebo dormantního stavu, popřípadě odumírá. Pokud se snažíme o obnovu lokalit, může navrácení do původního stavu trvat i několik let. Např. v okrese Vsetín, z původně kvetoucích 70 jedinců, přestaly všechny rostliny vstavačů kvést při absenci sečení. Asi po 5 letech obnovené aktivní péče jsou na lokalitě 2-3 kvetoucí jedinci (Jersáková et Kindlmann 2004).

Vhodnou péčí je pravidelná seč od půlky června do konce srpna. Některé lokality, na výslunných místech s nízkým nárůstem biomasy, stačí kosit jednou ročně. Bylo zjištěno, že k uchování nových jedinců pomáhají divoká prasata a krtci. Tato zvířata dokážou narušit hustý porost a drny trav, které vstavači nesvědčí. Je ale nutné pohlídat, aby divoká prasata nesežrala hlízy vstavače kukačky. K narušení porostu lze využít i krátkodobou intenzivní pastvu v letních měsících, ale pouze jednou za několik let (Jersáková et Kindlmann 2004).

Základní **management lučních porostů** je sečení, pastva a odstranění náletů. Je možná i kombinace zásahů.

Sečení – je vhodné aplikovat mozaikovitě po odkvětu rostlin. V tomto období jsou semena vysypaná z plodů na zem. Vzniklá biomasa by se měla sušit na místě sečení, aby nedošlo ke ztrátě semen.

Pastva – používají se kozy a ovce (případně skot a koně). Je náročné zvolit správnou intenzitu, aby nebyla příliš nadbytečná nebo naopak. Někdy je vhodné nechat spásat jen část území tzv. oplůtky. Také se aplikuje nepřetržité nebo jednorázové pasení.



Odstranění náletů – vhodné, pokud se na území neaplikuje pastva či sečení, při kterém automaticky dochází k odstranění náletů (Průša 2019).

**Management pramenišť a mokřadů** – ohrožení spočívá v poklesu spodní hladiny vody, eutrofizace a zarůstání. V takových případech je vhodné umístění ochranných pásem a zákaz hnojení. Proti zarůstání pak aplikovat občasné sečení a odstranění náletů (Průša 2019).

**Management lesů a křovin** – je vhodné klást důraz na přirozenou obnovu lesa a nevnášet nepůvodní druhy. Zajistit ochranu proti okusu zvěři a zakázat holosečné hospodaření. Zásahy v křovinných porostech by neměly narušit výskyt cenných druhů křovin, ale zároveň nedovolit zarůstání keřového patra (Průša 2019).

#### **4.1.1 Managementy stanovišť výskytu vstavače kukačky**

**Acidofilní suché trávníky** – Neobhospodařování stanoviště, spádem dusíku a rozšiřováním trav *Arrhenatherum elatius* a *Calamagrostis epigejos*, se porost přeměňuje na mezofilnější typ trávníku a ustupují vzrůstově nižší druhy. Sukcesí zarůstají stanoviště keři a stromy (trnovníkem akátem (*Robinia pseudacacia*), břízou bělokorou (*Betula pendula*) nebo borovicemi (*Pinus nigra* a *P. sylvestris*)). Pro udržení biotopu je potřeba pravidelné odstraňování dřevin, pastva, popřípadě seč (Chytrý 2010).

**Kostřavové louky s mochnou bílou** – Při větší koncentraci živin, zejména dusíkatých hnojiv, dochází k nárůstu především vyšších trav a následně k poklesu druhové biodiverzity. Ke změně druhového složení dochází i v mimořádně suchých letech. Po jedné až dvou vegetačních sezónách se přirozené složení porostu vrací do původního stavu. K uchování biotopu je potřebná pravidelná seč, bez přidávání dusíkatých hnojiv (Chytrý 2007).

**Podhorské kostřavovo-trojštětové louky** – Biotop potřebuje alespoň jednu, na úživnějších stanovištích dvojí seč, a mírné hnojení. Při neobhospodařování dochází k zarůstání mezofilními nebo nitrofilními druhy dvouděložných bylin a následně

křovinami. Pokud dojde k přehnojení, též dochází k zarůstání dvouděložnými rostlinami (např. *Aegopodium podagraria*) (Chytrý 2007).

**Úzkolisté suché trávníky** – Nepříznivé je neobhospodařování lokalit a imise atmosférického dusíku, to vede k zanikání nižších druhů rostlin a k rozšiřování a zarůstání vyššími travami *Arrhenatherum elatius* a *Calamagrostis epigejos*. Dalším škodlivým faktorem jsou invazní listnaté dřeviny (*Ailanthus altissima*, *Lycium barbarum* a *Robinia pseudacacia*), které vytlačují původní druhy. Je nezbytné odstraňování nepůvodních náletů a pravidelná pastva koz a ovcí (Chytrý 2010).

**Širokolisté suché trávníky** – Nezbytná je seč nebo pastva minimálně jednou za dva roky (koncem června až červenec). Při neobhospodařování dochází k přemnožení válečky prapořité (*Brachypodium pinnatum*), v dalších fázích také ovsíku vyvýšeného (*Arrhenatherum elatius*) a třtiny křovištní (*Calamagrostis epigejos*). Škodlivý je i spád atmosférického dusíku a zarůstání dřevinami, které je nutné pravidelně odstraňovat (Chytrý 2010).

**Mezofilní ovsíkové louky** – Je důležité louku jednou až dvakrát ročně kosit. Louky se vstavačem kukačkou je vhodné kosit na přelomu června a července, druhou seč provést nejpozději na koci srpna. Nedoporučuje se pastva, ani pouze oplůtky. Musí se sklízet ovsík vyvýšený (*Arrhenatherum elatius*), jinak dojde k jeho přerůstání. Dále se musí odstraňovat i nálety dřevin a keřů, které mají tendenci se chovat invazně (Jersáková et Kindlmann 2004).

**Poháňkové pastviny** – Na pastvinách se objevují luční mraveniště. Z toho důvodu se nedoporučuje seč. Hlavní je extenzivní pastva koz a ovcí, nejlépe v intervalech po třech týdnech, mimo dobu kvetení vstavačovitých rostlin. Pokud by docházelo k pastvě příliš často, mohlo by dojít k šíření nežádoucích druhů např. sedmikrásky chudobky (*Bellis perennis*) (Jersáková et Kindlmann 2004).

#### **4.1.2 Zákony a úmluvy**

K ochraně *in situ* se vztahuje i ochrana pomocí zákonů a úmluv. Vstavač kukačka je hodnocen jako silně ohrožený (§2), chráněn zákonem 114/1992 Sb. o ochraně přírody

a krajiny, stejně tak je v Červeném seznamu cévnatých rostlin ČR zařazený jako silně ohrožený druh (C1b) (Grulich et Chobot 2017). Stanoviště s výskytem vstavačovitých rostlin většinou spadají pod zvláště chráněná území s propracovanými plány péče (Anonymus 5).

Vstavač kukačka spolu s ostatními orchidejemi je chráněn těmito mezinárodními úmluvami a zákony:

- Bernská úmluva o ochraně evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť,
- Ramsarská úmluva na ochranu mokřadů
- CITES – Úmluva o mezinárodním obchodu s volně žijícími druhy živočichů a planě rostoucími druhy rostlin,
- Úmluva o ochraně biodiverzity
- Natura 2000 – soustava evropských chráněných území, vymezená ve dvou směrnících Evropských společenství: 409/EHS/79 o ochraně volně žijících ptáků a 43/EHS/92 o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (Anonymus 5).

## 4.2 Ochrana *ex situ*

Ochrana *in situ* není vždy dostačující. Zejména pokud se jedná o druh vyskytující se mimo chráněnou krajinou oblast nebo příliš malou populaci. V dnešní době se potýkáme, a především budeme potýkat, se změnou regionálního klimatu a dalších environmentálních faktorů (Anonymus 2002 ex Schaller 1993). Pokud se obavy odborníků naplní, nárůst skleníkových plynů způsobí oteplení planety, což bude mít za následek radikální změny ekosystémů (Seaton et al. 2010)

Ve výzkumu Hornemann (2012) uvádí, že u vstavače kukačky byl počet kvetoucích jedinců pozitivně ovlivněn vyššími teplotami v dubnu, naopak vyšší teploty v květnu způsobily dokonce usmrcení rozvinutých květenství. Dubnové teploty nejspíš zvýšily rychlost fotosyntézy a tím i vývoj květenství.

Vliv oteplování planety na orchideje je nejasný, ale z podstaty věci je pravděpodobné, že mnoho populací bude negativně ovlivněno a ochrana *in situ* sama o sobě nebude

stačit. Různé populace orchidejí budou reagovat odlišně. Některé mohou být lépe přizpůsobeny a vyrovnají se s budoucími globálními změnami (Seaton et al. 2010).

Jednou z možností aktivní ochrany je metoda kultivace v podmínkách *ex situ*, tedy mimo přirozené prostředí (Vejsadová 2009). Pro záchranu rostlin to jsou zejména botanické zahrady, arboreta, nebo semenné banky (Anonymus 2002 ex Schaller 1993). Skladování poskytuje nezbytnou zálohu v případě vyhynutí druhu (Meritt et al. 2014a). Na mezinárodním kongresu na ochranu orchidejí bylo rozhodnuto, že do roku 2010 bude uloženo 90 % ohrožených orchidejí v *ex situ* sbírkách. Z toho 50 % použito na budoucí obnovu (Seaton et al. 2010). Zachování materiálu v semenných bankách je hlavní strategie pro zachování biodiverzity rostlin (Merritt et al. 2014b ex Smith et al. 2011, Godefroid et al. 2011)

Většinu orchidejí lze poměrně snadno vypěstovat ze semene v umělých laboratorních podmínkách (Seaton et al. 2010 ex Seaton & Ramsay 2005). Semena se kultivují za specifických podmínek. Dříve ve skleněných nádobách, dnes spíše v plastových. Metodu nazýváme *in vitro* (VŠÚO 1). Také lze pěstovat oddělené části rostlin, **rostlinných explantátů** (orgánové, tkáňové, buněčné) (CUNI 1).

Stejně, jako jsou ohroženy malé populace v přirozeném prostředí, může dojít ke ztrátě rostlin ve sbírkách a kultivacích. Důsledkem špatných teplot, škůdců, nemoci, nebo nevhodně zvolené kultivační metody (Seaton et al. 2010).

Životnost semen se druhově velmi liší. I za ideálních podmínek může dojít ke ztrátě klíčivosti (Merritt et al. 2014b ex Walters et al. 2005, Probert et al. 2009). Aby mohly být programy na obnovu druhů a stanovišť účinné, musíme znát údaje o vlastnostech a životnosti semen při skladování. V řízeném experimentu urychlili proces stárnutí australských semen a zjišťovali jejich životaschopnost při skladování. Ze 172 studovaných semen přesáhlo 28 dobu životaschopnosti 200 dní. Hodnoty se výrazně lišily od 3 dnů po 589 dnů nejdéle přežila dřevina *Acacia colei* var. *Colei*. Při testování semen u suchozemských australských orchidejí klesla životaschopnost o 50 % mezi 0,5 – 36 dny (Hay et al. 2010).

Ukázalo se, že stromy a keře mají výrazně delší životnost než semena bylin vegetačních společenstev. Také druhy z teplejších oblastí s vyššími průměry srážek dopadly lépe, než druhy z chladných a suchých oblastí (Merritt et al. 2014b).

Materiál, který je vytvořený v podmínkách *ex situ* musí čelit při výsadbě novým selekčním a ekologickým tlakům. Obnova stanovišť vyžaduje, aby byly zvaženy genetické problémy, pokud má být genetický materiál přemístěn do přirozeného prostředí (Ensslin et al 2011). Aby se předcházelo ztrátám, je vhodný genetický screening a selekce rostlin, tím maximalizujeme potenciál obnovených populací (Merritt et al 2014b).

## 5 *IN VITRO*

*In vitro* metodu dělíme u výsevů semen orchidejí na symbiotickou a asymbiotickou. Nejstarší pokusy klíčení semen *in vitro* vznikaly na mykorrhizních houbách nalezených v přírodě ke stimulaci klíčení a vývoji. Techniky, které byly vyvinuty na počátku 20. století, vedly ke spolehlivějšímu vývinu mnoha taxonů orchidejí. Lewis Knudson v roce 1922 použil techniku dnes známou jako asymbiotické klíčení. Vysel semena na sterilní živnou půdu doplněnou sacharózou bez houbového mykobionta (Kauth et al. 2008).

### 5.1 Využití v ochraně rostlin

Programy *ex situ* jsou zásadní pro globální akce na ochranu upadající celosvětové biologické rozmanitosti (Merritt et al. 2014a). Pěstování ohrožených rostlin v laboratořích nám dává zcela novou příležitost studovat jejich působení podrobněji než kdykoliv předtím (Fay 2018). Ochrana rostlin pomocí metody *in vitro* se věnuje řada botanických zahrad z celého světa. Výzkumné týmy díky této technice mohou množit a udržovat velké množství ohrožených rostlin (Sarasan et al. 2006). Je potřeba klást důraz na botanické zahrady, podporovat množení ohrožených druhů v zemích původu s ohledem na lokalitu výskytu (Seaton et al. 2010).

V rámci podpory zachování a udržení orchidejí ve světě vznikl projekt Darwinovy iniciativy *Orchid Seed Stores for Sustainable Use* (OSSSU), která zakládá síť bank pro semena orchidejí. Jedná se o snahu zachovat maximální množství genetické diverzity na minimálním prostoru. Uchovaný materiál může být využitý pro výsadbu a na obnovu stanovišť (Seaton et al. 2010).

V České republice také probíhá ochrana *ex situ* orchidejí. Např. ve Výzkumném ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonicích. Zde kultivují *in vitro* vemeník dvoulistý (*Platanthera bifolia*) (Vejsadová 2009). Dále se zabývá *in vitro* kultivací orchidejí Katedra experimentální biologie rostlin při Univerzitě Karlově (Figura a Ponert 2017).

Kultivace *in vitro* přináší řadu výhod. Hlavní výhodou je produkce zdravého rostlinného materiálu a možnost kultivace přes celý rok bez ohledu na počasí.

Velice praktická je úspora plochy a možnost regulovat podmínky (teplota, světlo, vlhkost) pro růst rostlin (VŠÚO 1).

Přesun genetického materiálu z *in vitro* může být:

1. Reintrodukce – vysazuje se na místa, kde druh vymizel.
2. Posílení populací – zabraňuje se jeho vyhynutí.
3. Introdukce – na uměle vytvořené stanoviště, které splňuje podmínky pro daný druh (MŽP 2014).

Od *Center for Plant Conservation Best Reintroduction Practice* je při reintrodukci doporučeno řídit se podle šesti bodů – zdůvodnění, příprava, zapojení veřejnosti, implementace, péče a monitoring. Samozřejmě je důležité, zda je vysazování potřebné a oprávněné. Doporučuje se vysazování co nejvíce jedinců (minimálně 50 rostlin), odstranění nepříznivých faktorů pro druh a dostatečný prostor pro růst nadzemních i podzemních částí (Maschinski et Albrecht 2017).

Reintrodukce není na místě, pokud:

- Naruší důvod ochrany území.
- Nelze daný druh množit, nebo není k dispozici vhodné stanoviště.
- Není k dispozici vysoce kvalitní materiál.
- Daný druh (popřípadě jeho management) může ohrozit ostatní druhy v lokalitě. Může dojít k hybridizaci nebo k invazi, reintrodukovaný druh by mohl poškodit ohrožené druhy, nebo je v rozporu s jejich managementem.
- Reintrodukce není právně, administrativně, ani sociálně podporovaná. (Maschinski et Albrecht 2017).

K úspěšné reintrodukci dochází např. v pekingské botanické zahradě v Číně, kde jsou pěstovány sazenice střevíčníka velkokvětého (*Cypripedium macranthos*), a to symbiotickou i asymbiotickou formou (Seaton et al. 2010).

Záměrem reintrodukce je vytvořit soběstačné populace, což je velice náročný proces, který může trvat i desetiletí. Musí být zváženy dlouhodobé důsledky, včetně nákladů (Maschinski et Albrecht 2017).

## 5.2 Postup a potřebné vybavení

K produkci *in vitro* rostlin je potřeba mít vhodně vybavenou laboratoř. Seznam přístrojů a materiálů, které doporučuje Figura et Ponert (2017):

Přístroje:

- Ph metr.
- Autokláv.
- Pipety.
- Mikrovlnná trouba.
- *Flow box* (laminární box).
- Kultivační místnost s osvětlením a stálou teplotou.
- Chladnička.

Materiál:

- Petriho misky.
- Parafilm.
- Plastové jednorázové injekční stříkačky.
- Nylonová síť Uhelon.
- Chlorové vápno.
- Destilovaná voda.
- Autokláv.
- Uzavíratelné nádoby.
- Filtrační papír.
- Filtrační nálevka.
- Smáčedlo Tween20.
- Kyselina sírová.
- Čistý líh.
- Pinzety.
- Nůžky.
- Kahan.
- Běžné laboratorní nádobí.



Je nutné mít prostorové a technické vybavení. Prostor na přípravu médií s váhami, magnetickou míchačkou, autoklávem. Prostor na očkování (*flow box*), prostor na mytí nádob a kultivační místnost (Hradilík 1998).

Bodový postup podle Vosolsobě (2004) u asymbiotického výsevu:

1. Sběr semen.
2. Dezinfekce semen.
3. Příprava a sterilizace medií.
4. Výsev semen v aseptických podmínkách.
5. Několika měsíční kultivace *in vitro*.

### 5.3 Stavba semen a klíčení

Semena orchidejí bývají označována jako „prachová semena“, zpravidla měří méně, než 1 mm. Uvnitř semene je nedokonale vyvinuté bezděložní embryo a nepatrné, nebo velmi malé množství živin (Průša 2019). Embryo je jedinou živou částí semene, obsahuje minimální zásobu proteinů a lipidů. Semeno nemá příliš zásobních látek a chybí jakékoliv specializované zásobní pletivo (Ponert 2016). Před vnějšími vlivy je chráněno osemením, které je tenkoblané a síťnaté. Prostor mezi osemením a embryem je vyplněn vzduchem (Průša 2019).

Za ideálních podmínek dochází ke klíčení. Semeno začne přijímat vodu, začne se zvětšovat objem buněk, dokud embryo neprotrhne osemení. Ze skromných zásob živin dojde k hydrolýze proteinových tělísek, následně pak ke štěpení lipidů. V této fázi musí embryo navázat symbiózu s mykorrhizní houbou, která je nezbytná pro vyklíčení. Houbové hyfy se skrz osemení dostanou přímo do buněk živého embrya. Jsou obaleny rostlinou membránou, takže se nedostávají do styku s cytoplazmou rostliny. Houbové hyfy uvnitř buněk embrya vytváří peletony. Mezi peletony a rostlinou membránou tak může docházet k přenosu potřebných látek (Ponert 2016). Díky tomu embryo může pokračovat ve vývinu. Nejdříve začne vyrůstat protokorm – jedná se o zvětšující oválný útvar. Někdy je kulovitý, vejčitý, nebo jinak zdeformovaný (Ponert 2016). Dělivá pletiva začnou vytvářet rhizoidy. V horní části postupně vyrůstá prýt nad povrch půdy, vyvíjí se děloha ve tvaru dutého ouška, kde raší první list. Původní protokorm se přemění v kořenovou hlízkou (Průša 2005).

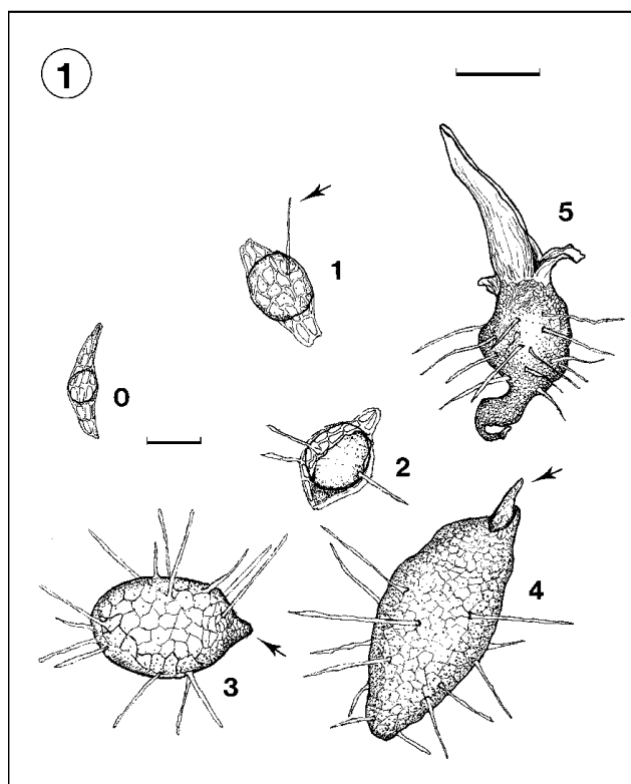
### **Podmínky klíčivosti**

V *in vitro* podmínkách je důležité vytvořit vhodné prostředí pro klíčení terestrických orchidejí (Rasmussen 1995). Sesbírané plody se zralými semeny by měly být uloženy nejlépe v papírovém sáčku v suchém prostředí (Figura et Ponert 2017). Při dlouhodobém skladování (max. jeden rok), je dobré semena uchovávat v chladu (5-14 °C) (Vosolsobě 2004; Figura et Ponert 2017). Semena většiny druhů orchidejí jsou odolná vůči vysychání, jsou tedy vhodná ke skladování při nízkých teplotách (Merritt et al. 2014a).

Pokud se chystáme na výsev v laboratoři, mohl by nastat problém s dormancí semen. Morfologicky se jedná o ne zcela vyvinuté embryo v době šíření semen. Klíčení započne až v kritické velikosti embrya. Semena v období dormance nepřijímají vodu, vnější stěny buněk jsou tvrdé a pokryté lipidovou kutikulou (Jevšnik et Luthar 2015). Narušit dormanci lze určitými světelnými či teplotními režimy, dlouhodobým smáčením, stratifikací (chemické narušení osemení, skarifikace), popřípadě chemickými signály od mykorrhizní houby (Rasmussen 1995).

### **Fáze klíčivosti (Obr. 5)**

- 0** – neklíčící semeno
- 1** – nabobtnané semeno (=klíčící)
- 2** – zvětšené embryo, prasknuté osemení
- 3** – vznikají protomeristémy
- 4** - prodloužení protomeristému, vznik pravého listu
- 5** – prodloužení prvního listu
- 6** – náznak druhého listu



Obrázek 5: Fáze kličivosti (Stewart et Zettler 2002)

(Kauth et al. 2008 ex Stenberg and Kane 1998, Stewart and Zettler 2002)

#### 5.4 Sterilizace a stratifikace

Prvním krokem k úspěšné kultivaci je zajištění sterility po celý průběh kultivace. Je nezbytné sterilizovat veškeré laboratorní náčiní a materiál včetně semen (Kováč 1992). Je potřeba vzít na vědomí, že na rostlinách žije velké množství mikroorganismů, a to nejen na povrchu. Pokud semena neprojdou chemickou sterilizací, tyto mikroorganismy způsobí kontaminaci celého pokusu (Hradilík 2005).

Běžně se dezinfekce semen provádí mícháním dezinfekčního roztoku se semeny (Jevšnik et Luthar 2015). Roztoky, které se používají nesmí narušit rostlinný materiál a musí ničit plísňe a bakterie (Kováč 1992). Dezinfekci semen a stratifikaci můžeme spojit v jeden krok (Malmgren 1996). Používá se chlornan vápenatý a chlornan sodný (alternativně peroxid vodíku) (Vejsadová 2006). Pomocí těchto látek se odplaví endogenní inhibitor kličivosti (kyselina abscisová), uvolní se suberinová bariera embrya a poté se naruší povrch semene a to následně může začít přijímat vodu (Rasmussen 1995).

Vejsadová (2006) ve své studii aplikovala dvě sterilizační látky 7,2 % Ca(OCl)<sub>2</sub> a 0,5 % NaOCl samostatně, nebo s přidáním etanolu (70 %). Chloran vápenatý významně stimuloval tvorbu protokormů u všech druhů. Chloran sodný embrya poškodil a klíčivost byla významně nižší. Ponert et al. (2011) dosahovali negativních výsledků při použití chloranu sodného u prstnatce Fuchsova (*Dactylorhiza fuchsii*) a prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*). Ale u vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) se osvědčilo použití chloranu sodného. Při aplikaci po dobu 15 minut dosáhli 75±16 % vyklíčených semen.

Samotnou sterilizaci předchází předošetření, většinou 70% etanolem, který odstraní část ochranného vosku z povrchu semene. Delší aplikace etanolem může semena poškodit až zabít. U vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) se prokázaly 2 minuty jako optimální (Ponert et al. 2011).

Po předošetření následuje oplach destilovanou vodou. Po těchto krocích následuje sterilizace (dezinfekce) a stratifikace. Menší množství semen a roztok 2,5–5% chlornanu se nasaje do injekční stříkačky. Doba působení chemického roztoku se liší druh od druhu. Ideálně se čeká, dokud se hnědé semeno nezbarví do barvy „slonovinové kosti“. Roztoky by se měly připravit těsně před použitím, také je vhodné roztok během procesu párkrát vyměnit. Aby semena neunikla, vloží se mezi roztok a jehlu nylonová látka (Ponert et al. 2011).

Existují různé postupy povrchové sterilizace (dezinfekce). Dulić et al. (2019) použil 7% chloran vápenatý s přidáním 0,1 % Tween® 20, semena byla dále třikrát opláchnuta destilovanou vodou a poté sterilizována v digestoři s laminárním prouděním se 70% ethanolem po dobu dvou minut. Kauth et al. (2006) popisuje povrchovou sterilizaci semen v 0,33% chloranu sodném a 5% ethanolu. Následně byla semena třikrát opláchnuta ve sterilní destilované a deionizované vodě vždy po dobu dvou minut. Semena klíčila na různých mediích s rozdílnou fotoperiodou. S nejlepším výsledkem 45 % vyklíčených semen na médiu Knudson C za úplné tmy. Stewart et Kane (2006) také použili kombinaci chloranu sodného (6 %) a ethanolu (100 %). Používá se i tzv. studená stratifikace (uložení semen do chladu na několik týdnů), která se používá převážně u obtížně klíčících rodů, jako střevíčník (*Cypripedium*), kruštík (*Epipactis*) a prstnatec (*Dactylorhiza*) (Rasmussen 1995).

## 5.5 Složení živných médií

Dezinfekce a chemické složení médií jsou dva nejdůležitější faktory při klíčení orchidejí mírného pásu (Jevšnik et Luthar 2015). Základem kultivačních médií je voda, anorganické a organické látky. U asymbiotického výsevu je vhodné použít komplexní organické sloučeniny s obsahem vitamínů, aminokyselin a růstových regulátorů (Rasmussen 1995).

Rostlinné druhy mají velmi odlišné požadavky na množení v podmínkách *in vitro*, z toho důvodu existuje široké množství kultivačních médií s odlišným složením (Sarasan et al. 2006). BM média a jeho další varianty např. BM-1 (Dowling et Jusaitis 2012 ex van Waes et Debergh, 1986). Médium Vacin a Went, Knudsonovo C medium, Malmgrenovo medium pro orchideje a mnoho dalších (Kauth et al. 2008 ex Vacin et Went 1949, Knudson 1946, Malmgren 1996).

Ve studii Dowling et Jusaitis (2012) bylo použito 6 kultivačních médií (BM-1, Malmgren, 1/2MS Pa5, P723, W3) při asymbiotickém klíčení semen 4 australských, suchozemských druhů orchidejí. Semena všech druhů vyklíčila na každém mediu. Procento klíčivosti a další vývoj se druhově lišil.

Nejlépe v tomto experimentu dopadlo medium BM-1, konzistentně podporovalo klíčení i další vývoj protokormů u všech zkoumaných orchidejí. Stejně dobře si u jednotlivých druhů vedla media P723, Malmgren a W3, ale nevykazovala stejnou konzistenci u všech druhů.

Přehled klíčivosti:

1. *Pterostylis nutans*– BM-1 (90,7 %), P723 (91,2 %) a Malmgren (85 %).
2. *Microtis arenaria* – BM-1 (99,2 %), Malmgren (95,6 %), 1/2MS (97,5 %) a Pa5 (97,5 %)
3. *Thelymitra pauciflora* – BM-1 (60,9 %), 1/2MS (49 %) a Pa5 (54,1 %).
4. *Prasophyllum pruinosum* – BM-1 (73 %), Malmgren (64,6 %), 1/2 MS (57,6 %), Pa5 (62,1 %), P723 (65,5 %).

(Dowling et Jusaitis 2012)

### 5.5.1 Anorganické látky

Mezi anorganické látky řadíme **makroelementy** (dusík, fosfor, vápník, draslík, hořčík, síra) a **mikroelementy** (železo, mangan, zinek, bor, měď, molybden) (Kováč 1992). Přehled použitých látek v médiích pro klíčení semen orchidejí a jejich koncentrací je znázorněno v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1: Přehled makroelementů v komerčních médiích

<b><u>Makroelementy</u></b> <b>(mM)</b>	<b>KC</b>	<b>MM</b>	<b>P723</b>	<b>1/2MS</b>	<b>VW</b>	<b>BM-1</b>
<b>Amonium</b>	13,82	-	5,15	10,31	7,57	-
<b>Vápník</b>	2,12	0,24	0,75	1,50	1,93	-
<b>Chlor</b>	3,35	-	1,50	1,50	-	0,0021
<b>Hořčík</b>	1,01	0,81	0,62	0,75	1,01	0,83
<b>Dusičnan</b>	10,49	-	9,85	19,70	5,19	-
<b>Draslík</b>	5,19	0,55	5,01	10,02	7,03	2,20
<b>Fosfát</b>	1,84	0,71	0,31	0,63	3,13	2,20
<b>Síran</b>	4,91	0,92	0,71	0,86	4,92	1,10
<b>Sodík</b>	-	0,20	0,10	1,51	0,20	0,20

(Kauth et al. 2008; Dutra et al. 2008)

Tabulka 2: Přehled mikroelementů v komerčních médiích

<b><u>Mikroelementy</u></b> <b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>KC</b>	<b>MM</b>	<b>P723</b>	<b>1/2MS</b>	<b>VW</b>	<b>BM-1</b>
<b>Bor</b>	-	-	30	50	-	161,7
<b>Kobalt</b>	-	-	0,03	0,11	-	0,105
<b>Měď</b>	-	-	0,03	0,10	-	0,10
<b>Železo</b>	90	100	50	50	100	100,2
<b>Jod</b>	-	-	1,20	2,50	-	-
<b>Mangan</b>	30	10	30	37,90	30	147,9
<b>Molybden</b>	-	-	26	0,52	-	1,03
<b>Zinek</b>	-	-	9,20	30,00	-	34,8

(Kauth et al. 2008; Dutra et al 2008)

**Dusík** je potřeba pro tvorbu vegetačních orgánů. V médiích se vyskytuje ve formě nitrátové a amonných solí. Některá média obsahují anorganický dusík, například směs Knudson C (1949) a Vacin a Went (1949) (Kauth et al. 2008). Může být dodáván jako dusičnan draselný, nebo dusičnan amonný, v koncentraci 25-60 mM (Kováč 1992). Nebo mohou obsahovat organickou formu dusíku. Do médií se dostává například pomocí aminokyselin. Koncentrace v médiu by se měla pohybovat kolem 25-40 mM u nitrátu, u amonia kolem 2-20 mM (Kováč 1992). Výzkumníci se domnívají, že dusík ve formě aminokyselin je pro semena, či protokormy snadněji dostupný než v případě anorganického dusíku (Kauth et al. 2008).

Organický dusík obsahuje například BM medium (Dowling et Jusaitis 2012 ex van Waes & Debergh, 1986b), nebo P723. Zdroj dusíku v P723 je pepton. Ve studii Kauth et al. (2008) prokázali, že klíčení semen střevočnickovce význačného (*Paphiopedilum insigne*) a *P. hirsutissimum* za použití média s peptonem stoupla cca o 30 %.

Stewart et Kane (2006) zaznamenali pozitivní výsledky klíčení a vývoj následný rozvoj *Habenaria macroceratitis* na mediu Malmgren s nízkým obsahem minerálních solí s glycinem jako jediným zdrojem dusíku. Dutra et al. (2008) u *Bletia purpurea* použili média s organickým dusíkem, anorganickým i kombinací obou. Neprokázal se významný vliv na klíčení.

Při asymbiotickém výsevu za použití směsi Knudson C (1949) Kauth et al. (2006) pozorovali vysokou klíčivost *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* a *Calopogon tuberosus*. Tento pozitivní výsledek je připisován vysokému obsahu amonia, které semena mohou využít během klíčení i vývoje. Přesto, že zde byl výsledek pozitivní u jiných suchozemských druhů může způsobit amonium inhibici. Například Dijk et Eck (1995) upozorovali omezené klíčení prstnatce pleťového (*Dactylorhiza incarnata*) nejspíše kvůli přítomnosti amonia.

Dulić et al. (2019) ve studii použili na druhy švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis* (L.)) a jazýček východní (*Himantoglossum jankae*) dvě média s odlišnou formou dusíku. Výsledky ukázaly, že médium Malmgren s dusíkem ve formě aminokyselin (glycin, hydrolyzát kasein) doplněné o pepton a kokosovou vodu poskytlo nejpříznivější podmínky pro asymbiotické klíčení a další vývoj jazýčka východního (*H. jankae*). Tento druh nebyl schopný vyklíčit na mediu Knudson C s obsahem anorganického

dusíku ani v případě dodání organických doplňků. Můžeme tedy předpokládat, že u jazyčka východního (*H. jankae*) způsobuje anorganická forma dusíku inhibici asymbiotického klíčení. Není to však pravidlem, na švihlík krutiklas (*S. spiralis*) působilo medium Knudson C s anorganickou formou dusíku kladně, druh klíčil rychleji, což je nejspíš způsobeno vysokým poměrem amonia k dusičnanům.

Pokud má rostlina nedostatek dusíku je zakrslá, předčasně kvete a stárne. Stonek je slabý a růst listů zpomalený (Kincl et Krpeš 2000).

**Fosfor** v rostlinách se nachází v nukleotidech buněčného jádra, cytoplazmě a buněčných strukturách. Hlavní funkce spočívá v přenosu energie (Kováč 1991). Dělí a vytváří dělivá pletiva, při nedostatku fosforu se zpomaluje růst nových buněk (Kincl et Krpeš 2000). Rostlinou je přijímán jako ortofosfátový aniont, vstupuje jako  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  nebo  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Kováč 1991).

**Vápník** pomáhá zpevňovat buněčné stěny, reguluje hydrataci, neutralizuje kyselinu šťavelovou, podílí se na katalytických procesech v buňkách. Při nedostatku se celkový růst rostliny viditelně zpomaluje, až nakonec uhynie (Kincl et Krpeš 2000).

**Draslík** aktivuje enzymy a pomáhá s hydratací buněk. Při nedostatku odumírají listy, příznakem je okrajová nekróza čepelí listů. Kořenový systém je málo odolný proti hnilobě (Kincl et Krpeš 2000).

**Síra** se hromadí v listech a semenech (Kincl et Krpeš, 2000). Je rostlinou přijímaná z minerálních sloučenin ve formě  $\text{SO}_4^{2-}$ . (Kováč 1991).

**Sacharidy** jsou zdrojem energie, klíčící semena orchidejí je získávají na přirozených stanovištích z embrya a mykorrhizních hub (Rasmussen 1995). V asymbiotickém výsevu se používají rozpustné sacharidy, které semeno může přímo vstřebat. Koncentrace v živném mediu by měla být kolem 2–3 % (Kováč 1992).

Sacharóza se nejčastěji používá jako zdroj uhlíku a energie. Často se také používá glukóza či fruktóza (Kováč 1992). Ponert et al (2011) u prstnatce májového (*Dactylorhiza majalis*) pozorovali velmi dobrý růst na mediu s kombinací glukózy a fruktózy a na mediích s obsahem sacharózy.



Používá se i laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza a škrob (Kováč 1992). Podle Kováče (1992) jsou tyto zdroje méně efektní oproti sacharóze a glukóze. Různé formy sacharidů testoval Bozdemir et al (2018) ve své studii o rudohlávkou svatém (*Orchis sancta L.*), kdy přidali do kultivačních medií galaktózu, glukózu, maltózu, fruktózu a sacharózu v množství 20, 40, 60, 80 a 100 g/l. Nejvyšší průměrná 77,85 % klíčivost vyšla s maltózou 40 g/l, nejnižší s galaktózou 100 g/l 44,36 %.

Z **vitamínů** se nejběžněji v mediích nachází skupina vitamínů B. Hlavně thiamin, proxiodoxin a niacin. Thiamin je nepostradatelný pro růst tkáňových kultur objevuje se tak ve většině mediích (Kováč 1992).

Někdy se používají v mediích i další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin (Kováč 1992).

**Fytohormony** fungují jako růstové regulátory a zároveň kontrolují vývoj rostliny.

Nejčastěji se do media přidávají cytokininy, často podporují buněčné dělení i podporu adventních pupenů, a auxiny, stimulují prodlužovací růst buněk, rostlinných orgánů a kořenů (Rasmussen 1995). V médiích se může nacházet syntetický kinetin (KIN) a benzyladenin (BA). Z přirozeně vyskytujících se zeatin, nebo isopentenyladenin (2iP). Z auxinů přirozeně vyskytujících se kyselina indol-3-octová (IAA), nebo běžněji užívaná syntetická kyselina 1-naftyloctová (NAA), kyselina indol-3-másečná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) (Kováč 1992).

Miyoshi a Mii (1995) u druhu *Calanthe discolor* nezaznamenali významné zlepšení či zhoršení klíčivosti za přítomnosti různých koncentrací BA, NAA a ethephonu. K mírnému zlepšení došlo u vývoje protokormů za přítomnosti vyšších koncentrací NAA a ethephonu. U *Calathe tricarinata* stimulovalo klíčení NAA i BA, ale BA se ukázalo jako účinnější (Godo et al. 2010).

V mediích má nižší koncentrace cytokininů lepší vliv na klíčení než vyšší koncentrace (Kauth et al. 2008). Vejsadová (2009) uvádí, že u ohroženého vemeníka dvoulistého (*Platanthera bifolia*) se osvědčila aplikace kinetinu (KIN). Za přítomnosti auxinů (NAA a IAA) byl zjištěn růstově-stimulační vliv. Pozitivní výsledek zaznamenali i Stewart et Kane (2006) u klíčení *Habenaria macroceratiti*, nižší koncentrace (1  $\mu$ M)

kinetinu a zeatinu zvýšila procento klíčivosti oproti vyšší koncentraci (3 a 10  $\mu\text{M}$ ) zeatinu, kinetinu, 2-iP, BA.

**Zpevňující látky** ukotvují semena v mediu. Nejčastěji se využívá agar, který má želírovací schopnosti. Stává se tekutinou při teplotě nad 45 °C a při ochlazení tuhne. Vytvořený gel je tedy stabilní při teplotě používané ke kultivaci (Kováč 1992).

Lze použít ke zpevnění media také akariózu, Phytigel a Gerlit. Phytigel i Gerlit jsou rychleschnoucí a vytváří velmi čirý gel (Kováč 1992).

Do media může být přidáno **aktivní uhlí**, které dokáže adsorbovat toxické látky, které inhibují růst. Zároveň může navázat i růstové regulátory. To může negativně ovlivnit výsledky výsevu. Může navázat BA, NAA, kinetin, IAA nebo 2iP (Kováč 1992). Koene et al. (2019) *Acianthera prolifera* doplnil media o aktivní uhlí, která následně vykazovaly lepší výsledky klíčivosti semen než bez aktivního uhlí.

Do médií lze pro podporu růstu rostlinných pletiv přidat i **další organické látky**, nejčastěji se používá protein (kasein) hydrolyzát a kokosové mléko (Kováč 1992).

### 5.5.2 Abiotické faktory

**Teplota** se u klíčení dlouho nepovažovala za důležitou a byla vybíraná náhodně. Baskin et al. (2006) doporučovali střídání teplot stejně jako je tomu v přirozeném prostředí. Ponert et al (2011) uvedli, že pěstování orchidejí při doporučené teplotě 25 °C nevedlo k úspěchu. Z toho důvodu pracovali s nižšími teplotami okolo 17 °C. Horších výsledků při teplotě kultivace 25 °C dosáhli ve své studii i Godo et al. (2010) u *Calanthe tricarinata*, klíčivost dosahovala pouze 28 %. Jako optimální se ukázala kultivační teplota 20 °C, při které klíčivost dosáhla až 60 %. Teploty, které semenu daného druhu nevyhovují (příliš vysoké či nízké), mohou způsobit dormanci, takže semeno nevyklíčí (Rasmussen, 1995).

Reakce druhů na **fotoperiodu** se liší. Je všeobecný názor, že ke klíčení epifytické druhy potřebují světlo, zatímco suchozemské druhy potřebují tmu (Kauth et al. 2008).

Kauth et al. (2008) zmiňuje výsledky studie od van Waes a Debergh (1986) kde zjistili, že i zvýšení světla na 1,2  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  z úplné tmy snížilo klíčivost u několika

suchozemských orchidejí. Přesto je důležité fotoperiodu druhově specifikovat a zjistit podmínky ve kterých se daný druh přirozeně nachází (Kauth et al. 2008).

Dulić et al. (2019) pozorovali silnou druhovou specifikaci na osvětlení. Kultivace druhu jazýček východní (*Himantoglossum jankae*) v úplné tmě měla pozitivní vliv na tvorbu výhonků, rhizoidů a další vývoj. Na druhou stranu režim 16/8 S/T více vyhovoval vývoji druhu švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis* L.). Druh vyklíčil i za úplné tmy, ale zmíněný světelný režim způsobil rychlejší klíčení. To je nejspíš dáno tím, že druh v přirozeném prostředí roste v nezastíněných podmínkách (Jacquemyn et Hutching 2010).

**Hodnota pH** by se měla pohybovat v rozmezí 5,0-6,5 (Kováč 1992). Pro *Cypripedium macranthos* bylo nejvýhodnější pH 5.5-5.6, než rozmezí pH 4.9-5.5, nebo 6.1-7.7. (Zeng et al 2013). Hodnoty se upravují hydroxidem draselným, popřípadě kyselinou chlorovodíkovou (Kováč 1992). Kauth et al. (2006) použil hydroxid draselný na úpravu pH před přidáním zpevňující látky. Hodnotu upravil na 5,7 u druhu *Calopogon tuberosus*.

## 5.6 Příprava média

Základem je zajištění sterility po celou dobu kultivace. Kromě semen je nutné sterilizovat veškeré skleněné i kovové nástroje. Vodu je nutné používat demineralizovanou. Nelze použít vodovodní vodu (Kováč 1992).

Při používání komerčních médií stačí navázat médium. Smíchat potřebné množství s vodou, média by měla být 10x-100x koncentrovaná. Mohou být dodány i další komponenty (např. regulátory růstu, zpevňující látky) (Kováč 1992). Zpevňující látka agar se musí nechat rozvařit spolu s destilovanou vodou. Po smíchání všech potřebných látek se upraví pH (Hradilík 1998). Hotový roztok by měl být v kultivačních baňkách označené nápisem s datem a informacemi o obsahu (Hradilík 1998, Kováč 1992).

Následně by měla proběhnout sterilizace médií, probíhá horkou párou za zvýšeného tlaku v autoklávu. Délka autoklávování se odvíjí od objemu namíchaného média

(Kováč 1992). Dokud se médium nepoužije, mělo by být uložené na chladném a temném místě (Hradilík 1998).

Očkování by mělo probíhat ve *flow boxu* (laminární box). Box je vybaven filtry, které sterilizují vzduch. Před činností je vhodné si umýt ruce mýdlem a dezinfekčním roztokem (Kováč 1992). V boxu by mělo být minimum věcí, aby nebránily proudění vzduchu. Petriho misky s médiem, do kterých se očkují semena, by měly být otevřené jen na nutnou dobu (Kováč 1992).

## 6 Metodika

Asymbiotický výsev semen vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) probíhal v roce 2020 v In vitro laboratoři FLD ČZU na Trubech u Kostelce nad Černými lesy. Laboratoř poskytovala veškeré potřebné vybavení a kultivační podmínky. První výsevy se uskutečnily v srpnu zmíněného roku.

Výsev semen vstavače kukačky byl součástí projektu IGA FLD ČZU, kdy se vysévalo více druhů orchidejí, např. vstavač nachový (*Orchis purpurea*) a Švihlík krutiklas (*Spiranthes spiralis*) Postup kultivace se odvíjí od zmíněného projektu, konzultace s vedoucím práce a literární řešerše.

### 6.1 Sběr a skladování semen

Zralé plody vstavače kukačky (*Anacamptis morio*) pocházely z oblasti Šumavy z lokality NPP Pastviště u Fínů. Tobolky byly sbírány v červnu v roce 2020, následně skladovány v laboratoři v papírových sáčcích při pokojové teplotě po dobu dvou týdnů. Následně do výsevu byly skladovány v chladničce při teplotě 4 °C.

### 6.2 Rozdílné fitness

Správný postup kultivace není jediným rozhodujícím faktorem o úspěchu při klíčení. U metody *in vitro*, jak už bylo zmíněno, lze posuzovat životaschopnost populace a studovat daný druh mnohem detailněji. Je několik faktorů, které ovlivňují budoucnost populace daného druhu. Jedním z nich je charakteristika jedinců.

Ve studii bylo použito 10 rostlin s rozdílnou výškou, počtem květů a počtem tobolek (Tab č. 3).

Tabulka 3: Fitness jedinců

Fitness (podle výšky)	Číslo jedince	Výška rostliny (cm)	Počet květů	Počet tobolek
<b>1</b> (od 15 cm)	7	19,5	12	6
	9	22,5	8	4
	10	16	8	1
<b>2</b> (od 12 do 14,5 cm)	3	12	8	6
	4	14,5	6	5
	5	13,5	6	3
	8	12,5	11	5
<b>3</b> (do 11,5 cm)	2	11,5	7	2
	6	10	6	2
	1	11	5	2

### 6.3 Sterilizace a stratifikace semen

Plody byly vyjmuty v srpnu roku 2020 z papírových sáčků. Rozříznuty skalpelem a z tobolek byly opatrně vytřepána všechna semena (viz. přílohy – obr. 7). Semena z jedné tobolek byla vložena do plastové, injekční stříkačky (5 ml). Mezi ústí stříkačky a jehlu (1,2) byl vložen filtr (0,042 mm), aby semena neunikla (viz. přílohy – obr. 8 a 9).

Nejdříve bylo aplikováno předošetření. Postup probíhal podle výzkumu, který prováděl Ponert et al (2011) u vstavače kukačky (*Anacamptis morio*). Pomocí chloranu sodného dosahovali u vstavače kukačky vysokého procenta vyklíčených semen.

1. K semenům byl nasát 70 % líh po dobu 2 minut.
2. Po uplynulé době byla semena 3x propláchnutá sterilní destilovanou vodou ve stejné injekční stříkačce.
3. Následovala stratifikace ve 20% Savu, které obsahuje chloran sodný. Stratifikace trvala 8 minut. Savo bylo zředěné s destilovanou vodou. Po sterilizaci a stratifikaci semena dosáhla požadované barvy slonovinové kosti.

- Následně byla semena propláchnuta 3x sterilní destilovanou vodou. Pro přímé vyšetí semen byla do injekční stříkačky nasáta (4 nasátí) sterilní destilovaná voda.

#### 6.4 Příprava médií

Ke kultivaci byly zvoleny tři typy médií (Tab. č. 4).

Tabulka 4: Složení médií

Přehled	
<b>Médium 4</b>	BM-1
<b>Médium 5</b>	BM-1+kinetin (1 mg.l <sup>-1</sup> )
<b>Médium 6</b>	BM-1+černé uhlí (0,5 g.l <sup>-1</sup> )

Postup přípravy médií:

- Základem pro všechna média bylo komerční médium **BM-1** (van Waes a Debergh 1986) od HiMedia Laboratories, Indie. Na jedno médium o konečném objemu 0,4 l bylo naváženo 8,476 g směsi BM-1. Přidáno 0,4 g **MES (Duchefa)** a 0,2 l **vody**. Vše bylo umístěno do autoklávovatelné láhve o objemu 0,5 l (Duran).
- První médium (č. 4)** bylo složeno pouze ze základních látek, které jsou jmenovány výše. Do **druhého média (č. 5)** byl přidán cytokinin kinetin (Sigma-Aldrich) v množství 1 mg.l<sup>-1</sup>. Na 0,4 l živného roztoku byly pomocí pipety přidány 4 ml zásobního roztoku kinetinu (zásobní roztok kinetinu obsahoval 1mg kinetinu na 10 ml demineralizované vody). K **třetímu médiu (č. 6)** bylo přidáno 0,2 g černého uhlí (Sigma-Aldrich) na 0,4 l živného roztoku (0,5 g.l<sup>-1</sup>).
- Objem v lahvi byl doplněn na 0,4 l demineralizovanou vodou
- K důkladnému rozpuštění látek bylo použito magnetické míchadlo. V nádobě bylo naměřeno pH, pH metrem. Pomocí 1M roztoku hydroxidu draselného (KOH) a 1M roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl) se hodnota upravila na hodnotu 5,5-5,6.
- Jako zpevňující látka byl zvolen Gerlit (Sigma-Aldrich), kdy byl přidán v množství 2 g na 0,4 l živného média.

6. Lahve s živnými médii byly popsány, aby bylo zřejmé, co nádoba obsahuje. Všechna média (viz. přílohy - obr. 10) byla vložena s pootevřenými víčky do **autoklávu** ke sterilizaci. Sterilizace probíhala při 121°C po dobu 15 minut.
7. Po zchladnutí médií na cca 40 °C a po sterilizaci byly láhve vyndány do zapnutého *flow boxu* (zapnutý minimálně 15 minut před samotnou prací) (viz. přílohy – obr. 6). Do *flow boxu* se umístily sterilní plastové Petriho misky (průměr 9 cm) v plastovém obalu. Obal byl roztržen a Petriho misky z obalu vyndány a položeny na pracovní plochu *flow boxu*. Postupně z láhve bylo rozléváno potřebné množství (15 ml) živného média do jednotlivých Petriho misek (viz. přílohy – obr. 11). Ve *flow boxu* zůstaly uzavřené Petriho misky s živným médiem až do doby, než médium ztuhlo (2-3 hodiny). Poté byly misky uloženy do mikrotenových sáčků, uzavřeny a uloženy v temnu při pokojové teplotě do dalšího použití.

## 6.5 Výsevy semen

Výsev semen probíhal ve *flow boxu*. Zhruba 15 minut před prací se *flow box* zapnul a pracovní deska byla ošetřena 70% lihem. Tím se snížila pravděpodobnost kontaminace.

1. Injekční stříkačka se semeny (semena po sterilizaci a stratifikaci) a sterilní demineralizovanou vodou byla umístěna do *flow boxu*. Nylonová tkanina, která bránila úniku semen byla odstraněna, aby měla semena volný průchod. Původní jehla 1,2 mm byla nahrazena větší jehlou 1,6 mm, pro lepší vyprázdnění obsahu stříkačky.
2. Do prostoru *flow boxu* byly umístěny Petriho misky s živným médiem.
3. Semena z každé rostliny v injekční stříkačce byla vyseta na každé ze tří médií ve dvou opakováních (viz. přílohy – obr. 12). Dohromady tedy 60 ks naočkovaných Petriho misek (10 rostlin x 3 živná média x 2 opakování = 60 ks Petriho misek).
4. Aby nedošlo k sekundární infekci při kultivaci, byly Petriho misky zalepeny po celém obvodu proužkem fólie Parafilm M (Brand).
5. Každé víčko Petriho misky bylo popsáno – název rostliny, číslo živného média a datum výsevu. Takto připravené Petriho misky byly uloženy v kultivačním boxu



## 6.6 Kultivace – podmínky a pozorování

Kultivace vysetých semen v Petriho miskách probíhala v kultivačních boxech (Inkubátor Q-Cell 200/40, Pol-Lab, Polsko) ve tmě a při teplotě  $20 \pm 0,4^\circ\text{C}$  (viz. přílohy – obr. 14). V pravidelných intervalech (14 dní) byly kultury kontrolovány, zda se nevyskytuje v Petriho miskách kontaminace semen. Také byl sledován stav semen, zda již neklíčí.

U většiny jedinců nastalo klíčení po 12–14 týdnech po nasetí semen na Petriho misky. Misky s naklíčenými semeny byly umístěny pod binolupu (Olympus SZ40) a počítány jednotlivá semena – nevyklíčená (životaschopná a neživotaschopná) a vyklíčená s protokormem (viz. přílohy – obr. 13.). Vždy se počítalo do 100 ks semen po třech opakováních na jednu Petriho misku (tzn. celkem 300 ks semen na jednu Petriho misku s vysetými semeny, na 600 ks semen na jednu variantu média a jedince, 1800 ks semen na 3 varianty média a 1 jedince a 18 000 ks semen celkově za všechny média s opakováním a 10 jedinců).

Semena v papírových sáčcích před výsevem na živná média – byla umístěna pod binolupu (Olympus SZ40) na filtrační papír a postupně byla počítána semena normální (životaschopná, plně vyvinutá) a abnormální (neživotaschopná, nevyvinutá) do 100 ks na jedno pozorování. Na jednoho jedince byla semena počítána 4x.

## 6.7 Statistika

- **Vliv složení médií na klíčení.**

K porovnání úspěšnosti médií byla použita analýza rozptylu (ANOVA) a byla vyhodnocena na 5% hladině významnosti. U statisticky významných rozdílů byl aplikován Tuckeyho post hoc test (opět vyhodnocen na 5% hladině významnosti), který zjišťoval mezi jakými médii se počet protokormů liší. Celá tabulka viz. přílohy – tab. 12.

Metoda analýzy rozptylu (ANOVA) (vyhodnocen na 5% hladině významnosti) a Tuckeyho post hoc test (vyhodnocen na 5% hladině významnosti) byl aplikován i na celkové porovnání médií v počtu protokormů u všech rostlin dohromady. Celá tabulka

viz. přílohy – tab. 13. Konkrétní počty protokormů a ANOVA pro každou rostlinu viz. přílohy – tabulky 14. až 33.

- **Vliv fitness na klíčení.**

Vliv fitness nebyl hodnocen žádnou statistickou metodou. Výsledky vyplývají z tabulek, grafů a procentuální úspěšnosti. Pro ověření byla vytvořena korelační matice, která vyjadřuje vztah mezi průměrným počtem protokormů, výškou, počtem květů a počtem tobolek.

## 7 Výsledky

### 7.1 Vliv složení médií na klíčení

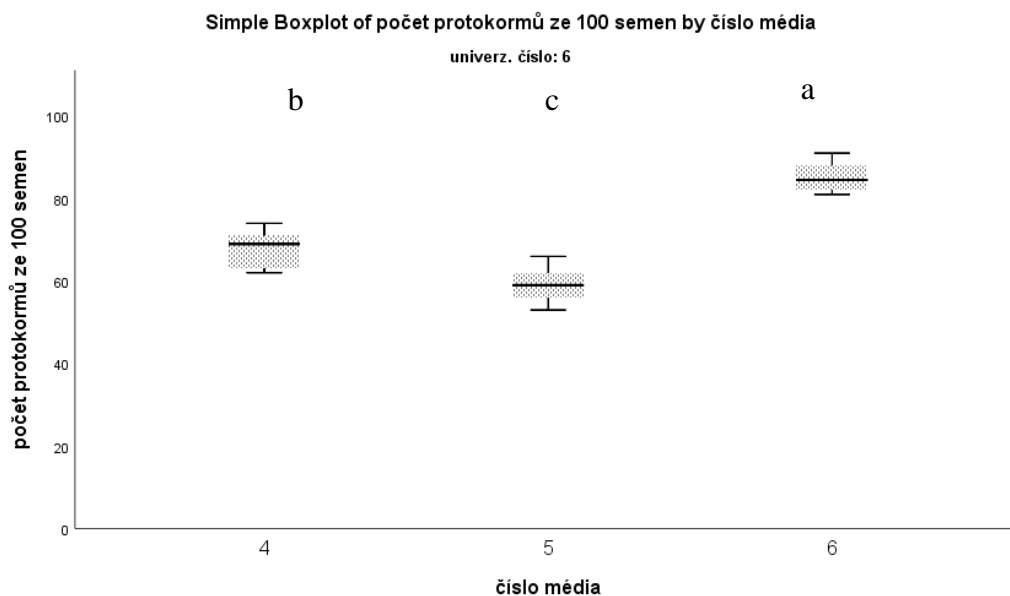
Vliv složení média na počet vytvořených protokormů zobrazuje tabulka č. 5. V prvním sloupci médium 4 s médiem 5, ve druhém médium 4 s médiem 6 a ve třetím médium 5 s médiem 6. U většiny rostlin se významně (signifikantně) mění počet vytvořených protokormů podle média (p-hodnoty <0,05).

Tabulka 5: Porovnání jedinců na médiích.

Číslo jedince	p-hodnota Tuckey post hoc test		
	Média 4-5	Média 4-6	Média 5-6
1	0,326	0,000	0,000
2	0,010	0,001	0,000
3	0,027	0,400	0,283
4	0,034	0,000	0,000
5	0,000	0,507	0,000
6	0,008	0,000	0,000
7	0,000	0,000	0,024
8	0,044	0,000	0,000
9	0,013	0,001	0,312
10	0,002	0,000	0,000

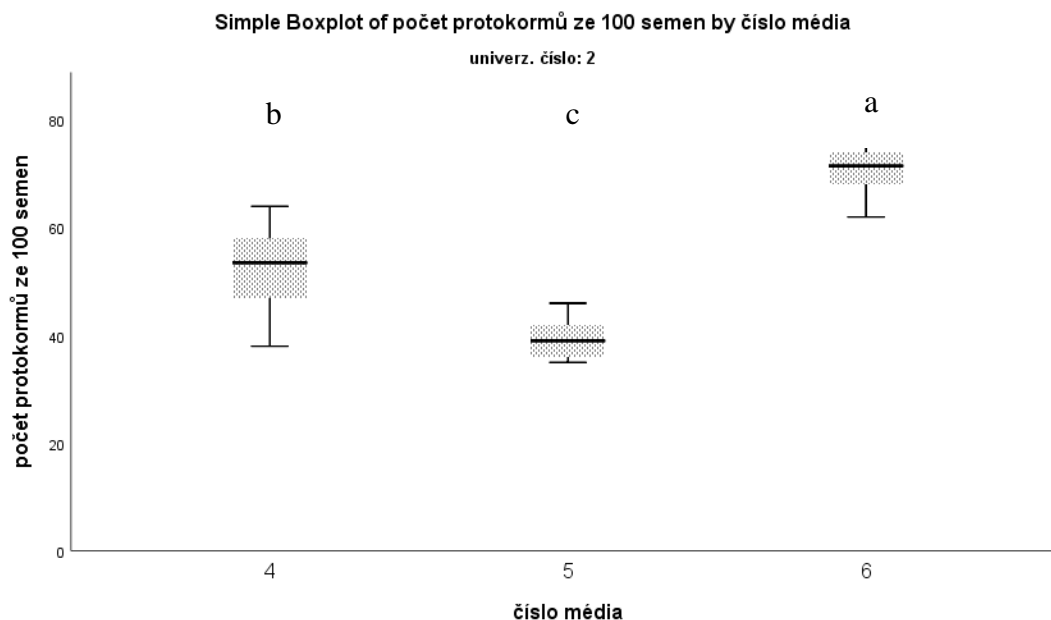
U porovnání médií 4-5 se počet vyklíčených semen neliší pouze u rostliny č. 1. U médií 4-6 u rostlin č. 3 a 5. A u médií 5-6 se neliší pouze u rostliny č. 3 a 9.

Nejvíce semen vyklíčilo u rostliny č. 6 a to 71 %. Nejvíce semen vyklíčilo na médiu s aktivním uhlím (85 %), následně médium bez přidaných látek č. 4 (68 %) a nejméně vyklíčilo semen na médiu č. 5 s přídavkem kinetinu (59 %) (Graf 1). Obrázky vyklíčených protokormů na médiích viz. přílohy - obr. 15. (protokormy na médiu BM-1), obr. 16. (protokormy na médiu BM-1 s kinetinem) a obr. 17. (protokormy na médiu BM-1 s aktivním uhlím).

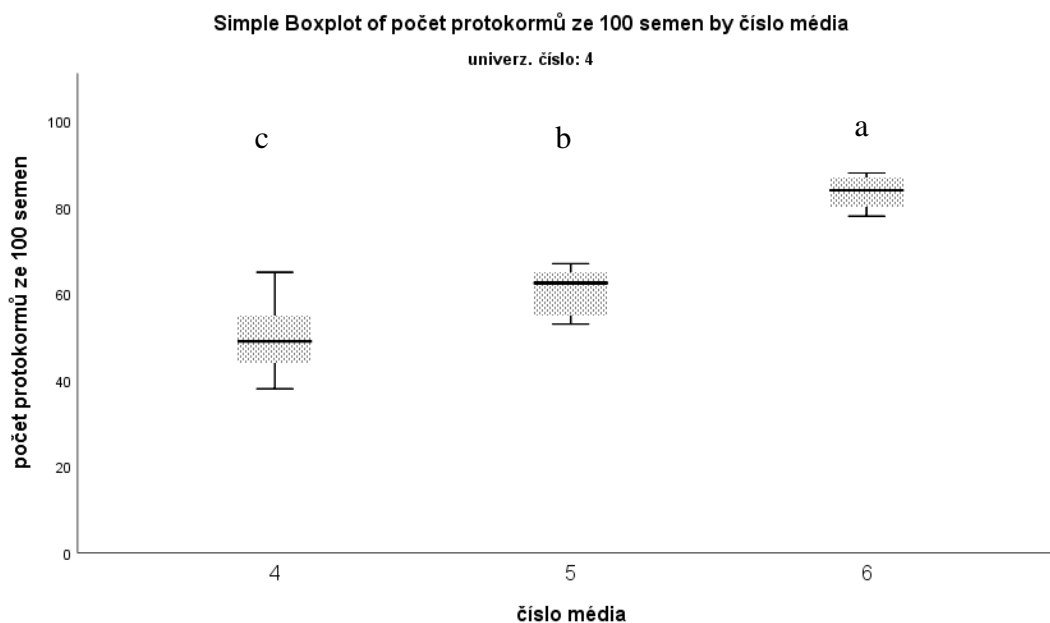


Graf 1: Rostlina č. 6 – vliv média na počet vytvořených protokorm, a= médium č. 6 - 85 %, b=médium č. 4 – 68 %, c=médium č. 5 – 59 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií)

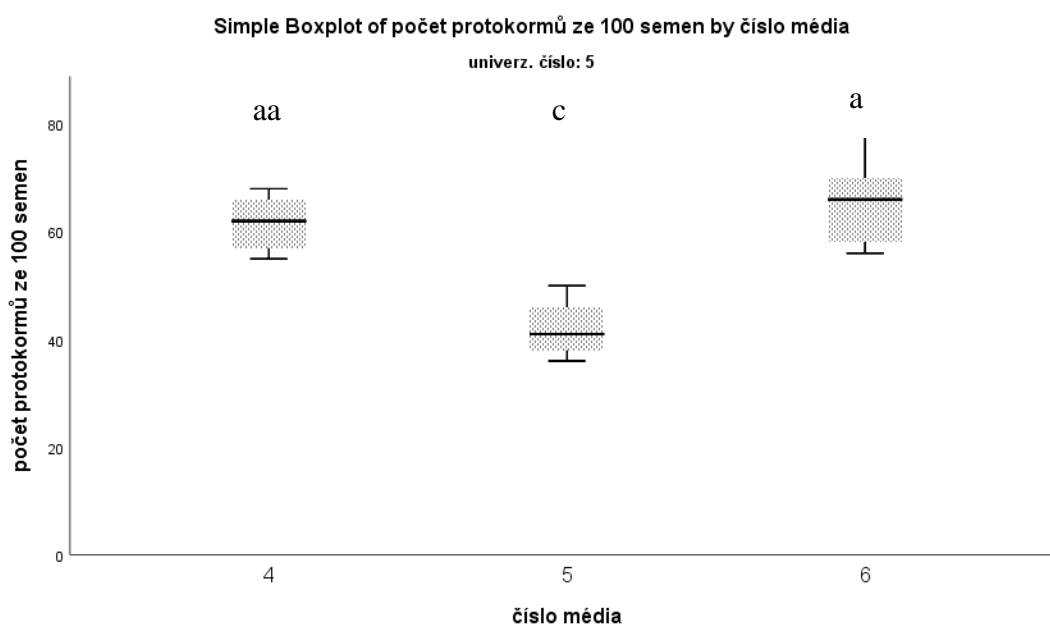
Podobně jako u rostliny č. 6 velký počet protokormů vyklíčil u rostlin č. 2 (54 %) (Graf č. 2), č. 4 (65 %) (Graf č. 3) a č.5 (57 %) (Graf č. 4). U všech rostlin nejlépe klíčila semena na médium č. 6 s aktivním uhlím. Médium č. 5 s kinetinem nemělo velký vliv na klíčení u rostlin č. 5 a č. 2.



Graf 2: Rostlina č. 2 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 71 %, b=médium č. 4 – 52 %, c=médium č. 5 – 40 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií)



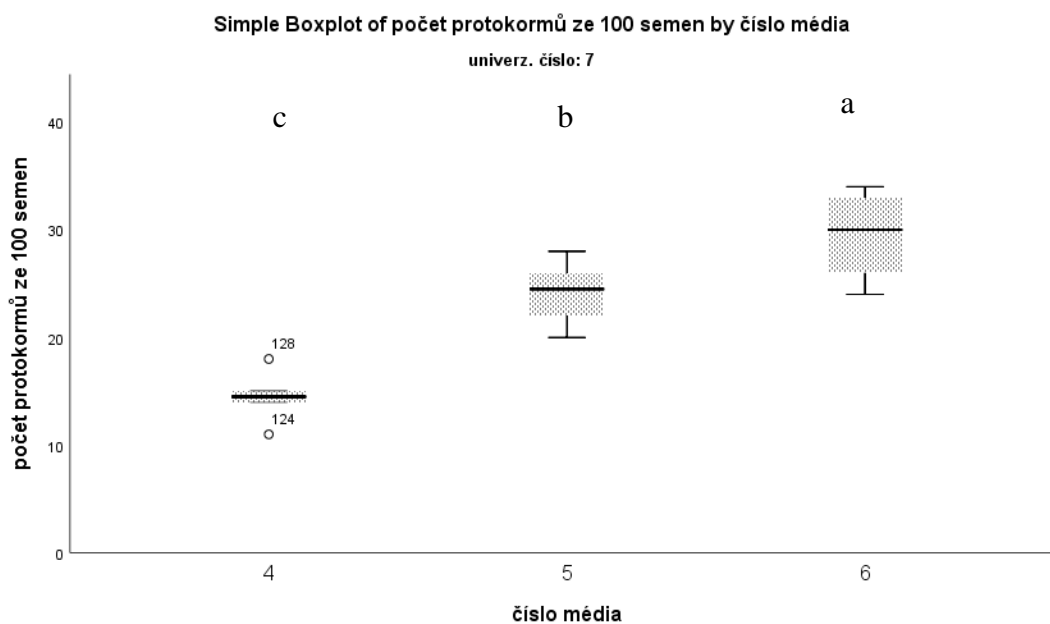
Graf 3: Rostlina č. 4 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 84 %, b=médium č. 5 - 61 %, c=médium č. 4 - 50 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií)



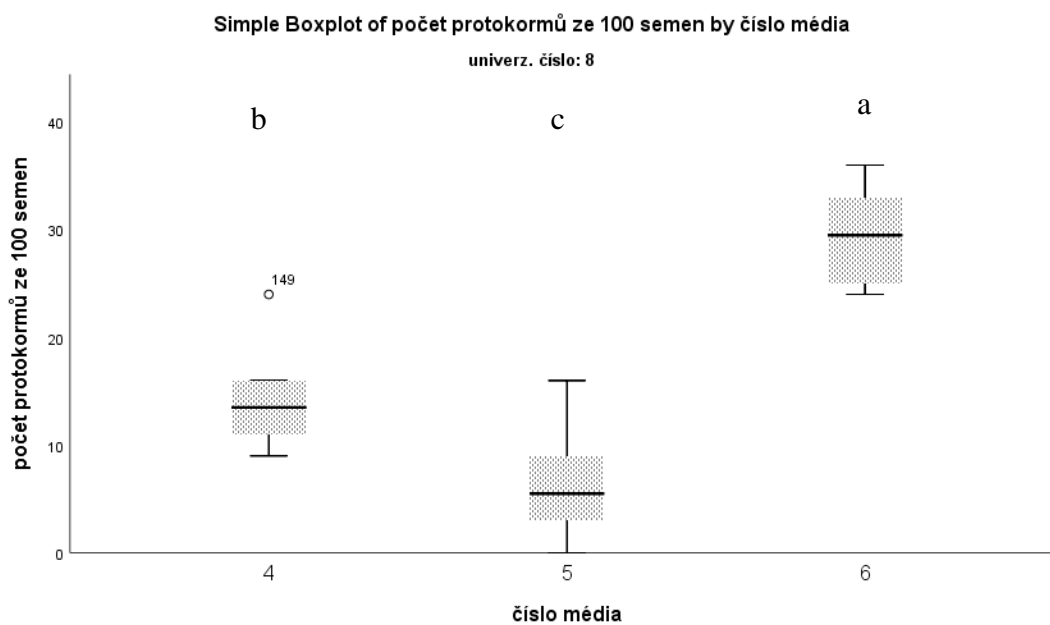
Graf 4: Rostlina č. 5 - vliv média na počet vytvořených protokormů,, a= médium č. 6 - 66 %, aa=médium č. 4 - 62 %, c=médium č. 5 - 42 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 6 a č. 4)

U rostlin č. 7 (Graf č.5) a č. 8 (Graf č. 6) je zřetelný nízký účinek všech použitých médií na klíčení semen. U jedince č. 7 vyklíčilo zhruba o polovinu méně semen na médiu č. 4. U rostliny č. 8 bylo neúspěšné médium s kinetinem. Obě rostliny si vedly celkově hůře oproti ostatním, kdy vyklíčilo v protokorm u rostliny č. 7 jen 23 % a

rostliny č. 8 pouhých 17 % semen. Přitom exemplář č. 7 je druhý nejvyšší a měl nejvíce květů. Rostlina č. 8 patří také k vyšším s více květy.

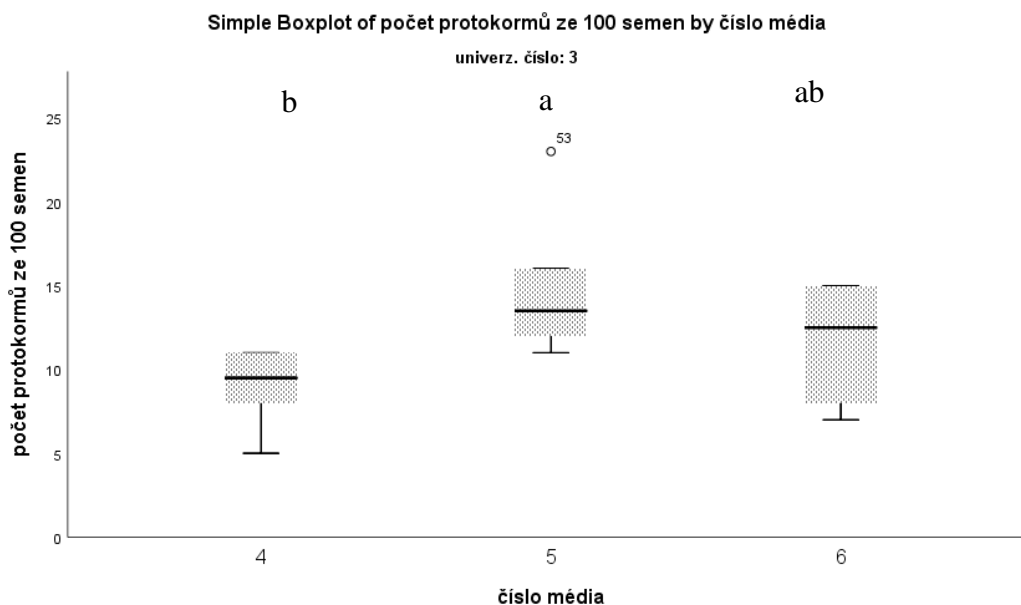


Graf 5: Rostlina č. 7 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 30 %, b=médium č. 5 - 24 %, c=médium č. 4 - 15 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií)



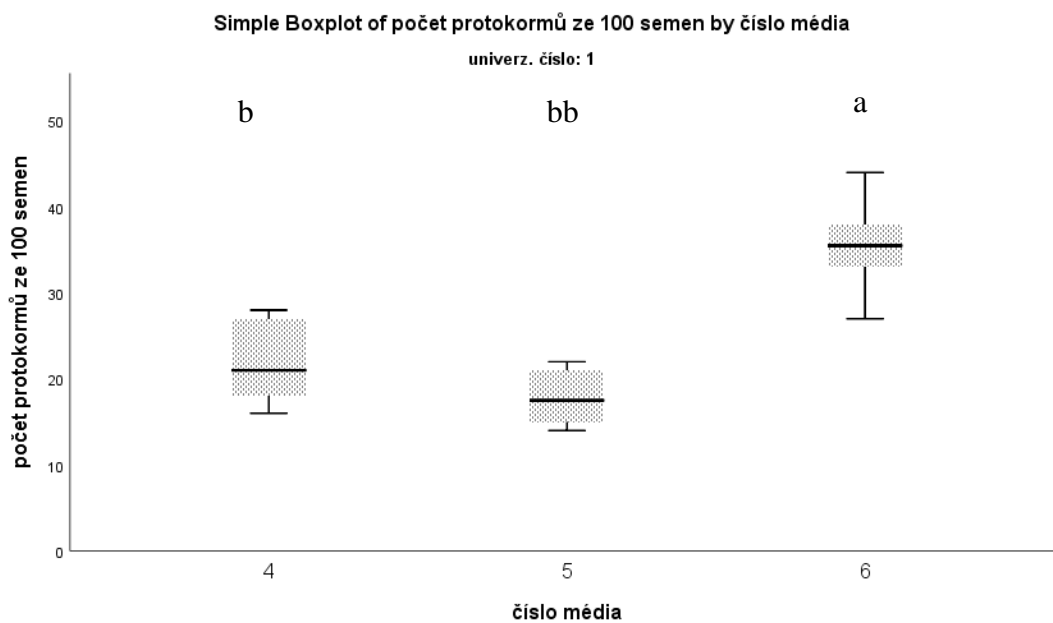
Graf 6: Rostlina č. 8 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 30 %, b=médium č. 4 - 15 %, c=médium č. 5 - 7 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií)

Nejméně semen vyklíčilo z rostliny č. 3 (Graf č. 7), v protokorm vyklíčilo jen 12 %. Nejlépe klíčila semena rostliny č. 3 na médium s kinetinem č. 5 (15 %) a na médium s aktivním uhlím č. 6 (12 %).

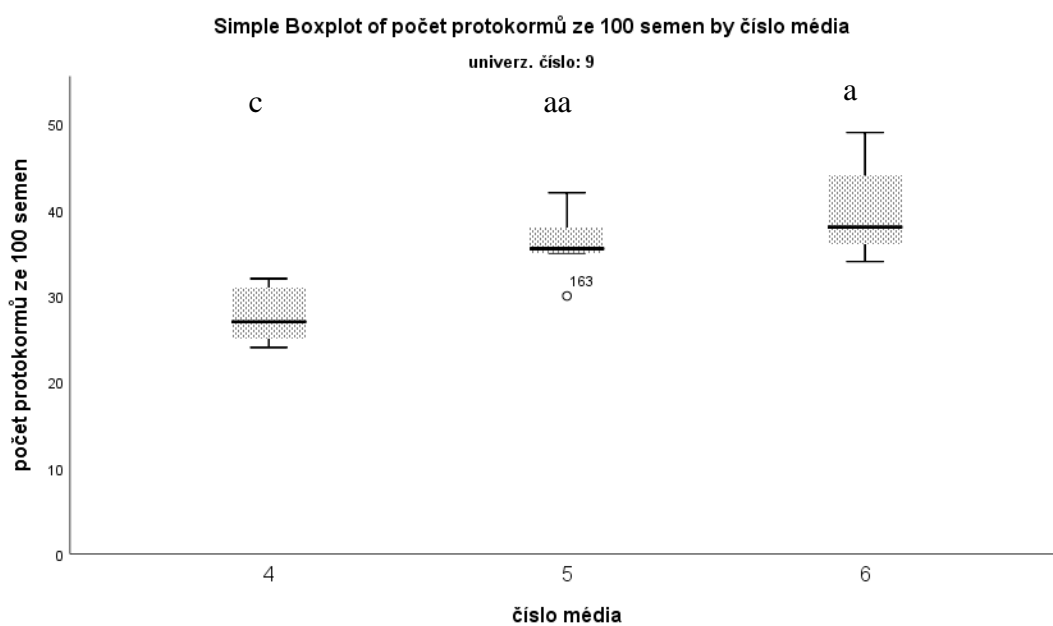


Graf 7: Rostlina č. 3 - vliv média na počet vytvořených protokormů,, a= médium č. 5 - 15 %, ab=médium č. 6 - 12 %, b=médium č. 4 - 9 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 4 a č.6; č. 5 a č. 6)

O něco lépe klíčila semena, v porovnání s rostlinou č. 3, z rostliny č. 1 (25 %) (Graf č. 8), rostliny č. 9 (35 %) (Graf č. 9) a rostliny č.10 (39 %) (Graf č. 10). Všechna semena z těchto tří exemplářů dosahovala nejvyšší úspěšnosti klíčení na médium č. 6 s aktivním uhlím (rostlina č. 1-36 %, rostlina č. 9-40 %, rostlina č. 10-53 %).

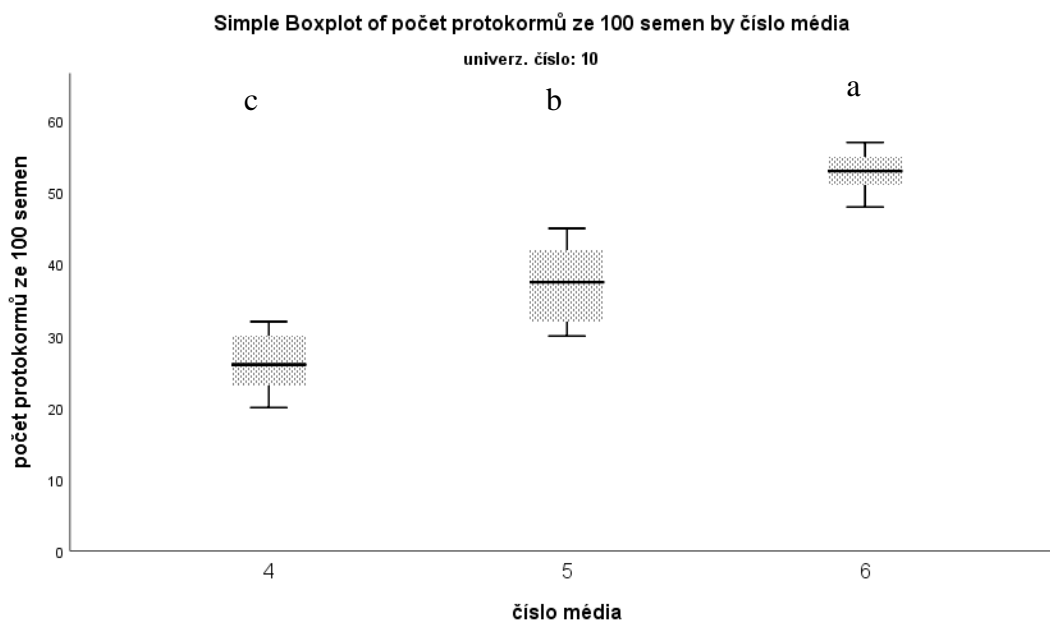


Graf 8: Rostlina č. 1 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 36 %, b=médium č. 4 - 22 %, bb=médium č. 5 - 18 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 4 a č. 5)



Graf 9: Rostlina č. 9 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 40 %, aa=médium č. 5 - 36 %, c=médium č. 4 - 28 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 6 a č. 5)





Graf 10: Rostlina č.10 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 53 %, b=médium č. 5 - 37 %, bb=médium č. 4 - 26 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií)

Souhrnně nejlépe klíčily na médiích čtyři rostliny č. 2, č. 4, č. 5 a č. 6. S průměrným počtem vyklíčených semen rostliny č. 1, č. 9 a č. 10. A s nejméně vyklíčenými semeny rostliny č. 3, č. 7 a č. 8 (viz Tab. č. 6).

Tabulka 6: Procentuální úspěšnost

Procentuální úspěšnost	Číslo jedince
12 % - 25 %	č. 3, č. 7, č. 8
25 % - 40 %	č. 1, č. 9, č. 10
54 % - 71 %	č. 2, č. 4, č. 5, č.6

Před vysetím byl vzorek semen z každé rostliny pozorována pod binolupou (Olympus SZ40). Byl zaznamenán počet plně vyvinutých semen ze 100 ks (od každého jedince 4x) (Tab. č. 7). Plně vyvinutá (životaschopná) semena by měla mít předpoklad pro vyklíčení.

Tabulka 7: Porovnání vyvinutých a vyklíčených semen u jednotlivých jedinců zařazených do skupin dle fitness

Fitness (podle výšky)	Číslo jedince	Binolupa –průměr plně vyvinutá semena	Vyklíčená semena v protokorm
<b>1</b> (od 15 cm)	7	28 %	23 %
	9	83 %	35 %
	10	55 %	39 %
<b>2</b> (od 12 do 14,5 cm)	3	52 %	12 %
	4	80 %	65 %
	5	55 %	57 %
	8	38 %	17 %
<b>3</b> (do 11,5 cm)	2	69 %	54 %
	6	86 %	71 %
	1	85 %	25 %

Semena z rostlin, která mají nejvyšší klíčivost 54–71 %, mají i vysoké procento plně vyvinutých semen od 69–86 %. Kolem 80 % vyvinutých semen má i rostlina č. 1 a č. 9, ale v protokorm vyklíčilo jen kolem 30 %. Velký rozdíl je i u rostliny č. 3, která má 52 % plně vyvinutých semen, ale v protokorm vyklíčilo jen 12 %. Rostlina č. 7 má pouze 28 % vyvinutých semen, ale vyklíčil podobný počet (Tab. č. 7).

Semena z rostliny č.2, č.5, č.6, která měla nejvyšší procentuální úspěšnost, klíčila nejlépe na médiu č. 6 s černým uhlím a nejhůře na médiu č.5 s kinetinem.

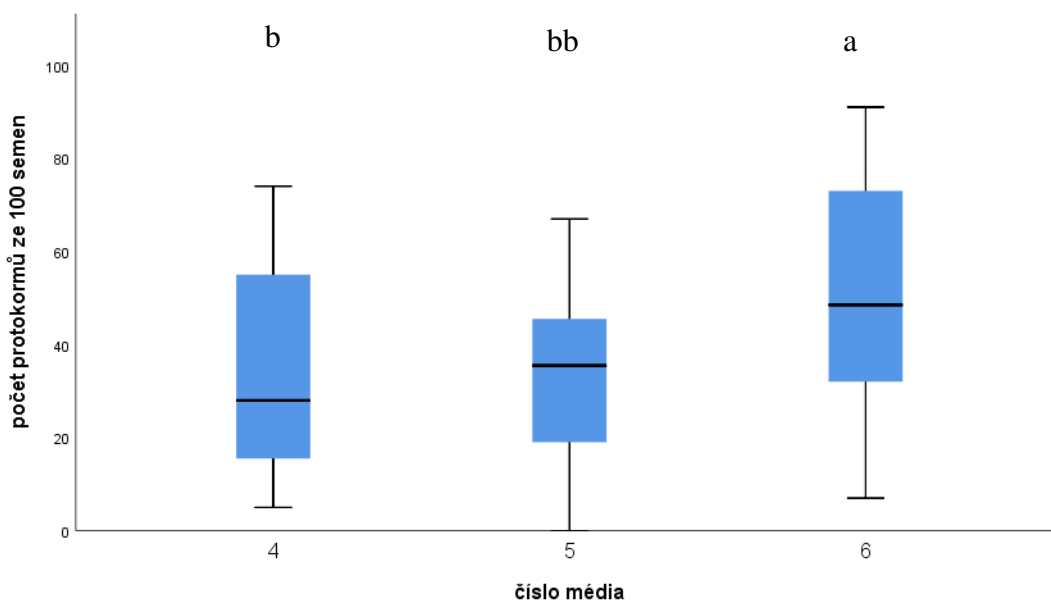
Z nejvyšších rostlin č.7, č. 9, č. 10 nedosáhla klíčivost vysokých hodnot ani u jedné rostliny. Nejnížší hodnoty klíčivosti byly u rostliny č. 7., která z těchto tří rostlin má avšak nejvíce tobolek. Všechny tři rostliny klíčily nejméně na médiu č. 4 a nejvíce na médiu 6 s černým uhlím.

Pokud porovnáme souhrnně všechny rostliny a vliv složení médií na úspěšnost klíčení pomocí Tuckeyho post hoc testu (Tab. č. 8), zjistíme, že se významný rozdíl prokázal mezi médiem č. 4 a č. 6 (p-hodnota <0,001) a mezi médiem č. 5 a č. 6 (p-hodnota

<0,001). Rozdíl v účinku na klíčení semen u médií 4 a 5 není významný a dosahuje se podobné klíčivosti semen na těchto médiích (Tab. č. 8).

Tabulka 8: Porovnání médií u všech rostlin

p-hodnota Tuckey post hoc test		
Média 4-5	Média 4-6	Média 5-6
0,980	0,000	0,000



Graf 11: Porovnání médií u všech rostlin, a= médium č. 6–50 %, b= médium č. 4–35 %, bb=médium č. 5–34 % (p-hodnota > 0,05 u média č. 4 a č. 5)

Z grafu (Graf 11) lze potvrdit, že nejlépe semena klíčila na médiu s aktivním uhlím (médium č. 6). Na médiích č. 4 a č. 5 klíčila semena podobně.

**Celková úspěšnost vyklíčených semen je 40 %. Celková úspěšnost na médiích u všech rostlin:**

- U média č. 6 vyklíčilo průměrně 50 % semen.
- U média č. 4 vyklíčilo průměrně 35 % semen.
- U média č. 5 vyklíčilo průměrně 34 % semen.

## 7.2 Vliv fitness na klíčení

Semena z rostlin č. 4 a č. 5 která patří do skupiny s nejvyšší procentuální úspěšností, mají průměrnou výšku, i počet květů a tobolek. Vyšší a s větším počtem květů i plodů

z těchto exemplářů je rostlina č. 4, která i počtem vytvořených protokormů dopadla lépe. Podobných hodnot klíčivosti dosáhla i rostlina č. 6. Je zajímavé, že rostlina č. 3, která vyprodukovala nejméně protokormů je vyšší, má více květů i tobolek než rostlina č. 6, která měla nejlepší klíčivost semen na použitých médiích.

Rostlina č. 6 je nejnižší ze všech exemplářů a měla pouze 2 tobolky. Podobné fitness s rostlinou č. 6 má rostlina č. 1, ze které vyklíčilo pouze 25 % semen. Mají téměř stejnou výšku, stejný počet květů a úplně stejný počet tobolek, avšak klíčivost semen je na médiích rozdílná i přes to, že počet životaschopných semen ve vzorku je podobný. Stejný počet tobolek i podobnou výšku má i rostlina č. 2, která na živných médiích klíčila úspěšně. Přitom počet tobolek u těchto tří rostlin je podprůměrný (dvě tobolky). I rostlina č. 5, která má pouze tři tobolky v počtu protokormů měla vyšší procento vyklíčených semen.

Naopak rostliny č. 3, č. 7 a č. 8, které měly nejnižší průměrné procento vyklíčených semen mají kolem šesti tobolek. Malé množství tobolek má i rostlina č. 10 a č. 9, které patří k nejvyšším ze všech rostlin s úspěšností kolem 30 % vyklíčených semen. Ale rostlina č. 4 má pět tobolek a klíčivost semen na médiích byla vysoká.

Tabulka 9: Procentuální klíčivost podle výšky rostlin

Fitness (podle výšky)	Číslo jedince	Médium 4	Médium 5	Médium 6
<b>1</b> (od 15 cm)	7	15 %	24 %	30 %
	9	28 %	36 %	40 %
	10	26 %	37 %	53 %
<b>Celkem:</b>		23 %	33 %	41 %
<b>2</b> (od 12 do 14,5 cm)	3	9 %	15 %	12 %
	4	50 %	61 %	84 %
	5	62 %	42 %	66 %
	8	15 %	7 %	30 %
<b>Celkem:</b>		34 %	31 %	48 %
<b>3</b> (do 11,5 cm)	2	52 %	40 %	71 %
	6	68 %	59 %	85 %
	1	22 %	18 %	36 %
<b>Celkem:</b>		48 %	39 %	64 %

Tabulka 10: Procenta vyklíčených semen v protokorm podle výšky rostlin

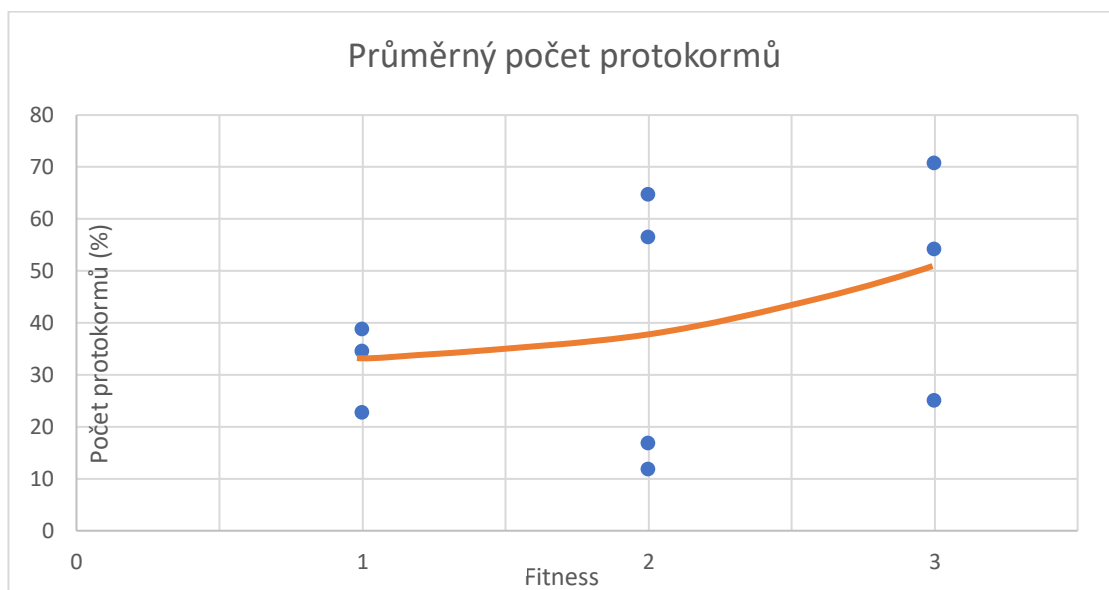
<b>Průměr (%) vyklíčených semen v protokorm podle výšky rostlin:</b>		
Fitness 1	Fitness 2	Fitness 3
32 %	38 %	50 %

Z pozorování lze konstatovat, že semena z rostlin fitness skupiny č. 1 nejhůře klíčila na médiu č. 4, ve skupině č. 2 se médium č. 4 a č. 5 vyrovnává. A semena z nejnižších rostlin (skupina č. 3) nejhůře klíčila na médiu č. 5 (Tab č. 10).

Nejvíce klíčila semena rostlin na médiu č. 6 s aktivním uhlím, kromě rostliny č. 3. Na médiu č. 4 byly zaznamenány nejnižší počty vyklíčených semen u rostlin č. 3, č. 4 č. 7, č. 9 a č. 10. Všechny tyto rostliny patří ale k vyšším.

Lze konstatovat, že nejlépe dopadly nejnižší rostliny s menším počtem tobolek a nejhůře vyšší rostliny s vyšším počtem tobolek. Graf č. 12 znázorňuje průměrnou

procentuální klíčivost každé rostliny (každá rostlina označena modrou tečkou) ve fitness skupině.



Graf 12: Průměrný počet protokormů v závislosti na fitness

K shrnutí těchto výsledků byla vytvořena korelační matice (Tab č. 11), která vyjadřuje vztah mezi průměrným počtem protokormů, výškou, počtem květů a počtem tobolek.

Tabulka 11: Korelační matice

	Průměrný počet protokormů	Výška rostlin (cm)	Počet květů	Počet tobolek
Průměrný počet protokormů		-0,2	-0,6	-0,5
Výška rostlin (cm)			0,5	0,3
Počet květů				0,6
Počet tobolek				

Matice potvrzuje, že počet protokormů se zvyšuje se snižující se výškou rostliny ( $r_{xy} < 0$ ). To stejné platí i s počtem květů ( $r_{xy} < 0$ ) a tobolek ( $r_{xy} < 0$ ). Čím vyšší rostlina je, tím má více květů ( $r_{xy} > 0$ ) i tobolek ( $r_{xy} > 0$ ).

Z výsledků vyplynulo, že čím menší rostlina je, tím větší má úspěšnost vyklíčení na použitých živných médiích a kultivaci *in vitro*. Osvědčilo se přidání aktivního uhlí do základního BM-1 média, které většinou zvýšilo úspěšnost klíčení semen u zkoumaných vzorků semen z odebraných jedinců. Vliv přídavku kinetinu do média se neprojevil a úspěšnost klíčení semen byla podobná jako u média bez kinetinu a aktivního uhlí.

## 8 Diskuse

Pro výsev semen z rostlin vstavače kukačky bylo použito médium BM-1, které obsahuje komplex makroelementů a mikroelementů. S obsahem sacharózy a dusíku v organické formě. Podle Dowling et Jusaitis (2012) je médium BM-1 ideálním pro evropské druhy orchidejí. U australských, suchozemských orchidejí *Pterostylis nutans* a *Microtis arenaria* dokonce vyklíčilo přes 90 % semen (90,7 % a 99,2 % v tomto pořadí).

Znaniecka et Lojkowska (2004) klíčily pět evropských ohrožených druhů orchidejí včetně vstavače kukačky. Nejvyšší klíčivosti vstavače kukačky dosáhly 10 % na modifikovaném MS médiu ze zralých semen. Nejúspěšněji vyšla média s peptonem, kvasničním extraktem a kaseinovým hydrolyzátem. Zmiňují, že se u všech druhů klíčivost zvýšila, když byla snižena koncentrace amonných a dusičnanových solí. Například u evropské suchozemské orchideje *Dactylorhiza incarnata* bylo klíčení a růst snižován za přítomnosti anorganické formy dusíku (Dijk et Eck 1995). Médium v této práci, ke klíčení vstavače kukačky, obsahuje organický dusík ve formě kasein hydrolyzátu a glycinu.

Stanoviště orchidejí jsou převážně velmi chudé na anorganický dusík. Nynější trend ve vyváření komerčních médií je zvyšovat podíl organických sloučenin, napodobovat tak mykorrhizní houby (Znaniecka et Lojkovská 2004). Tento názor podporuje i Stewart and Kane (2006), který zmiňuje, že Van Waes a Debergh (1986), Malmgren (1992, 1996) a Anderson (1996) doporučují snížit zdroj anorganických látek a přidat aminokyseliny pro klíčení suchozemských rostlin.

Je důležité zmínit, že problematika není jednostranná. Existují i evropské druhy, které lépe klíčí s anorganickým dusíkem. Například *Spiranthes spiralis* (L.) lépe klíčil na médiích s přídavkem anorganického dusíku (Dulić et al. 2019). Při klíčení *Bletia purpurea* výsledky ukázaly, že orchidej je schopna využít obě formy dusíku. Na médiu s organickou formou dusíku BM-1 vyklíčilo do fáze 5 (vznik prvního listu) 74 % semen, u média MM 71 %. U anorganické formy do fáze 5 na médiu ½MS vyklíčilo 55 %, za stejnou dobu vyklíčilo do fáze 6 (vznik druhého listu) na médiu VW 35,5 % semen (Dutra et al. 2008). Autoři Stewart and Kane (2006) dodávají, že celková problematika vlivu dusíku je málo prozkoumaná.

Při použití média BM-1 v této práci vyklíčilo celkově 40 % protokormů. Výsledek tohoto vzorku potvrzuje vhodnost média pro evropské druhy, konkrétně pro vstavač kukačka. Dowling et Jusaitis (2012) zmiňují několik příkladů úspěšného klíčení suchozemských orchidejí na médiu BM-1 včetně evropských.

Celkovou úspěšnost zvýšil přídavek černého uhlí, na kterém klíčilo výrazně více semen. Ale i na samotném médiu bez přídavku aktivního uhlí v protokorm vyklíčilo celkově 35 %. Znaniecka et Lojkovská (2004) zmiňují, že se klíčivost u pěti evropských druhů pohybovala kolem 10 % (*Cypripedium cal-aeolus*, *Dactylorhiza majalis*, *Huntet Summerh.*, *Epipactis atrorubens*, *Epipactis palustris*, *Anacamptis morio*), avšak když k semenům *Dactylorhiza majalis* přidaly 0,2 % aktivní uhlí, klíčivost se zvýšila na 30 %.

Řada metodik varuje před použitím aktivní uhlí, kvůli neselektivnímu vstřebávání látek. Kováč (1992) upozorňuje, že aktivní uhlí vstřebává regulátory růstu, Pan et Staden (1998) dodávají, že může adsorbovat i organické látky. Ale od autorů, kteří použili černé uhlí v praxi se často setkáme s pozitivními výsledky na klíčení a tvorbu kořenů, což se potvrdilo i v této práci. Semena vstavače kukačky reagovala na aktivní uhlí velice kladně. Na médiu s aktivním uhlím vyklíčilo 50 % semen. I přesto, že médium BM-1 je bohaté na organické sloučeniny, podle výsledků aktivní uhlí tyto sloučeniny neznehodnotilo.

V této práci byla zvolena koncentrace aktivního uhlí 0,5 g.l<sup>-1</sup>, klíčivost oproti médiu bez přidaných látek, stoupla o 16 %. U hybridu z rodu *Calanthe* („*Hyesung*“ x „*Jeongmong*“) klíčivost stoupla na 42 % po přidání 0,01 g l<sup>-1</sup> aktivního uhlí, z úspěšnosti 28 % na bazálním médiu. Po zvýšení koncentrace na 0,1 g l<sup>-1</sup> u hybridu z rodu *Calanthe* („*Hyesung*“ x „*Jeongmong*“) se zvýšilo i procento vyklíčených semen na 54 % (Shin et al. 2011). Druh *Orchis coriophora* také lépe klíčil na médiu s přidáním aktivního uhlí (2 g/l) oproti médiu bez přidaných látek. Následně byla účinnost porovnána se 4 různými typy auxinů (1 mg/l), kdy médium s přidáním aktivním uhlím mělo podobné výsledky klíčivosti semen (27 %), jako auxiny IBA, NAA a 2,4-D. Velmi pozitivní efekt měl přídavek IAA (1 mg/l), 46 % u druhu *Orchis coriophora* (Bektas et al. 2013). Naopak u hybridu orchideje z rodu *Calanthe*



„Hwagung“ x „Heysung“ se žádný účinek aktivního uhlí v médiu na zvýšení klíčivosti semen neprokázal (Shin et al. 2011).

Hossain (2008) zdůvodňuje zvýšení klíčivosti po přidání aktivního uhlí (u 2 médií o 15 %, 10 %) absorpcí toxických látek a ztmavnutí média. V dostupné literatuře jsou tyto důvody zmiňovány jako dvě hlavní příčiny úspěšného klíčení orchidejí na médiích s aktivním uhlím. Ze stejných důvodů mohla být úspěšná kultivace vstavače kukačky v této práci.

Primárním přínosem aktivního uhlí je schopnost vstřebat toxické látky (Kováč 1992). To umožňuje struktura, která je nepravidelná (náhodné uspořádání částic) a mikrokrytalická (Pan et Staden 1998 ex Qandeer et al. 1994). Příkladem je adsorbce fenolických látek, které způsobují hnědnutí tkání rostlin, při kultivaci explantátů. (Pan et Staden 1998). Důvodem, proč vstavač kukačka nejlépe klíčil na médiu s černým uhlím může být schopnost uhlí vstřebávat odpadní látky. Tyto sloučeniny mohou zamezit klíčení rostlin. V uzavřených nádobách bez aktivního uhlí se při kultivaci škodlivé látky hromadí a nedochází k výměně plynů (Thomas 2008). Baker et al. (2014) odůvodňují přidání černého uhlí při množení *Orchis catasetum* vstřebáním fenolických sloučenin přesto, že do médií jsou přidány i růstové regulátory.

Jako druhý důvod se uvádí schopnost aktivního uhlí obarvit roztok na černou barvu (Prizão et al 2012. ex Pasqual 2001). To je vysvětleno tím, že světlo patří mezi hlavní faktory při kultivaci rostlin. Tmavá barva by mělo vytvářet přirozené podmínky pro semena a růst výhonků (Pan et Staden 1998). Prizão et al. (2012) zkoumali tento faktor za použití aktivního uhlí a grafitu, který má také schopnost obarvit roztok. U rostlin rostoucích na médiu s aktivním uhlím vyrostl výrazně více kořenů než na médiu s grafitem. Což potvrzuje vliv aktivního uhlí na výhonky, ale nikoliv kvůli černé barvě roztoku. Pan et Staden (1998) upozorňují, že nesmíme zapomenout i na přirozeně vyskytující se látky v aktivním uhlí, které se uvolňují do média. Thomas (2008) uvádí, že tyto látky podporují, stimulují růst a upravují pH na optimální úroveň.

Úspěšnost a reakce druhů na tyto vlastnosti je individuální. Může jak pozitivně, tak negativně ovlivnit klíčení rostlin v *in vitro* kultuře. Je potvrzené, že aktivní uhlí,

způsobuje vstřebávání inhibičních látek i regulátorů růstů, uvolňuje látky vyskytující se v aktivním uhlí a způsobuje tmavou barvu média (Pan a Staden 1998).

Vstavač kukačka na aktivní uhlí reagoval pozitivně, jak u větších (fitness skupina 1–41 %), tak menších rostlin (fitness skupina 3–64 %). Médium s přídavkem kinetinu, mělo oproti médiu s aktivním uhlím nižší schopnost vytvářet protokormy u semen vstavače kukačky. Neprojevilo se téměř žádný rozdíl mezi médiem bez přidaných látek (35 %) a médiem s kinetinem (34 %). Bektas et al. (2013) porovnávali klíčivost *Orchis coriophora* s médiem s aktivním uhlím a s médiem s přídavky cytokininů včetně kinetinu (1 mg/l). Ani v tomto výzkumu se efekt cytokininů neprojevil. Semena klíčila na všech typech médiích s cytokininou podobně, jako na médiu s přídavkem aktivního uhlí. Poznatky jsou rozdílné oproti této studii, semena vstavače kukačky klíčila obdobně na médiu bez přídavku aktivního uhlí a kinetinu a na médiu s kinetinem. Zatímco semena *Orchis coriophora* klíčila stejně na médiu s kinetinem a s aktivního uhlím.

Vliv cytokininů je stejně diskutabilní, jako vliv anorganického/organického dusíku a vliv aktivního uhlí. Někdy zvyšují klíčivost, jindy způsobí inhibici, nebo se neprojeví žádné účinky (Stewart et Kane 2006). Úloha cytokininů při klíčení orchidejí *in vitro* není celkově probádána. Ví se, že dělí buňky a že některé houby produkují cytokininy (Kauth et al. 2018 ex Bewley a Black 1994, Crafts a Miller 1974). Z této myšlenky se přepokládá, že orchideje mohou přijímat cytokininy z mykorhizy. A je pro orchideje přítomnost těchto látek přirozená (Kauth et al. 2018). Šebánek et al. (1983) a Kincl et Krpeš (2000) popisují, že cytokininy sice indikují dělení buněk, ale jen za přítomnosti auxinů. To potvrzuje výzkum u Vejsadové (2009), kde byl pozorován růstově-stimulační vliv u *Platanthera bifolia* při aplikaci kinetinu za přítomnosti auxinů (NAA a IAA).

Ponert et al (2011) u *Dactylorhiza majalis* zjistili, že se zvyšující se koncentrací kinetinu se výsledky při klíčení orchideje zhoršují. Při koncentraci 100 mg/l nebylo pozorováno žádné klíčení. Nižší množství kinetinu 10 mg/l způsobilo vzrůstově větší protokormy, ale na klíčení vliv nemělo. Nebyl pozorován žádný rozdíl v klíčivosti na médiích bez použití kinetinu a s kinetinem o koncentraci až 1 mg/l. To odpovídá výsledkům v této práci při klíčení vstavače kukačky, kdy byla použita koncentrace 1

mg/l. Počet protokormů se rovnal počtu protokormů na bazálním médiu. Ponert et al. (2011) zmiňují, že ani o něco vyšší koncentrace kinetinu neměly vliv na klíčení.

V konečném výsledku hrálo důležitou roli i fitness orchidejí. Výsledky ukázaly, že více protokormů vyrostlo z rostlin nejmenšího vzrůstu a to 50 %, u největších rostlin vyklíčilo jen 32 % semen. Významnost fitness orchidejí lze zaznamenat při kultivaci na médiu s aktivním uhlím, kde byla celková průměrná klíčivost 50 %, u nejnižších rostlin 64 % a u nejvyšších pouze 41 % vyklíčených semen. K výšce rostlin tak můžeme přikládat podobnou váhu, jako vlivu látek v médiích. Experimentální studie ohledně morfologie má zásadní význam pro pochopení celistvosti rostlin. Šebánek et al. (1983) dále zmiňují, že tyto výzkumy jsou důležité zejména v zemědělství. Roach et Wulff (1987) potvrzují, že je málo studií o vlivu mateřské rostliny na potomstvo zejména u populací z přirozeného prostředí.

Orchideje jsou konkurenčně velmi slabé, potřebují ke svému růstu dostatek světla (Härtel 2021). Můžeme se domnívat, že vyšší orchideje svoji energii soustřeďovaly do růstu, kvůli konkurenci. Z toho důvodu nevyprodukovaly dostatečně kvalitní semena. To by mohlo souviset i s počtem tobolek. Rostlina se v rámci „ohrožení“ pokusí vyprodukovat co nejvíce tobolek, ale nejsou dostatečně kvalitní, jako u menších rostlin s méně plody. Sonkoly et al. (2016) zmiňují že, Neiland & Wilcock (1998) a Tremblay et al. (2005) považují nízký počet plodů za známku menší zdatnosti rostlin. Sonkoly et al. (2016) informaci vyvrací, tvrdí, že nízký počet plodů nemusí znamenat nízkou reprodukci. Rostlina může vykompenzovat nízký počet plodů více semeny na jeden plod. O vlivu fitness mateřských rostlin na klíčivost semen je zatím publikováno málo informací, a zvláště u popisovaného druhu vstavač kukačka případně u jedinců ze společné čeledě informace zcela chybí.

## 9 Závěr

Byl vytvořen přehled biotopů a konkrétních stanovišť výskytu vstavače kukačky, především v České republice. Byli sepsány důvody a ohrožení populací vstavače kukačky a přístupy ochrany *in situ* a *ex situ*. V rámci této problematiky byla rozebrána témata životaschopnosti rostlin a jejího výzkumu. Řada vědců pracuje na výzkumech fitness rostlin v přirozeném prostředí, průzkumech ohledně životaschopnosti semen a množení rostlin *in vitro*. Pomocí těchto metod lze posílit ohrožené populace, nebo je navrátit na místa, kde již vyhynuly.

K literární rešerši byla použita odborná literatura, metodiky, a především články s odlišnými přístupy k množení orchidejí i s praktickou částí. Neexistuje jednoznačný postup, jak dosáhnout úspěšného vyklíčení. Byly porovnány výsledky odlišných metod na různé druhy orchidejí. Postupy množení v *in vitro* podmínkách se liší již od sterilizace semen, složení médií, až po podmínky kultivace. Existuje mnoho komerčních, kultivačních směsí na výrobu média s odlišným poměrem anorganických a organických látek. Je řada možností, jak podpořit klíčení přidáním růstových regulátorů, sacharidů, vitamínů, nebo organických sloučenin.

Byly založeny experimenty s výsevem semen vstavače kukačky. Základem bylo médium BM-1, které je podle literární rešerše ideálním pro evropské druhy orchidejí. Tato domněnka se osvědčila, protože na samotném médiu vyklíčilo 35 % semen. Přídavek aktivního uhlí do média se ukázal jako vhodný na klíčení vstavače kukačky, kdy vyklíčilo průměrně ze všech zkoumaných jedinců až 50 % semen. Přídavek růstového hormonu kinetinu v médiu se neprojevil. Byl zjištěn vztah mezi počtem vytvořených protokormů a výškou rostlin. U testovaných 10 exemplářů byla jednoznačná spojitost – čím nižší rostliny byly, tím vyklíčilo v *in vitro* podmínkách více protokormů z jejich semen.

Získané poznatky by bylo vhodné ověřit s větším vzorkem semen z více rostlin. Z literární rešerše bylo patrné, že nároky na kultury jsou odlišné u druhů, ale i u jedinců individuálně.

## Přehled literatury a použitých zdrojů

### Odborné publikace

Baker A., Kaviani B., Nematzadech G., Negahdar N., 2014: Micropropagation of *Orchis catasetum* – A rare and endangered orchid. *Acta scientiarum Polonorum. Hortorum cultus* 13, S. 197-205.

Baskin C., Thompson K., Baskin J., 2006: Mistakes in germination ecology and how to avoid them. *Seed Science Research* 16, S. 165-168.

Bektas E., Cuce M., Sokmen A., 2013: In vitro germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. *Turkish Journal of Botany* 37, S. 336-342.

Bozdemir H., Çiğ A., Türkoğlu N., 2018: Effects of different concentrations of carbohydrate forms on *Orchis sancta* L. propagation in vitro. *Applied Ecology and Environmental Research* 16, S. 4849-4864.

Brabec J., Tájek P., Hertel H., 2008: Květena Těšovských pastvin. Sborník muzea karlovarského kraje 16. Muzeum karlovarského kraje, Cheb. S. 267-306.

Dijk E., Eck N., 1995: Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist* 131, S. 361-367.

Dowling N., Jusaitis M., 2012: Asymbiotic in vitro germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany* 60. S. 592-601.

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

Dutra D., Johnson T. R., Kauth P. J., Stewart S. L., Kane M. E., Richardson L., 2008: Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 94, S. 11-21.

Dykyjová D., 2003: Ekologie střeoevropských orchidejí. Kopp, České Budějovice.

Ekrt L., Půbal D., 2008: Novinky v květeně cévnatých rostlin české Šumavy a přiléhajícího Předšumaví. I. *Silva Gabreta* 14, S. 19-88.

Ensslin A., Sandner T., Matthies D., 2011: Consequences of ex situ cultivation of plants: Genetic diversity, fitness and adaptation of the monocarpic *Cynoglossum officinale* L. in botanic gardens. *Biological Conservation* 144, S. 272-278.

Fay M. F., 2018: Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanical Studies* 59, S. 1-6.

Godo T., Komori M., Nakaoki E., Yukawa, T., Miyoshi K., 2010: Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 46, S. 323-328.

Grulich V., Chobot K., eds., 2017: Červený seznam ohrožených druhů České republiky cévnaté rostliny. *Příroda* 35, Praha.

Härtel H., 2021: Rostlina roku: vstavač kukačka. *Botanika* 1, S. 21-25.

Hay F., Merrit D., Soanes J., Dixon K., 2010: Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164, S. 26-41.

Hornemann G., Michalski S. G., Durka W., 2012: Short-term fitness and long-term population trends in the orchid *Anacamptis morio*. *Plant Ecology* 213, S. 1583-1595.

Hossain M. M., 2008: Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology* 20, S. 3614-3619.

Hrouda L., 2013: Rostliny luk a pastvin. Academia, Praha.

Chytrý M., eds., 2007: Vegetace České republiky 1. Travinná a keříčková vegetace. Academia, Praha.

Chytrý M., Kučera T., Kočí M., Grulich V., Lustyk P., 2010: Katalog biotopů České republiky. Druhé vydání. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.

Jacquemyn H., Hutchings J. M., 2010: Biological Flora of the British Isles: *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. *Journal of ecology* 98, S. 1253-1267.

Jatiová M., Šmiták J., 1996: Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a ve Slezsku. Arca JiMfa, Třebíč.

Jersáková J., Kindlmann P., 2004: Zásady péče o orchidejová stanoviště. Knopp, České Budějovice.

Jersáková J. Malinová T., 2007: Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176. S. 237-241.

Jersáková J., Průša D., 2021: Rostlina roku 2021 – vstavač kukačka. *Živa* 2021/3. S. 114.

Jevšnik T., Luthar T., 2015: Successful disinfection protocol for orchid seeds and influence of gelling agent on germination and growth. *Acta agriculturae Slovenica* 105, S. 95-102.

Ježek Z., 2003: *Encyklopedie orchidejí*. Rebo Productions, Dobřejovice.

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

Kauth J. P., Dutra D., Johnson T. R., Stewart S. L., Kane M. E., Vendrame W., 2008: Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. In: Teixeira da Silva J. A.,: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Volume V. Global Science Books, Ltd, Middlesex. S. 375-391.

Kincl M., Krpeš V., 2000: *Základy fyziologie rostlin*. Montanex, Ostrava.

Koene F. M., Ribas L., Amano E., 2019: Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany* 121, S. 83-91.

Křivan V., Jelínek A., 2009: Přírodní památka Prosenka – zoologický průzkum. ZO ČSOP Kněžice, Kněžice.

Lienert J., Fischer M., Schneller J., Diemer M., 2002: Isozyme variability of the wetland specialist *Swertia perennis* (Gentianaceae) in relation to habitat size, isolation, and plant fitness. *American Journal of Botany* 89, S. 801-811.

Mackovčín P., 2005: Management chráněných území v České republice. *Život. Prostr.* 39, S. 67-71.

Malmgren S., 1996: Orchid propagation: theory and practice. In: Allen C., eds.: *North American native terrestrial orchids: propagation and production*. Germantown: North American Native Terrestrial Orchid Conference, S. 63–71.

Martišek J., Martišková K., 2010: Biskoupský kopec – Komplex teplomilných trávníků. *Jihomoravský kraj, Pustiměř*.

Maschinski J., Albrecht M. A., 2017: Center for Plant Conservation's Best Practice Guidelines for the reintroduction of rare plants. *Plant Diversity* 39, S. 390-395.

McCormick M., Taylor L., Whigham D., Burnett R., 2016: Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 104, S. 744-754.

Merritt D. J., Swarts N. D., Sommeville K. D., Hay F. R., 2014a: Ex situ conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences* 175, S. 46-58.

Merritt D. J., Martyn A. J., Ainsley P., Young R. E., Seed L. U, Thorpe M., Hay F. R., Commander L. E., Shackelford N., Offord C. A., Dixon W. K., Probert R. J., 2014b: A continental-scale study of seed lifespan in experimental storage examining seed, plant, and environmental traits associated with longevity. *Biodiversity and Conservation* 23, S. 1081-1104.

Miko L., Hošek M., eds., 2009: Příroda a krajina České republiky. Zpráva o stavu 2009. In: Primack R., Kindlmann P., Jersáková J.: Úvod do biologie ochrany přírody. Portál, Praha. S. 274-275.

Miyoshi K., Mii M., 1995: Phytohormone pretreatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (orchidaceae), in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae* 63, S. 263–267.

Nepraš K., Kroufek R., 2011: Orchideje Českého středohoří. *Živa* 2011/3, S. 111-114.

Pan J. M., Staden van J., 1998: The use of charcoal in in vitro culture – A review. *Plant Growth Regulation* 26, S. 155-163.

Pešout P., Knižátková E., 2020: Adaptativní management chráněných území ve správě AOPK ČR. *Ochrana přírody* 6, S. 21-25.

Ponert J., 2016: Jak rostou orchideje ze semen. *Živa* 2016/4, S. 168-171.

Ponert J., Vosolsobě S., Lipavská H., Knotková K., 2011: European orchid cultivation-From seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences* 1, S. 95-107.

Popelářová M., Ohryzková L., 2013: Vzácné rostliny Beskyd. ČSOP Salamandr, Rožnov pro Radhoštěm.

Prizão C. E., Gonçalves M. L., Gutierre M. A. M., Mangolin A. C., Machado S. P. F. M., 2012: Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double-hybrid ‘BLC Pastoral Innocence’. *Acta Scientiarum. Agronomy* 34, S. 157-161.

Procházka F., 1980: Naše orchideje. Krajské muzeum východních Čech, Pardubice.

Procházka F., Velíšek V., 1983: Orchideje naší přírody. Academia, Praha.

Průša D., 2005: Orchideje České republiky. Computer Press, Brno.

Průša D., 2019: Orchideje České republiky 2. rozšířené vydání. CPress, Brno.



Půbal D., 2006: Rozšíření ohrožených a zvláště chráněných druhů cévnatých rostlin ve východní části Boubínsko-stožecké hornatiny a v přiléhajícím Šumavsko-novohradském podhůří. *Silva Gabreta* 12, S. 57-94.

Rasmussen H. N., 1995: *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge.

Roach A. D., Wulff D. R., 1987: Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, S. 209-235.

Sarasan V., Cripps R., Ramsay M. M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J. K., 2006: Conservation *In vitro* of threatened plants—Progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42, S. 206-214.

Seaton P. T., Hu H., Perner H., Pritchard H. W., 2010: Ex Situ Conservation of Orchids in a Warming World. *The Botanical Review* 76, S.193-203.

Shin Y., Baque A., Elghamedi S., Lee E., Paek K., 2011: Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pre-treatments on *in vitro* germination and protocorm formation of *Calanthe* hybrids. *Australian Journal of Crop Science* 5, S. 582–588.

Sonkoly J., Vojtko A., Tokoliy J., Torok P., Sramko G., Illyes Z., Molnár A., 2016: Higher seed number compensates for lower fruit set in deceptive orchids. *Journal of Ecology* 104, S. 343-351.

Stewart S. L., Kane M. E., 2006: Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86, S. 147-158.

Šebánek J., eds., 1983: *Fyziologie rostlin*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Thomas T. D., 2008: The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26, S. 618–631.

Vejsadová H., 2006: Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. *Acta biologica cracoviensia Series Botanica* 48, S. 109-113.

Vejsadová H., 2009: Ex situ cultivation of endangered species *Platanthera bifolia* (L.) L. C. Richard. In: Baroš, A., Barošová, I., Businský, R., eds.: *Acta Pruhoniciana* 93, Kolektiv autorů, Průhonice. S. 31-35.

Zeng S., Zhang Y., Wu K., Teixeira da Silva J. A., 2013: Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cypripedium*. *Critical Reviews in Biotechnology* 34, S. 358-371.

Znаниеcka J., Lojkowska E., 2004: Establishment of in vitro culture collection of endangered european orchids. Bulletin of Botanical Gardens 13, S. 69-73.

## Internetové zdroje

Anonymus, 1: Plán péče o přírodní památku Ptáčovské rybníky na období 2012-2021 návrh na vyhlášení (online) [cit. 2022.01.30] <[https://mokrady.wbs.cz/historie\\_tuni/ptacovskerybniky-planpece.pdf](https://mokrady.wbs.cz/historie_tuni/ptacovskerybniky-planpece.pdf)>.

Anonymus, 2: Sládková stráž PP (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://www.cestyapamatky.cz/kolinsko/dobrichov/sladkova-stran-pp>>.

Anonymus, 3: Přírodní památka oborská louka (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://www.cesky-raj.cz/priroda/prirodni-pamatky/oborska-luka/>>.

Anonymus, 4: Plán péče o přírodní památku Na hadovně na období 2017-2026 (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://www.kr-kralovehradecky.cz/assets/krajsky-urad/ziv-prostredi-zemedelstvi/aktuality/ochrana-prirody/Na-Hadovne-plan-pece-2017-2026.pdf>>.

Anonymus, 5: Vstavačovité – Orchideaceae (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <[https://www.sci.muni.cz/bot\\_zahr/media/pdf/clanky/Vstavacovite.pdf](https://www.sci.muni.cz/bot_zahr/media/pdf/clanky/Vstavacovite.pdf)>.

Anonymus, 2002: Strategie ochrany přírody ex situ (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://nakladatelstvi.portal.cz/nakladatelstvi/aktuality/79764>>.

Anonymus, 2014: Dlouhopolsko – slatinné louky u Dlouhopolského rybníka (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://www.jarojaromer.cz/spolek/dlouhopolsko/>>.

Anonymus, 2016: Přírodní rezervace Vladař (online) [cit. 2021.12.01], dostupné z <<https://prirodaceska.cz/pr-vladar/>>.

AOPK, 2018: Rozbory CHKO Český kras k 30. 6. 2018 (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://ceskykras.ochranaprirody.cz/res/archive/074/070898.pdf?seek=1581680438>>.

AOPK, ©2022a: Charakteristika CHKO Bílé Karpaty (online) [cit. 2022.01.26], dostupné z <<https://bilekarpaty.ochranaprirody.cz/charakteristika-oblasti/>>.

AOPK, ©2022b: Velký a Malý Tisý (národní přírodní rezervace) (online) [cit. 2021.12.01], dostupné z <<https://trebonsko.ochranaprirody.cz/maloplosna-zvlaste-chranena-uzemi/velky-a-maly-tisy-npr/>>.

AOPK, ©2022c: Národní přírodní památka Komorní hůrka (online) [cit. 2022.01.28], dostupné z <<https://www.ochranaprirody.cz/lokality/?idlokality=182>>.

AOPK, ©2022d: Přírodní památka Hořečková louka na Pile (online) [cit. 2022.01.28], dostupné z <<https://www.ochranaprirody.cz/lokality/?idlokality=2262>>.

AOPK, ©2022e: Flora (online) [cit. 2022.01.29], dostupné z <<https://slavkovskyles.ochranaprirody.cz/charakteristika-oblasti/flora/>>.

AOPK, ©2022f: Národní přírodní památka Slatinná louka u Velenky (online) [cit. 2022.01.29], dostupné z <<https://kokorinsko.ochranaprirody.cz/mzchu/npp-slatinna-louka-u-velenky/>>.

AOPK, ©2022g: Souhrn doporučených opatření pro evropsky významnou lokalitu Milovice - Mladá (online) [cit. 2022.01.29], dostupné z <<https://strednicechy.ochranaprirody.cz/res/archive/106/014674.pdf?seek=13>>.

Cibulka R., 2015: Dyjsko-svratecký úval, Rendezvous-národní přírodní památka (online) [cit 2021.12.01] dostupné z <<https://botany.cz/cs/rendezvous/>>.

ČSOP Kněžice, 2017: PP Kamenný vrh (TR) (online) [cit 2021.12.01] dostupné z <<http://www.csopknezice.cz/lokality/pp-kamenny-vrch-tr/>>.

Hrčka D., 2013: Andělské schody – přírodní rezervace (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://salvia-os.cz/andelske-schody/>>.

Hroneš M., 2008: Mazurovy chalupy – přírodní rezervace (online) [2022.01.30], dostupné z <<http://www.naturabohemica.cz/mazurovy-chalupy/>>.

CHKO Český ráj, 2004: Výroční zpráva 2004 Chráněná krajinná oblast Český ráj (online) [2022.01.30], dostupné z <<https://ceskyraj.ochranaprirody.cz/res/archive/092/013230.pdf?seek=1371801482>>.

Kostiuková J., 2022: Orchis morio Linaeus – vstavač kukačka (online) [cit. 2022.02.10] dostupné z <[https://portal.nature.cz/publik\\_syst/nd\\_nalez-public.php?idTaxon=38459](https://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=38459)>.

Kraj Vysočina, 1: Křižník (online) [cit. 2022.01.29], dostupné z <[http://www.dedictvivysociny.cz/priroda/zvlaste\\_chranena\\_uzemi-11/prirodni\\_pamatka-39/?id=1612](http://www.dedictvivysociny.cz/priroda/zvlaste_chranena_uzemi-11/prirodni_pamatka-39/?id=1612)>.

Kraj Vysočina, 2: Nad koupalištěm (online) [cit. 2022.01.29], dostupné z <[http://www.dedictvivysociny.cz/priroda/zvlaste\\_chranena\\_uzemi-11/prirodni\\_pamatka-39/?id=522](http://www.dedictvivysociny.cz/priroda/zvlaste_chranena_uzemi-11/prirodni_pamatka-39/?id=522)>.

Kraj Vysočina, 3: Švařec (online) [cit. 2022.01.29], dostupné z <[http://www.dedictvivysociny.cz/priroda/zvlaste\\_chranena\\_uzemi-11/narodni\\_prirodni\\_pamatka-37/?id=524](http://www.dedictvivysociny.cz/priroda/zvlaste_chranena_uzemi-11/narodni_prirodni_pamatka-37/?id=524)>.

Moravec L., 2011: (online) [cit. 2022.03.29], dostupné z <<https://itras.cz/pastviste-u-finu/>>.

Morávková D., 2015: Oznámení návrhu na vyhlášení přírodní památky Kozének a jejího ochranného pásma, oznámení o možnosti seznámit se snávrhem plánu péče o ni Část I. Oznámení návrhu na vyhlášení přírodní památky Kozének (online) [cit. 2022.29.01] dostupné z <<https://adoc.pub/a-jejeho-ochranneho-pasma-oznameni-omonosti-seznamit-se-s-n.html>>.

MŽP, ©2014: Koncepce záchranných programů a programů péče zvláště chráněných druhů živočichů a rostlin v České republice (online) [cit. 2022.29.01] dostupné z <[https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/programy\\_pece/\\$FILE/ODOIMZ\\_koncepce\\_20170905.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/programy_pece/$FILE/ODOIMZ_koncepce_20170905.pdf)>.

Němec R., 2012: V Podyjí rozkvetly první letošní orchideje. Prohlédněte si je na vřesovišti i na výstavě v muzeu (online) [2021.11.21] dostupné z <<https://www.nppodyji.cz/v-podyji-rozkvetly-prvni-letosni-orchideje-prohlednete-si-je>>.

Ochoz u Tišnova, 2020: Plán péče o přírodní památku Dobrá studně na období 2020–2029 [cit. 2021.12.01] dostupné z <[https://www.ochozutisnova.cz/assets/File.ashx?id\\_org=10944&id\\_dokumenty=3345](https://www.ochozutisnova.cz/assets/File.ashx?id_org=10944&id_dokumenty=3345)>.

Rešlová A., 2010: Plán péče o přírodní památku Vstavačová louka (online) [cit. 2021.12.01] dostupné z <<http://docplayer.cz/29326773-Plan-pece-o-prirodni-pamatku-vstavacova-louka-na-obdobi.html>>.

Rumplíková M., 2009: Flora (online) [2021.11.21], dostupné z <<https://www.mesto-slavicin.cz/cs/informacni-centrum/turisticke-informace/priroda-na-slavicinsku/flora.html>>.

Sagittaria, ©2010a: Přírodní rezervace Malý Kosíř (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<http://www.sagittaria.cz/cs/prirodni-rezervace-maly-kosir>>.

Sagittaria, ©2010b: Přírodní rezervace Blatka (online) [cit. 2022.01.30] dostupné z <<http://www.sagittaria.cz/cs/prirodni-rezervace-blatka>>.

Sagittaria, ©2010c: Vstavač kukačka (orchis morio) (online) [cit. 2022.02.10], dostupné z <[http://www.sagittaria.cz/cs/vstavac-kukacka-\(orchis-morio\)](http://www.sagittaria.cz/cs/vstavac-kukacka-(orchis-morio))>.

Stejskal R., 2012: Suché trávníky a vřesoviště (online) [2021.11.21], dostupné z <<https://www.nppodyji.cz/suche-travniky>>.

Střelec M., 2018: Plán péče o přírodní památku V polích na období 2018-2027 (online) [2021.11.21], dostupné z <[https://zp.kraj-jihocesky.cz/\\_files/f615/files/pp/v\\_polich\\_2018-2027\\_final.pdf](https://zp.kraj-jihocesky.cz/_files/f615/files/pp/v_polich_2018-2027_final.pdf)>.

Trnka F., 2010: Vápenice – Přírodní památka (online) [2022.01.30], dostupné z <<http://www.naturabohemica.cz/vapenice/>>.

Valtr P., 2018: Územní plán Klatovy – změna č.1 (online) [2021.01.21], dostupné z <[https://www.klatovy.cz/mukt/user/odborvur/klatovy/up\\_klatovy-navrh\\_z01-sea.pdf](https://www.klatovy.cz/mukt/user/odborvur/klatovy/up_klatovy-navrh_z01-sea.pdf)>.

Vítková Z., 2011: Proč chránit přírodu? Protože se nám líbí rezervace (online) [cit. 2022.01.30], dostupné z <<https://ekolist.cz/cz/zpravodajstvi/zpravy/proc-chranit-prirodu-protoze-se-nam-libi>>.

Zimová E., 2010: Koncepce ochrany přírody jihomoravského kraje I. Analytická část (online) [cit 2021.11.22] dostupné z <<https://docplayer.cz/119537594-Koncepce-ochrany-prirody-jihomoravskeho-kraje-i-analyticka-cast-7-soustava-natura-2000-priloha-charakteristiky-evropsky-vyznamnych-lokalit.html>>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021a: Přírodní památka Ružděcký vesník (online) [cit. 2021.11.19], dostupné z <<https://nature.hyperlink.cz/ruzdecky-vesnik.php>>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021b: Přírodní rezervace Hutě (online) [cit. 2021.11.19], dostupné z <<https://nature.hyperlink.cz/uh/Hute.htm>>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021c: Přírodní památka U Petřůvky (online) [cit. 2021.11.19], dostupné z <<https://nature.hyperlink.cz/u-petruvky.php>>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021d: Přírodní rezervace Bílé potoky (online) [cit 2021.11.21] dostupné z <[https://nature.hyperlink.cz/zlinsko/Bile\\_potoky.htm](https://nature.hyperlink.cz/zlinsko/Bile_potoky.htm)>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021e: Přírodní rezervace Javorůvky (online) [cit 2021.11.21] dostupné z <<https://nature.hyperlink.cz/zlinsko/Javoruvky.htm>>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021f: Přírodní rezervace Horní louky (online) [cit 2021.11.22] dostupné z <[https://nature.hyperlink.cz/uh/Horni\\_louky.htm](https://nature.hyperlink.cz/uh/Horni_louky.htm)>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021g: Přírodní památka V Krátkých (online) [cit 2021.11.22] dostupné z <[https://nature.hyperlink.cz/uh/V\\_kratkych.htm](https://nature.hyperlink.cz/uh/V_kratkych.htm)>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021h: Přírodní památka Dubiny (online) [cit 2021.11.22] dostupné z <<https://nature.hyperlink.cz/uh/Dubiny.htm>>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021ch: Přírodní památka Mechnáčky (online) [cit 2021.11.22] dostupné z <<https://nature.hyperlink.cz/uh/Mechnacky.htm>>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021i: Přírodní rezervace Kútky (online) [cit 2021.12.01] dostupné z <[https://nature.hyperlink.cz/Bile\\_Karpaty/Kutky.htm](https://nature.hyperlink.cz/Bile_Karpaty/Kutky.htm)>.

ZO ČSOP Via Hulín, ©2021j: Přírodní památka Horky (online) [cit 2021.12.01] dostupné z <<https://nature.hyperlink.cz/Ho/Horky.htm>>.

## **Ostatní zdroje**

Figura T., Ponert J., 2017: Metodika rozmnožování rostlin podčeledi *Pyroloideae* (hruštičkové) asymbiotickým výsevem *in vitro*. Certifikovaná metodika. Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK. Praha, S. 13.

Hradilík J., 1998: Fyziologie rostlin: návody do cvičení. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta, Brno, S. 183.

Hradilík, J., 2005: Rostlinné explantáty. Mendelova univerzita, Brno. s 83

Kováč J., 1991: Kapitoly z rostlinné fyziologie. Univerzita J. E. Purkyně, fakulta pedagogická, Ústí nad Labem, S. 157.

Kováč J., 1992: Explantátové kultury rostlin. Univerzita J. E. Purkyně, fakulta pedagogická, Ústí nad Labem, S. 146.

Vosolobě S., 2005: Asymbiotický výsev středoevropských orchidejí. Gymnázium U Balvanu 16, Jablonec nad Nisou, S. 45.

VŠÚO, 1: Metodické listy OPVK. Využití moderních *in vitro* biotechnologií v ovocnářství. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy, S. 9.

## Seznam obrázků

Obrázek 1: *Anacamptis morio* (Dohnal, J., 1971: *Orchis morio* vstavač kukačka (online) [cit 2022.03.15] dostupné z <[https://www.botanickafotogalerie.cz/cz/Orchis\\_morio/](https://www.botanickafotogalerie.cz/cz/Orchis_morio/)>

Obrázek 2: Květ *Anacamptis morio* (Jeřábková, H., 2021: *Rostlina roku 2021: vstavač kukačka* (video) (online) [cit 2022.03.15] dostupné z <[https://botanospol.cz/cs/node/6383?fbclid=IwAR2j0JHS2V7AvWs03eVR35UsIKqJo-VfyXFAjXAZdkhAs5AUCw5YdW\\_cBwo](https://botanospol.cz/cs/node/6383?fbclid=IwAR2j0JHS2V7AvWs03eVR35UsIKqJo-VfyXFAjXAZdkhAs5AUCw5YdW_cBwo)>

Obrázek 3: Fenologie *Anacamptis morio* (Jersáková, J., Průša, D., 2021: *Rostlina roku 2021 – vstavač kukačka* (online) [cit 2022.03.15] dostupné z <<https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/rostlina-roku-2021-vstavac-kukacka.pdf>>

Obrázek 4: Mapa výskytu (AOPK, 2022: *Výskyt druhu *Orchis morio* podle záznamů v ND OP* (online) [cit 2022.03.15] dostupné z <[https://portal.nature.cz/nd-dev/nd\\_atlas\\_mapa\\_q\\_nova.php?idTaxon=38459](https://portal.nature.cz/nd-dev/nd_atlas_mapa_q_nova.php?idTaxon=38459)>

Obrázek 5: Fáze klíčivosti (Stewart, L., Zettler, L., 2002 (online) [cit 2022.03.15] dostupné z <<https://www.semanticscholar.org/paper/Symbiotic-germination-of-three-semi-aquatic-rein-H.-Stewart-Zettler/6d8c6268006f5017b9ad147fbacfa0d21805c10c>>

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled makroelementů v komerčních médiích.....	37
Tabulka 2: Přehled mikroelementů v komerčních médiích .....	37
Tabulka 3: Fitness jedinců .....	45
Tabulka 4: Složení médií .....	46
Tabulka 5: Porovnání jedinců na médiích.....	50
Tabulka 6: Procentuální úspěšnost.....	56
Tabulka 7: Porovnání vyvinutých a vyklíčených semen u jednotlivých jedinců zařazených do skupin dle fitness.....	57
Tabulka 8: Porovnání médií u všech rostlin.....	58
Tabulka 9: Procentuální klíčivost podle výšky rostlin.....	60
Tabulka 10: Procenta vyklíčených semen v protokorm podle výšky rostlin .....	60
Tabulka 11: Korelační matice .....	61



## Seznam grafů

Graf 1: Rostlina č. 6 – vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 85 %, b=médium č. 4 – 68 %, c=médium č. 5 – 59 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií) .....	51
Graf 2: Rostlina č. 2 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 71 %, b=médium č. 4 – 52 %, c=médium č. 5 – 40 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií) .....	51
Graf 3: Rostlina č. 4 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 84 %, b=médium č. 5 – 61 %, c=médium č. 4 – 50 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií) .....	52
Graf 4: Rostlina č. 5 - vliv média na počet vytvořených protokormů,, a= médium č. 6 - 66 %, aa=médium č. 4 – 62 %, c=médium č. 5 – 42 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 6 a č. 4).....	52
Graf 5: Rostlina č. 7 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 30 %, b=médium č. 5 – 24 %, c=médium č. 4 – 15 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií) .....	53
Graf 6: Rostlina č. 8 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 30 %, b=médium č. 4 – 15 %, c=médium č. 5 – 7 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií) .....	53
Graf 7: Rostlina č. 3 - vliv média na počet vytvořených protokormů,, a= médium č. 5 - 15 %, ab=médium č. 6 – 12 %, b=médium č. 4 – 9 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 4 a č.6; č. 5 a č. 6) .....	54
Graf 8: Rostlina č. 1 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 36 %, b=médium č. 4 – 22 %, bb=médium č. 5 – 18 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 4 a č. 5).....	55
Graf 9: Rostlina č. 9 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 40 %, aa=médium č. 5 – 36 %, c=médium č. 4 – 28 % (p-hodnota > 0,05 u médií č. 6 a č. 5).....	55
Graf 10: Rostlina č.10 - vliv média na počet vytvořených protokormů, a= médium č. 6 - 53 %, b=médium č. 5 – 37 %, bb=médium č. 4 – 26 % (p-hodnota < 0,05 u všech médií) .....	56
<i>Graf 11: Porovnání médií u všech rostlin, a= médium č. 6–50 %, b= médium č. 4–35 %, bb=médium č. 5-34 % (p-hodnota &gt; 0,05 u média č. 4 a č. 5) .....</i>	<i>58</i>
Graf 12: Průměrný počet protokormů v závislosti na fitness.....	61

## Přílohy



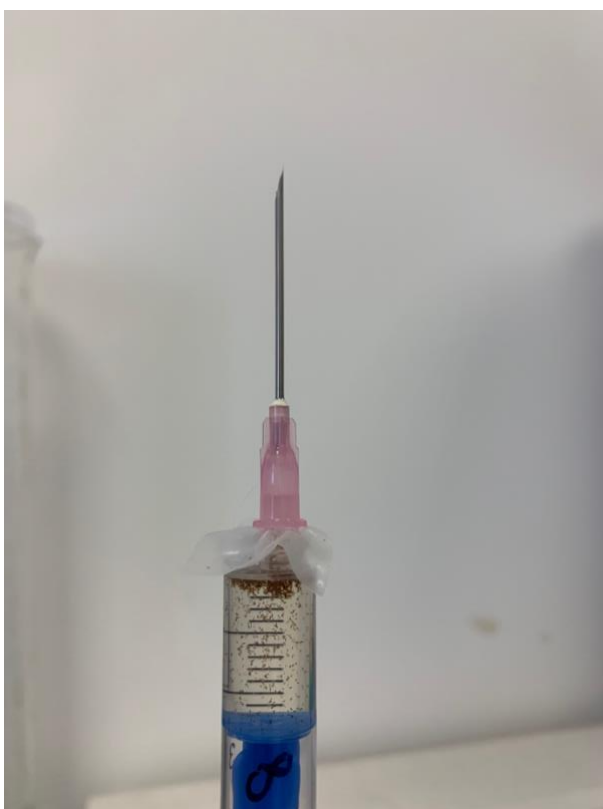
Obrázek 6: Flow box



Obrázek 7: Tobolka se semeny



Obrázek 8: Průběh sterilizace I.



Obrázek 9: Průběh sterilizace II.



Obrázek 10: Hotová kultivační média



Obrázek 11: Kultivační média v Petriho miskách



Obrázek 12: Výsevy semen



Obrázek 13: Binolupa – počítání vyklíčených semen v protokorm





Obrázek 14: Kultivace semen v kultivačním boxu



Obrázek 15: Protokormy rostliny č.6 na médiu BM-1



Obrázek 16: Protokormy rostliny č. 6 na médiu s kinetinem



Obrázek 17: Protokormy rostliny č. 6 na médiu s aktivním uhlím

Tabulka 12: Porovnání všech rostlin - ANOVA ( $p$ -hodnota < 0.5), Tuckeyho pos hoc test ( $p$ -hodnota < 0.05)

číslo rostliny	ANOVA						p-hodnota Tuckey post hoc test		
		Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota	4-5	4-6	5-6
1	Meziskupinová	1029,778	2	514,889	23,607	0,000	0,326	0,000	0,000
	Vnitroskupinová	327,167	15	21,811					
2	Meziskupinová	2977,444	2	1488,722	34,801	0,000	0,010	0,001	0,000
	Vnitroskupinová	641,667	15	42,778					
3	Meziskupinová	102,333	2	51,167	4,260	0,034	0,027	0,400	0,283
	Vnitroskupinová	180,167	15	12,011					
4	Meziskupinová	3506,778	2	1753,389	38,887	0,000	0,034	0,000	0,000
	Vnitroskupinová	676,333	15	45,089					
5	Meziskupinová	1963,111	2	981,556	22,536	0,000	0,000	0,507	0,000
	Vnitroskupinová	653,333	15	43,556					
6	Meziskupinová	2097,444	2	1048,722	55,067	0,000	0,008	0,000	0,000
	Vnitroskupinová	285,667	15	19,044					
7	Meziskupinová	693,778	2	346,889	36,176	0,000	0,000	0,000	0,024
	Vnitroskupinová	143,833	15	9,589					
8	Meziskupinová	1636,000	2	818,000	30,334	0,000	0,044	0,000	0,000
	Vnitroskupinová	404,500	15	26,967					
9	Meziskupinová	464,333	2	232,167	12,085	0,001	0,013	0,001	0,312
	Vnitroskupinová	288,167	15	19,211					
10	Meziskupinová	2152,111	2	1076,056	49,972	0,000	0,002	0,000	0,000
	Vnitroskupinová	323,000	15	21,533					

Tabulka 13: Porovnání všech médií - ANOVA ( $p$ -hodnota < 0.001) Tuckeyho post hoc test ( $p$ -hodnota < 0.001)

ANOVA						Tuckey post hoc test		
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota	4-5	4-6	5-6
Meziskupinová	10568,544	2	5284,272	11,614	0,000	0,980	0,000	0,000
Vnitroskupinová	80532,450	177	454,986					



Tabulka 14: ANOVA - Rostlina č. 1

ANOVA – rostlina č. 1					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	1029,778	2	514,889	23,607	0,000
Vnitroskupinová	327,167	15	21,811		
Celkem	1356,944	17			

Tabulka 15: Rostlina č. 1 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	1	28
	1	16
	1	27
	1	21
	1	18
	1	21
5	1	22
	1	17
	1	21
	1	14
	1	15
	1	18
6	1	44
	1	38
	1	27
	1	34
	1	33
	1	37

Tabulka 16: ANOVA - Rostlina č. 2

ANOVA – rostlina č. 2					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	2977,444	2	1488,722	34,801	0,000
Vnitroskupinová	641,667	15	42,778		
Celkem	3619,111	17			

Tabulka 17: Rostlina č. 2 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	2	38
	2	52
	2	64
	2	58
	2	55
	2	47
5	2	35
	2	38
	2	46
	2	42
	2	40
	2	36
6	2	68
	2	72
	2	62
	2	74
	2	78
	2	71

Tabulka 18: ANOVA - Rostlina č. 3

ANOVA – rostlina č. 3					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	102,333	2	51,167	4,260	0,034
Vnitroskupinová	180,167	15	12,011		
Celkem	282,500	17			

Tabulka 19: Rostlina č. 3 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	3	10
	3	11
	3	5
	3	8
	3	11
	3	9
5	3	11
	3	23
	3	12
	3	14
	3	16
	3	13
6	3	15
	3	7
	3	15
	3	13
	3	12
	3	8

Tabulka 20: ANOVA - Rostlina č. 4

ANOVA – rostlina č. 4					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	3506,778	2	1753,389	38,887	0,000
Vnitroskupinová	676,333	15	45,089		
Celkem	4183,111	17			

Tabulka 21: Rostlina č. 4 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
<b>4</b>	4	55
	4	65
	4	44
	4	38
	4	47
	4	51
<b>5</b>	4	64
	4	53
	4	61
	4	65
	4	67
	4	55
<b>6</b>	4	87
	4	84
	4	88
	4	80
	4	78
	4	84

Tabulka 22: ANOVA - Rostlina č. 5

ANOVA – rostlina č. 5					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	1963,111	2	981,556	22,536	0,000
Vnitroskupinová	653,333	15	43,556		
Celkem	2616,444	17			

Tabulka 23: Rostlina č. 5 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	5	64
	5	57
	5	68
	5	66
	5	55
	5	60
5	5	38
	5	46
	5	50
	5	36
	5	42
	5	40
6	5	58
	5	70
	5	80
	5	56
	5	64
	5	68

Tabulka 24: ANOVA - Rostlina č. 6

ANOVA – rostlina č. 6					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	2097,444	2	1048,722	55,067	0,000
Vnitroskupinová	285,667	15	19,044		
Celkem	2383,111	17			

Tabulka 25: Rostlina č. 6 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	6	70
	6	63
	6	68
	6	62
	6	71
	6	74
5	6	66
	6	62
	6	56
	6	53
	6	58
	6	60
6	6	81
	6	85
	6	91
	6	82
	6	84
	6	88

Tabulka 26: ANOVA - Rostlina č. 7

<b>ANOVA – rostlina č. 7</b>					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	693,778	2	346,889	36,176	0,000
Vnitroskupinová	143,833	15	9,589		
Celkem	837,611	17			

Tabulka 27: Rostlina č. 7 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
<b>4</b>	7	11
	7	14
	7	15
	7	14
	7	18
	7	15
<b>5</b>	7	28
	7	20
	7	26
	7	25
	7	22
	7	24
<b>6</b>	7	34
	7	29
	7	33
	7	31
	7	26
	7	24

Tabulka 28: ANOVA - Rostlina č. 8

ANOVA – rostlina č. 8					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	1636,000	2	818,000	30,334	0,000
Vnitroskupinová	404,500	15	26,967		
Celkem	2040,500	17			

Tabulka 29: Rostlina č. 8 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	8	15
	8	24
	8	12
	8	9
	8	11
	8	16
5	8	16
	8	9
	8	5
	8	6
	8	0
	8	3
6	8	28
	8	36
	8	24
	8	25
	8	31
	8	33



Tabulka 30: ANOVA - Rostlina č. 9

ANOVA – rostlina č. 9					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	464,333	2	232,167	12,085	0,001
Vnitroskupinová	288,167	15	19,211		
Celkem	752,500	17			

Tabulka 31: Rostlina č. 9 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	9	26
	9	24
	9	25
	9	28
	9	31
	9	32
5	9	36
	9	35
	9	35
	9	30
	9	42
	9	38
6	9	36
	9	38
	9	49
	9	34
	9	38
	9	44

Tabulka 32: ANOVA - Rostlina č. 10

ANOVA – rostlina č. 10					
	Součet čtverců	df	Mean Square	F	p-hodnota
Meziskupinová	2152,111	2	1076,056	49,972	0,000
Vnitroskupinová	323,000	15	21,533		
Celkem	2475,111	17			

Tabulka 33: Rostlina č. 10 - počet protokormů

číslo média	univerz. číslo	počet protokormů ze 100 semen
4	10	20
	10	24
	10	30
	10	32
	10	28
	10	23
5	10	30
	10	45
	10	36
	10	39
	10	42
	10	32
6	10	57
	10	51
	10	48
	10	55
	10	52
	10	54

## Seznam příloh

### Obrázky

Obrázek 7: Tobolka se semeny .....	81
Obrázek 8: Průběh sterilizace I. ....	82
Obrázek 9: Průběh sterilizace II. ....	82
Obrázek 10: Hotová kultivační média.....	83
Obrázek 11: Kultivační média v Petriho miskách.....	83
Obrázek 12: Výsevy semen.....	84
Obrázek 13: Binolupa – počítání vyklíčených semen v protokorm.....	84
Obrázek 14: Kultivace semen v kultivačním boxu .....	85
Obrázek 15: Protokormy rostliny č.6 na médiu BM-1.....	85
Obrázek 16: Protokormy rostliny č. 6 na médiu s kinetinem.....	86
Obrázek 17: Protokormy rostliny č. 6 na médiu s aktivním uhlím .....	86

### Tabulky

Tabulka 12: Porovnání všech rostlin - ANOVA (p-hodnota < 0.5), Tuckeyho post hoc test (p-hodnota < 0.05) .....	87
Tabulka 13: Porovnání všech médií - ANOVA (p-hodnota < 0.001) Tuckeyho post hoc test (p-hodnota < 0.001) .....	87
Tabulka 14: ANOVA - Rostlina č. 1.....	88
Tabulka 15: Rostlina č. 1 - počet protokormů.....	88
Tabulka 16: ANOVA - Rostlina č. 2.....	89
Tabulka 17: Rostlina č. 2 - počet protokormů.....	89
Tabulka 18: ANOVA - Rostlina č. 3.....	90
Tabulka 19: Rostlina č. 3 - počet protokormů.....	90
Tabulka 20: ANOVA - Rostlina č. 4.....	91

Tabulka 21: Rostlina č. 4 - počet protokormů.....	91
Tabulka 22: ANOVA - Rostlina č. 5.....	92
Tabulka 23: Rostlina č. 5 - počet protokormů.....	92
Tabulka 24: ANOVA - Rostlina č. 6.....	93
Tabulka 25: Rostlina č. 6 - počet protokormů.....	93
Tabulka 26: ANOVA - Rostlina č. 7.....	94
Tabulka 27: Rostlina č. 7 - počet protokormů.....	94
Tabulka 28: ANOVA - Rostlina č. 8.....	95
Tabulka 29: Rostlina č. 8 - počet protokormů.....	95
Tabulka 30: ANOVA - Rostlina č. 9.....	96
Tabulka 31: Rostlina č. 9 - počet protokormů.....	96
Tabulka 32: ANOVA - Rostlina č. 10.....	97
Tabulka 33: Rostlina č. 10 - počet protokormů.....	97