

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
katedra biologie

Studium klíčení a generativní reprodukce vstavače obecného (*Orchis morio*)
v laboratorních a přírodě blízkých podmínkách

Bakalářská práce

Autor: Kateřina Valentová
Studijní program: B1501 / Biologie
Studijní obor: 1501R015 / Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: RNDr. Romana Prausová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne 15.4.2022

.....

Kateřina Valentová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Romaně Prausové, Ph.D. za odborné vedení, cenné informace, věnovaný čas, trpělivost a pomoc při zpracování této bakalářské práce.

ANOTACE

VALENTOVÁ, K. *Studium klíčení a generativní reprodukce vstavače obecného (Orchis morio) v laboratorních a přírodě blízkých podmínkách*. Hradec Králové, 2022. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 58 p.

Bakalářská práce se zabývá silně ohroženým druhem vstavačovitě rostliny *Anacamptis morio*, dříve známým pod názvem *Orchis morio*, jejíž česká populace značně klesá, jak v počtu lokalit, tak ve velikosti lokálních populací. Na východočeských lokalitách probíhají záchranné aktivity, které spočívají v citlivé péči o poslední populace na konkrétních lokalitách. Pozornost je věnována též pěstování druhu v kultuře za účelem zpětného vysazení druhu na lokalitách, kde populace vymizely nebo tam zůstávají jejich fragmenty neschopné samostatné existence. Kromě jarního monitoringu na lokalitách PR Mazurovy chalupy, Dvořisko, PP U Vinic, PP Vstavačová louka u Chocně a Chvojenec u Smilku se tato práce věnuje též laboratornímu testování klíčivosti semen pocházejících z jedinců z kultury založené z populací na lokalitách Mazurovy chalupy, Dvořisko a jejich kříženců. Předpokládá se, že zjištěná data budou využita v záchranných aktivitách na zkoumaných lokalitách, zejména v dlouhodobě monitorované lokalitě přírodní rezervace Mazurovy chalupy.

KLÍČOVÁ SLOVA

rudohlávek kukačka (*Anacamptis morio*), monitoring, klíčivost semen, morfologie

ANNOTATION

VALENTOVÁ, K. *Study of germination and generative reproduction of Orchis morio in laboratory and natural conditions*. Hradec Králové, 2022. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 58 p.

This bachelor thesis is focused on endangered species of plant *Anacamptis morio*, belonging to the family of *Orchidaceae*, formerly known as *Orchis morio*, whose population is declining considerably in the Czech Republic. In East Bohemia, rescue activities are taking place, which consist on intensive care for the last populations in specific locations. Attention is also devoted to the culture of this species because of its reintroduction in locations where populations have disappeared or where their fragments have remained incapable of independent existence. Except to the spring monitoring at the locations PR Mazurovy Chalupy, Dvořisko, PP U Vinic, PP Vstavačová louka u Chocně and Chvojenec u Smilek, this work also deals with laboratory testing of the seed germination. Seed originate from the culture established of individuals those seeds came from the locations Mazurovy Chalupy, Dvořisko. It is assumed that the obtained data will be used in rescue activities at the observed locations, especially in the long-term monitored location of the Mazurovy chalupy nature reserve.

KEYWORDS

green-winged orchid, monitoring, seed germination, morphology

Obsah

1 Úvod	8
1.1 Obecný úvod do problematiky	8
1.2 Cíle práce	9
2 Obecný popis	10
2.1 Charakteristika druhu <i>Anacamptis morio</i>	10
2.1.1 Vstavačovité (<i>Orchidaceae</i>).....	10
2.1.2 Morfologie druhu	11
2.1.3 Morfologie semen	12
2.1.4 Příčiny ohrožení	13
2.1.5 Legislativa.....	13
2.2 Rozšíření a ekologie druhu <i>Anacamptis morio</i>	14
2.2.1 Rozšíření ve světě	14
2.2.2 Rozšíření v ČR.....	14
2.2.3 Sledované lokality	15
2.3.1 Fenologie.....	17
2.3.2 Opylovači.....	18
2.3.3 Mykorhiza	18
2.3.4 Rozmnožování a klíčení semen	20
3 Metodika	22
3.1. Monitoring populací na vybraných lokalitách.....	22
3.2 Sběr tobolek z uměle založených kultur.....	23
3.3 Pozorování tobolek a semen	23
3.4 Barvení živých částí semen.....	26
3.5 Založení in-vitro kultur.....	26
3.6 Zpracování výsledků.....	29
4 Výsledky	31
4.1 Monitoring populací ve východních Čechách v roce 2021	31
4.2 Zastoupení stupně vývinu semen v tobolkách.....	34
4.3 Rozměry pozorovaných semen a embryí	38
4.4 Zastoupení vývojových stádií v in-vitro kulturách	40
5 Diskuze	42

5.1 Východočeské populace rudohlávku kukačky (<i>Anacamptis morio</i>).....	42
5.2 Plody a semena rudohlávku kukačky (<i>Anacamptis morio</i>)	43
5.3 Kvalita semen rudohlávku kukačky (<i>Anacamptis morio</i>)	43
5.4 Klíčení semen rudohlávku kukačky (<i>Anacamptis morio</i>)	44
6 Závěr	45
7 Literatura	46
8 Přílohy.....	48

1 Úvod

1.1 Obecný úvod do problematiky

Biologie, ekologie rudohlávku kukačky a jeho schopnost generativní reprodukce je odborně zajímavé téma z důvodu velkého úbytku lokalit jeho výskytu nejen na území bývalého Východočeského kraje, ale taktéž ve světě. Rudohlávek kukačka (*Anacamptis morio*), donedávna známý jako vstavač kukačka, byl kdysi nejhojnějším druhem rodu *Orchis* na území České republiky. V termofytiku, mezofytiku a v nižších polohách oreofytika, ale zejména ve druhé polovině minulého století zaniklo 60–80 % lokalit s jeho výskytem. Vzhledem k razantnímu úbytku počtu jeho lokalit, ale také početnosti přežívajících populací, byl v Červeném seznamu ČR zařazen mezi kriticky ohrožené taxony. Déle podle IUCN patří mezi kriticky ohrožené druhy s negativním trendem v počtu populací, zatímco ve vyhlášce č. 395/1992 Sb. MŽP ČR je druh zařazen pouze do kategorie silně ohrožený. Na území Východočeského kraje, který dnes představuje Královéhradecký, Pardubický a část Libereckého kraje, bylo v minulosti známo 212 lokalit s výskytem druhu, ale začátku 90. let minulého století se jich dochovalo pouze 10 %. Rudohlávek kukačka má poměrně širokou ekologickou valenci. Je schopen růstu v mezických i mírně vlhkých podmínkách, na neutrálních, mírně kyselých i zásaditých půdách, ale je citlivý na zvýšený obsah iontů v půdě, proto ustupuje z eutrofizovaných lokalit, kde jsou užívána minerální hnojiva nebo živiny pronikají z okolí či atmosféry. Za hlavní příčinu ústupu je považován zánik jeho biotopů, který souvisí s velkoplošným zemědělským hospodařením, eutrofizací a změnami obhospodařování fragmentů volné krajiny. Hlavními podmínkami ovlivňujícími jeho reprodukci, fitness a životaschopnost jsou vlastnosti půdy, dostupnost vody a vztahy mezi organismy. Druh je také označován za všeobecně konkurenčně velmi slabý, lehce ho přerostou porosty trávy nebo trsnaté trávy, proto je pro něj důležité pravidelné kosení a odvoz usušené biomasy, případně disturbance způsobená zvířaty, která ovšem nesmí přicházet na stanoviště v častých intervalech.

1.2 Cíle práce

Hlavními cíli předložené práce bylo:

- 1) Zmonitorovat populace druhu na vybraných lokalitách ve východních Čechách.
- 2) Zaznamenat parametry pozorovaných tobolek, semen a embryí.
- 3) Zjistit zastoupení fází vývinu semen v tobolkách z lokalit Mazurovy chalupy, Dvořisko a jejich kříženců.
- 4) Zjistit schopnost generativní reprodukce druhu v laboratorních podmínkách za využití in-vitro kultur.

2 Obecný popis

2.1 Charakteristika druhu *Anacamptis morio*

2.1.1 Vstavačovité (*Orchidaceae*)

Rudohlávek kukačka (*Anacamptis morio*), dříve známý pod latinským jménem *Orchis morio*, patří do čeledi vstavačovité (*Orchidaceae*) (KOCIÁN 2006). Vědecké jméno mu přidelil zakladatel moderní nomenklatury Carl Linné, který ale rozdělil čeleď vstavačovitých na pouhých osm rodů. Vývoj pokračoval kupředu, a na základě podobnosti morfologických znaků další rody orchidejí přibývaly. V posledních dvaceti letech se ale rozvinula metoda molekulární fylogenetiky, díky které bylo odhaleno, že rudohlávek kukačka spolu s dalšími druhy nemohou být řazeny do jednoho rodu. Z genetických studií vychází pozice rudohlávků kukačky uvnitř rodu rudohlávek (*Anacamptis*) (JERSÁKOVÁ et PRŮŠA 2021).

Čeleď *Orchidaceae* je zastoupena zhruba 25 000 druhy po celém světě (PRŮŠA 2005). Na území České republiky je velká část druhů *Orchidaceae* v ohrožení a jedná se zhruba o 55 druhů (CHYTRÁ 2015). Hlavním důvodem úbytku je ztráta a změna přirozených stanovišť. Dalším podstatným nebezpečím jsou sběratelé, kteří orchideje vyhledávají pro jejich atraktivitu. Díky poměrně široké ekologické amplitudě je jejich výskyt kosmopolitní, od rovníkových oblastí až k pólům. Jejich výskyt je na stanovištích, jako jsou holá skaliska, potoky, vrcholky stromů, či na okraji pouští (SWARTS 2009). V této rozmanité čeledi nalezneme druhy epifytické i terestrické. V našich přírodních podmínkách rostou výhradně druhy terestrické, zatímco v oblastech tropických naopak druhy epifytické (PROCHÁZKA et VELÍSEK 1983). Rozmanitost čeledi vstavačovitých spočívá i v jejich formách výživy. Čeleď disponuje druhy autotrofními, mixotrofními a obligátně heterotrofními (PRŮŠA 2005). Dále všechny orchideje využívají symbiózu s mykorrhizními houbami, na které jsou některé druhy z důvodu nevytváření chlorofylu zcela závislé po celý svůj život (CHYTRÁ 2015).

Typické jsou i složité vztahy s opylovači, které vedou až k specializaci na jediného opylovače. Kvetení orchidejí v našich podmínkách nastává na začátku května, ale jejich kvetení v jednotlivých letech ovlivňuje mnoho faktorů. Dostatečné zásoby, požer podzemních částí rostliny či listů, nepříznivé počasí (horka spojená s nedostatkem vody nebo dlouhotrvající nízké teploty) a u některých jedinců i nadměrná reprodukce v předchozích letech. Tyto faktory mohou způsobit, že téměř žádné rostliny nevykvetou (JERSÁKOVÁ et KINDLMANN 2004). Nepříznivé podmínky zmíněné výše, jsou orchideje schopny přežívat ve stavu dormance, což je stav, kdy rostlina netvoří nadzemní orgány (KULL et ARDITTI 2002). Bylo také prokázáno, že při absenci seče přestává jedinec během dvou let kvést a přechází do sterilního či dormantního stavu v podobě hlízy. Vhodným managementem je pravidelná seč v období druhé poloviny června do konce srpna. Seč prováděná později by mohla poškodit nově vznikající listové růžice (JERSÁKOVÁ et KINDLMANN 2004). Autoři výzkumu ve východních Čechách (PRAUSOVÁ et al. 2021) ale

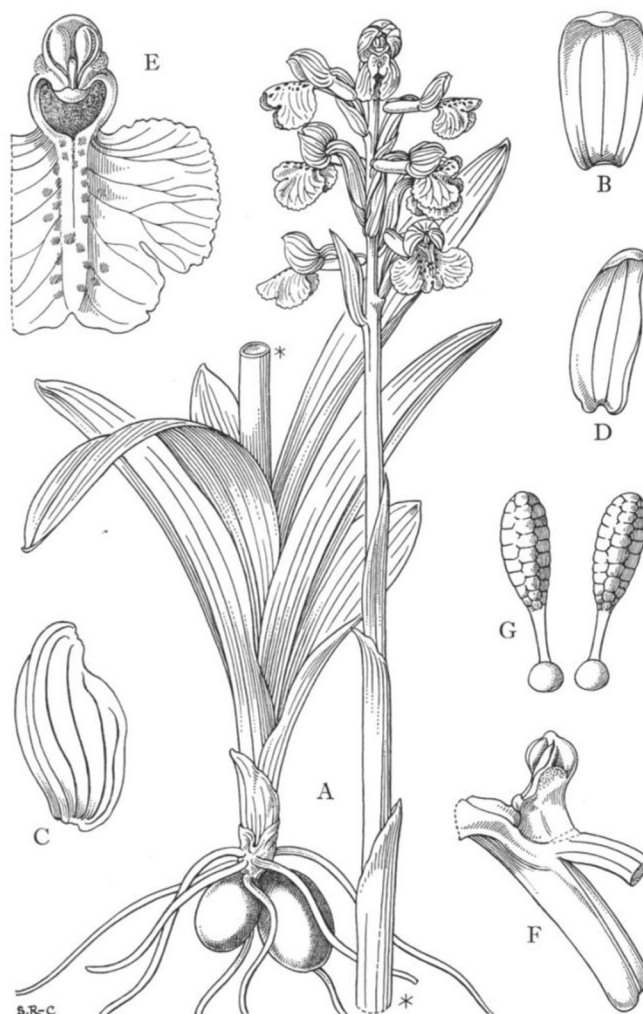
považují toto tvrzení za sporné, protože může být obtížné rozlišit dormantního jedince od jedince nového, který vznikl z dceřiné hlízy, nebo se semenáčkem náhodně rostoucím u původní mateřské rostliny, případně i se slabým sterilním jedincem s přehlédnutelnou zakrnělou částí listové růžice, který velmi rychle zatahuje nadzemní orgány.

2.1.2 Morfologie druhu

Anacamptis morio je vytrvalá 7–35 cm vysoká bylina, která vytváří kulovité až elipsoidní kořenové hlízy společně s krátkými a tlustými kořeny. PRŮŠA (2005) uvádí, že krátkost kořenů je pravděpodobně zapříčiněna mykorhizou, díky které nemusí být příjem minerálních látek z půdy tak vysoký. Zástupci druhu mají tmavozelenou, jemně rýhovanou lodyhu. Široce kopinaté až podlouhle vejčité listy, obvykle v počtu 7–12 dosahující délky až 20 cm, přisedají v podobě růžice na bázi lodyhy (PRŮŠA 2005). Listy na vrcholu špičaté nedosahují k bázi květenství (KUBÁT 2010).

Květenství v podobě klasu dosahuje délky až 13 cm, má tvar vejcovitý až válcovitý a disponuje 7–25 květy. Barva květů bývá růžová, nachová a vzácně i bílá (KUBÁT 2010). Zygomorfní neboli osově souměrné květy vyrůstají v úžlabí listenu a jsou téměř vždy oboupohlavné. Květ tvoří šest podlouhle vejčitých okvětních lístků o velikosti 8–10 mm, uspořádaných po třech do vnitřního a vnějšího kruhu. Pysk nebo také labellum je pouze jinak vyvinutý okvětní lístek z vnitřního kruhu, který je příčně ledvinitý až sedlovitě prohnutý (BAUMANN et al. 2009). Květní pysk má stejnou, nebo větší šířku než jeho délku. Trojlaločný pysk má okřídlené vnější okvětní lístky a tmavě skvrnitou centrální oblast (STROH 2015). Válcovitá, 8–11 mm dlouhá ostruha směřuje rovně, nebo je mírně zakřivena nahoru (MACHOVÁ et KUBÁT 2004, ŠTĚPÁNKOVÁ et al. 2010). Tyčinky jsou zredukovány na jednu jedinou, která navíc srůstá s pestíkem v gymnostemium. Tyčinka se nachází na vrcholu sloupku, který je vysoký 4 mm a má na sobě brylky. Prašník, nacházející se na konci tyčinky, je rozdělen na dva prašné váciky neboli theca. Pylová zrna se u *Anacamptis morio* nevyskytují v podobě prachových zrn, ale jsou spojeny viscinovými vlákny v pollinium, které je připevněné k lepivému terči, což je dohromady označováno jako výše zmíněná brylka. *Anacamptis morio* má trojlaločnou bliznu, která se nachází na přední straně sloupku (Obr. 1). Oplození jsou schopné pouze dva postranní laloky této blizny. Plodem rostliny je zelená, úzce elipsoidní tobolka dosahující délky 15–23 mm (PRŮŠA 2005).

Semena *Anacamptis morio* jsou opravdu malá, extrémně lehká a produkována jedinci ve velkém množství. Semena se mohou, díky svým velkým vzduchovým prostorám, šířit na velké vzdálenosti, ale velké množství semen nedopadá daleko od mateřské rostliny (JERSÁKOVÁ et MALINOVÁ 2007).



Legenda: A – celá rostlina, B – vnější střední okvětní lístek, C – vnější postranní okvětní lístky, D – vnitřní postranní okvětní lístky, E – pysk, F – ostruha, G – polinium

Obrázek 1 Stavba *Anacamptis morio* (převzato z: FAY et al. 2010)

2.1.3 Morfologie semen

Morfologie semen je jedním z důležitých taxonomických znaků orchidejí. Semena orchidejí se skládají z eliptického embrya uzavřeného v obvykle průhledném a často fusiformním obalu (testa). Obaly a embrya různých rodů a druhů se mohou lišit velikostí, tvarem, barvou nebo poměrem mezi jejich objemy. Stěny buněk testa mohou být hladké nebo síťované a pokud je přítomno síťování, její vzory mohou být rozlišovací (GÜLER 2016).

Semena *Anacamptis morio* mají protáhlý tvar a obsahují přibližně 70 % vzdušného prostoru. Procento vzduchového prostoru ovlivňuje dobu, po kterou jsou semena schopna přežít ve vzduchu. Je známo, že exempláře s vysokým procentem hodnot vzdušného prostoru se šíří větrem na delší vzdálenosti. Když byla zkoumána testa a embrya, bylo zjištěno, že mají

hnědou barvu a antiklinální a periklinální stěny buněk testa disponují síťovinou. Síťoviny jsou tenké, nenápadné a příčně diagonální (GÜLER 2016).

2.1.4 Příčiny ohrožení

Orchideje jsou ve světě velmi ohroženou skupinou rostlin (PRŮŠA 2005). Jejich původními lokalitami výskytu byly přirozené lesy, lesní světliny spásané divokou zvěří, přirozené trávníky nad horní hranicí lesa a místa, která byly pravidelně narušována záplavami, lavinami a požáry (JERSÁKOVÁ et KINDLMANN 2004).

K poklesu počtu orchidejí ve všech částech naší planety dochází z důvodu lidské aktivity (BRZOSKO 2003). Vysoké hospodářské užívání půd a přírodních zdrojů, zejména odlesňování, fragmentace lesa nebo tvorba mýtin (PRŮŠA 2005). I v České republice je jednou z hlavních příčin úbytku orchidejí intenzifikace zemědělství a lesnictví. Znamená to tedy, že s příchodem člověka a rozvojem krajiny se mnoho druhů orchidejí přesídlilo na otevřená stanoviště luk a pastvin a adaptovalo se na sekundární bezlesí (JERSÁKOVÁ et KINDLMANN 2004). Dalším významným faktorem, který vede k ubývání vstavačovitých, je často nevhodný nebo žádný management jejich stanovišť (PRŮŠA 2005). Z důvodu chybějícího managementu se trávníky a vřesoviště přeměnily sukcesí zpět na zalesněná místa a trvalé lesy (REINHAMMAR et al. 2002). Protože ubývá nebo zcela mizí pastva ovcí a koz, nejvíce utrpěly druhy orchidejí rostoucí na pravidelně sekaných či pasených stanovištích (JERSÁKOVÁ et KINDLMANN 2004).

Ve volné přírodě dochází i k nelegálnímu sběru orchidejí, kde se jedná primárně o orchideje tropů a mediteránu a jejich následný vývoz do zahraničí. Nebo o druhy, v České republice rostoucí, které si lidé odnášejí z důvodu atraktivity do svých zahrádek (PROCHÁZKA 1980).

2.1.5 Legislativa

Druh *Anacamptis morio* podléhá ochraně mezinárodní úmluvy CITES, podle nařízení rady (ES) č. 338/97 O ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin a regulováním obchodu s nimi. Dále je chráněn Bernskou úmluvou, Ramsarskou úmluvou na ochranu mokřadů a Úmluvou o ochraně biodiverzity. V Červeném seznamu je hodnocen jako kriticky ohrožený druh (kategorie CR) podle Mezinárodního svazu ochrany přírody (IUCN) a také jako kriticky ohrožený druh (kategorie C1b) v Červeném seznamu České republiky (GRULICH et CHOBOT 2017). Zákonem je chráněn i u našich sousedů na Slovensku a Polsku (HOSKOVEC 2007).

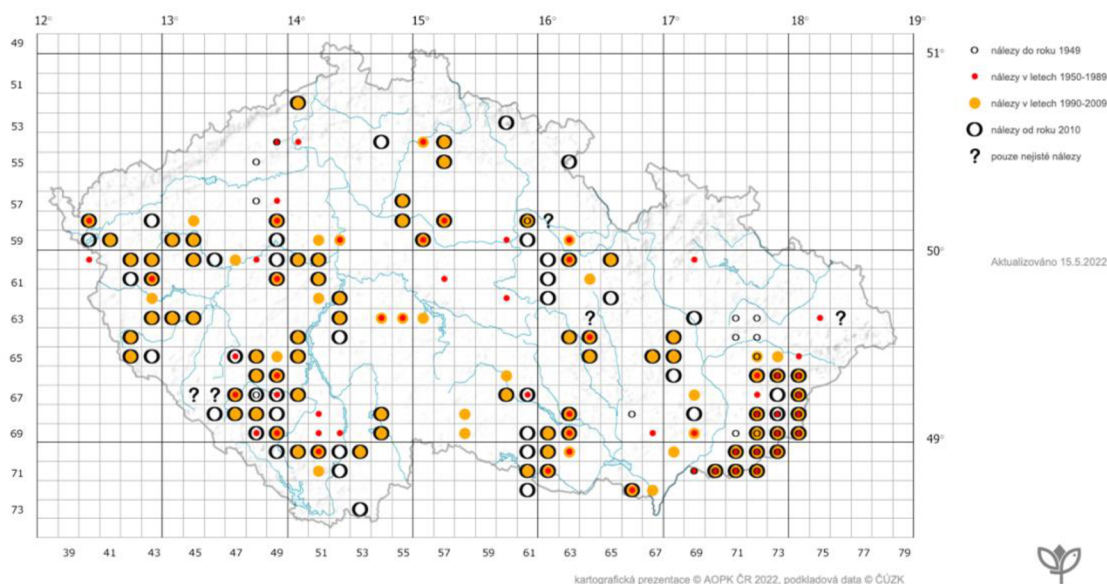
2.2 Rozšíření a ekologie druhu *Anacamptis morio*

2.2.1 Rozšíření ve světě

Rudohlávek kukačka (*Anacamptis morio*) se vyskytuje téměř po celé Evropě. Nenalezneme ho pouze v nejsevernějších oblastech. Zasahuje do temperátní i meridionální floristické zóny. Západní hranice areálu probíhá severní Afrikou, východním Španělskem a Francií. Severní hranice protíná Skotsko a směřuje do jižní Skandinávie, Pobaltí a na jihovýchodě sahá až ke Kaspickému moři. V jižních a východních částech areálu včetně severní Afriky se nevyskytuje zmíněný poddruh *Anacamptis morio* subsp. *morio*, ale poddruhy jiné jako např. *caucasica*, *picta* a *morio* subsp. *longicornu* (JERSÁKOVÁ et PRŮŠA 2021).

2.2.2 Rozšíření v ČR

Mattioliho herbář, který je nejstarší dochovanou písemnou zmínkou o *Anacamptis morio*, nám umožňuje dokázat výskyt druhu na českém území už roku 1562. Můžeme ale předpokládat, že u nás rostl už mnohem dříve. V průběhu 19. století, kdy docházelo k floristickým průzkumům našeho území, byl rudohlávek kukačka zaznamenán roztroušeně po celé naší zemi a patřil k nejhojnějším vstavačovitým. Nejvyšší koncentrace lokalit byla v Pošumaví a Bílých Karpatech. Od 60. a 70. let minulého století došlo k velkému úbytku jeho lokalit a zároveň ke snížení početnosti zbývajících populací, a to hlavně z důvodu změn v managementu krajiny. Za současné hlavní příčiny úbytku lokalit rudohlávku kukačky považujeme kromě změn v obhospodařování také změny v charakteru vegetace či acidifikaci a eutrofizaci prostředí (JERSÁKOVÁ et PRŮŠA 2021). V záznamech od roku 2010 nalezneme výskyt druhu zejména na území Zlínského, Karlovarského, Jihočeského a Plzeňského kraje (Obr. 2) (PRAUSOVÁ et al. 2021).

Výskyt druhu *Orchis morio* podle záznamů v ND OP

Obrázek 2 Výskyt *Anacamptis morio* na území ČR podle záznamů ND OP (data převzata od AOPK ČR 2022)

2.2.3 Sledované lokality

Na území někdejšího Východočeského kraje, dnes kraje Pardubického, Královéhradeckého a části Libereckého bylo v minulosti známo 212 lokalit, které byly roztroušené převážně v mezofytiku, termofytiku a výjimečně v podhůří. Začátku 90. let minulého století se jich dochovalo pouze 10 % (PROCHÁZKA 1980). V minulosti se druh vyskytoval na více než 60 lokalitách v Pardubickém kraji a na více než 25 lokalitách v kraji Královéhradeckém (Obr. 3) (PRAUSOVÁ et al. 2021)

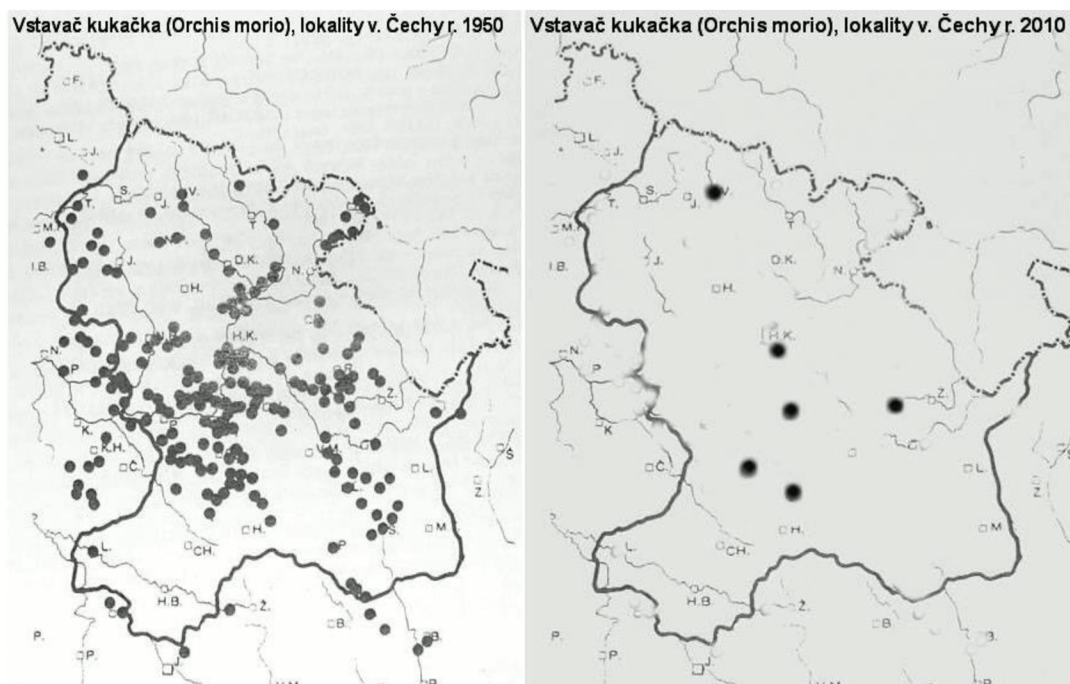
Přírodní památka U Vinic, nacházející se severovýchodně od Vysokého Mýta, představuje zbylé území původně vlhkých luk. Půdní horizont, který z největší části tvoří slatinný humolit, je porostlý bezkolencovou loukou, v severovýchodní části ovsíkovou loukou a ve středu louky přechází na vegetaci slatinnou (FALTYSOVÁ et BÁRTA 2002). Databáze PLADIAS uvádí první záznam druhu na území mezi Vinicemi a Babkou z roku 1899. V dnešní době je populace *Anacamptis morio* velmi slabá, její velikost dosahuje maximálně pěti jedinců a výskyt je na okraji louky podél chatové oblasti. Na poklesu jedinců populace se podílela nevhodně zvolená seč a ponechávání nepokoseného pásu (PRAUSOVÁ et al. 2021).

Vstavačová louka, která je pozůstatkem slatinné louky v nivě, je přírodní památkou v okrese Ústí nad Orlicí poblíž obce Choceň (FALTYSOVÁ et BÁRTA 2002, HORÁK 2009, REŠLOVÁ 2010). První zmínka o výskytu druhu je uváděna FALTYSEN roku 1978 (PLADIAS 2022). Populace *Anacamptis morio*, čítající do pěti jedinců, se nachází v ochranném pásmu přírodní památky. Na lokalitě v blízkém okolí jednotlivých jedinců dochází k sečení v průběhu vegetačního klidu, kdy jsou již tobolky zralé a biomasa je odvážena mimo lokalitu (PRAUSOVÁ et al. 2021).

Výskyt *Anacamptis morio* v blízkosti Chvojence, Vysokého Chvojna a okolí Holic je doložen už roku 1942. Konkrétně na lokalitě louka u Smilku je druh uváděn až v roce 2010 v počtu do šesti jedinců. Populace zde roste v lesním lemu jednoho z remízů stromové zeleně a aktuálně početnost klesla na jednoho až dva jedince z důvodu nerespektování ochranných podmínek (PRAUSOVÁ et al. 2021).

Sportovní letiště Dvořisko u Chocně, původně sloužilo jako extenzivní pastviny a louky, nikdy však nebyly užívány k intenzivnímu zemědělství. Tato lokalita nenesla žádný status ochrany a první zaznamenané nálezy na lokalitě jsou uváděny FALTYSEM roku 1978. Jedinci zde obsazují vlhké i sušší části lučního porostu a jsou závislí na pravidelné seči, která ho udržuje nízký. Populace *Anacamptis morio* je na této lokalitě specifická zejména svou velikostí, její početnost se v posledních letech pohybuje okolo 2000 fertálních jedinců. Tato stabilní populace disponuje jedinci se všemi známými odstíny barev květů, což vypovídá o velmi vysoké diverzitě (PRAUSOVÁ et al. 2021).

Přírodní rezervace Mazurovy chalupy, kterou tvoří slatinné, bezkolencové a mezofilní louky, se nachází u samoty U Mazury kousek od obce Hoděšovice. Populace na této lokalitě je druhou nejpočetnější v Pardubickém kraji a východních Čechách (PRAUSOVÁ et al. 2021). Výzkum PRAUSOVÉ a MAŠKOVÉ (2012) ukázal, že *Anacamptis morio* roste v nejsušších částech bezkolencové louky. Dlouhodobě odlesněné území porostlé lučními společenstvy spravují Městské lesy Hradec Králové, a.s. (PRAUSOVÁ 2000). Druh je na lokalitě znám od 80. let minulého století (PLADIAS 2022) a jeho početnost se zvýšila od roku 2013 a 2014, kdy byly na lokalitě vystavěny tři oplocenky okolo míst ojedinělého výskytu, do nichž byly provedeny repatriace hlíz a semen. Oplocení chrání populaci proti zvěři a jejich okusu či rytí. Populací prospělo i zavedení managementu, kdy se oplocenky a jejich těsné okolí seče pomocí kosy nebo křovinořezu na začátku září a následně se biomasa shrabává. Od roku 2016 do roku 2019 počet jedinců kolísal z důvodu negativních faktorů (mrazové dny, poškození hlodavci, nízký úhrn srážek) (PRAUSOVÁ et al. 2021).



Obrázek 3 Rozšíření *Anacamptis morio* ve Východních Čechách v roce 1950 a 2010 (převzato z: JEŽEK 2013)

2.3.1 Fenologie

Rašení rostlin rudohlávků kukačky nastává v září nebo začátkem října, kdy nastupuje období růstu nadzemních orgánů. Rostlinám narůstají listy a květonosné lodyhy, které nesou až do poloviny dubna (JERSÁKOVÁ et KINDLMANN 2004). Zimu přečkávají ve stádiu listové růžice. Dalšími druhy orchidejí, které rostou na našem území a mají podobný fenologický cyklus, jsou například vstavač osmahlý (*Neotinea ustulata*), vstavač trojzubý (*Neotinea tridentata*) či tořiče (*Ophrys*). Tyto druhy mají těžiště výskytu, stejně jako rudohlávek kukačka, ve Středozeví. V průběhu jara dorůstá listová růžice a v květnu nastává hlavní doba kvetení (JERSÁKOVÁ et PRŮŠA 2021). Může nastat stav, kdy jedinec nebo celá populace započnou kvetení už v polovině dubna, to nazýváme vedlejší doba kvetení. Naopak pozdější doba kvetení je zaznamenávána do poloviny června (JERSÁKOVÁ et KINDLMANN 2004). Zralé toboleky nalezneme na rostlině v červnu a během července nadzemní část rostliny odumírá. Zásobní látky, potřebné k růstu a kvetení, poskytuje rostlině loňská hlíza. Zároveň rostlina ukládá produkty fotosyntézy do hlízy nové. V době květu má tedy hlízy dvě, z nichž ta loňská se scvrkává a během léta zcela odumírá (JERSÁKOVÁ et PRŮŠA 2021).

2.3.2 Opylovači

Protože jsou orchideje tak rozmanité, i jejich opylovací systémy jsou hodně variabilní. Mezi vstavačovými a opylovači existuje mnoho vztahů. Některé druhy mohou být opylovány četnými taxony, zatímco jiné jsou specializované a vázané na jeden konkrétní druh opylovače. Tropické druhy s velkými květy jsou opylovány třeba i netopýry nebo ptáky, zatímco naše druhy ve většině případů zástupci řádu blanokřídlí (včely, čmeláci), dvoukřídlí nebo motýli (CHYTRÁ 2015).

Mnoho orchidejí používá k přilákání opylovačů nějakou formu klamu a nespolehá na to, že opylovač hledá nektar. Klamou například fyzickým vzhledem (tvar květenství, barva květu), chemickými podněty (vůně) nebo jejich kombinací. U druhu *Anacamptis morio* se právě o šálivé květy jedná a opylovači jsou primárně čmeláci, zejména čmeláci královny a samotářské včely. V České republice jsou nejvýznamnějšími opylovači *Anacamptis morio* čmelák zemní a čmelák skalní (JERSÁKOVÁ et al. 2002).

2.3.3 Mykorhiza

Způsob, kterým se orchideje vyvinuly odlišně od jiných rostlin, je jejich vztah s mykorhizními houbami. Jedná se o speciální vztah týkající se určitého druhu hub a podzemních orgánů rostliny (GRYNDLER et al. 2004). Jejich specializace vedla k silnému spoléhání se na mykorhizní houby alespoň v některých fázích jejich životního cyklu, hlavně během klíčení. To je způsobeno zejména malou velikostí semen, špatně smočitelným osemením, nedokonale vyvinutým bezděložným embryem a absencí endospermu, to znamená, že nemají dostatek vyživujících zásob nezbytných pro úspěšné klíčení a následný vývoj protokormů (PRŮŠA 2005). Dále je to způsobeno modifikovaným kořenovým systémem, kde dochází k malému větvení silných kořenů a kořenové vlášení téměř chybí (SZKANDEROVÁ 2006). Velká produkce semen u orchidejí nám může naznačit vysokou úmrtnost semen i sazenic (RASMUSSEN 2006).

Orchideje jsou různě závislé na mykorhize v průběhu jejich ontogeneze, proto je můžeme rozřadit do tří skupin. První skupinou jsou mykotrofní nezelené orchideje, druhou jsou zelené orchideje lesních stanovišť závislé na mykorhize po celou dobu ontogeneze a třetí zelené orchideje otevřených stanovišť závislé na mykorhize pouze v časných stádiích ontogeneze (PRŮŠA 2005).

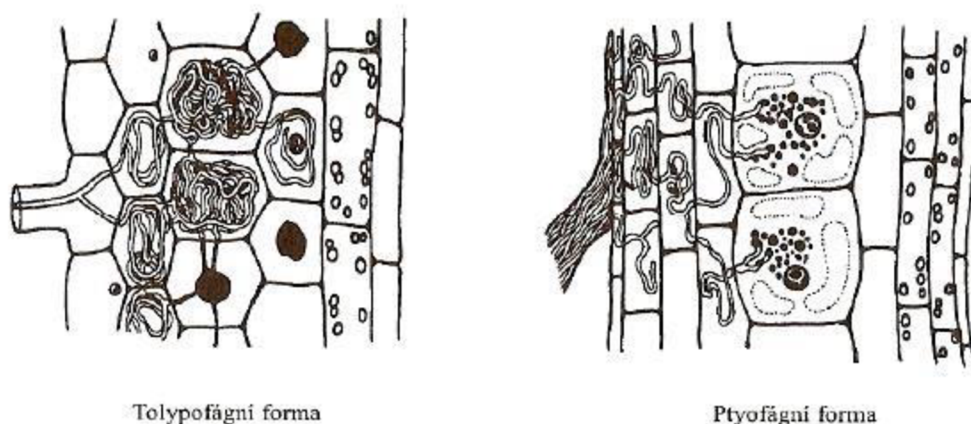
Pro nezelené orchideje jsou typické zakrnělé listy, které částečně nebo úplně postrádají chlorofyl. Nahrazují je bezbarvé, nažloutlé nebo hnědavé šupiny bez pokožkových průduchů. Do skupiny nezelených orchidejí rostoucí v České republice řadíme například hlístík hnízdák (*Neottia nidus-avis*), který ztratil schopnost asimilace a tím se stal plně závislým na fykobiontu, který mu poskytuje uhlíkaté látky. Druhá skupina je sice schopna asimilovat, mají zelené listy s obsahem chlorofylu, ale vyprodukované látky fotosyntézy ještě potřebují doplnit o uhlíkaté látky prostřednictvím fykobionta. Tak tomu je po celou dobu jejich ontogeneze. Zástupcem této skupiny

je například okrotice červená (*Cephalanthera rubra*). Třetí skupinu, do které lze zařadit například vstavač vojenský (*Orchis militaris*), tvoří druhy, pro které je mykorhiza důležitá zejména v časných stádiích ontogenetického vývoje. Poté, co vytvoří zelené asimilující listy se stávají autotrofními. Naleznout můžeme i druhy, které vykazují přechodové znaky mezi první a druhou skupinou nebo mezi druhou a třetí (PRŮŠA 2005).

Endomykorhizu můžeme rozdělit na typy arbuskulární, erikoidní, monotropoidní, arbutoidní a orchideoidní. Orchidejová mykorhiza představuje evolučně nejmladší typ mykorhizy a bývá vytvářena druhy hub, které obvykle s jinými druhy cévnatých rostlin formují ektomykorhizu (PRŮŠA 2005). Orchideoidní mykorrhizu tvoří zejména rody hub *Rhizoctonia*, *Epulorrhiza*, *Ceratorhiza* či *Moniliopsis* (GRYNDLER et al. 2004).

Podle charakteristického uspořádání struktur fykobiont můžeme orchidejovou mykorhizu rozdělit na tolypofágní a ptyofágní (Obr. 4). Běžnější a rozšířenější je tolypofágní typ orchidejové mykorhizy, charakteristický vytvářením klubíček hyf (smotků, pelotonů) (PRŮŠA 2005). Houba infikuje rostlinu z půdy, její hyfy prorůstají kořenovou epidermis a osidlují buňky hostitele, přesněji korový parenchym. Šíření houbových vláken je omezeno na primární kůru kořene, do středního válce nikdy neprorůstají. Pokud se houbová infekce plně rozvine, můžeme v primární kůře kořenů rozlišit až tři zóny. První je zóna rozvoje mycelií v buňkách hostitele. Tam dochází k větvení a růstu hyf, které částečně vyplňují vnitřní prostor buněk, ale netvoří se zde klubíčka. Druhá zóna, směrem ke střednímu válci kořene, obsahuje vrstvu tzv. stravovacích buněk a buněk hostitelských, v této vrstvě už nacházíme i klubíčka houbových hyf, která mohou být jak v neporušeném stavu, tak již mohou podléhat degradaci do formy mrtvé kompaktní hmoty. Tento proces se může odehrávat jeden den, nebo až jeden měsíc po vytvoření smotku (GRYNDLER et al. 2004, PRŮŠA 2005). Tuto degradaci chápeme jako obrannou reakci hostitelské buňky, která se chrání před přílišným rozvojem potencionálně patogenního organismu (SZKANDEROVÁ 2006, SEDLÁŘOVÁ 2011). Mnohdy dochází k opětovné kolonizaci buněk a následné tvorbě nových smotků. Někdy bývá vytvořena i třetí zóna, nacházející se nejbliže střednímu válci. Tato vrstva obsahuje zásobní buňky se škrobovými zrny, které nenesou žádné známky endofyt (PRŮŠA 2005).

Ptyofágní typ orchidejové mykorhizy se nachází pouze u několika druhů tropických nezelených orchidejí. Charakteristický je tím, že se zde nevyvíjejí hustá klubíčka hyf. Dochází zde ke kolonizaci buněk primární kůry kořene a v hlubších vrstvách kortexu k prasknutí hyfy. Hyfa penetruje hostitelskou buňku, její vrchol praskne, rozkládá se a její obsah se uvolňuje do ptyozómů v cytoplazmě hostitelské buňky (PRŮŠA 2005).



Obrázek 4 Formy orchidejové mykorrhizy (převzato z: SZKANDEROVÁ 2006)

2.3.4 Rozmnožování a klíčení semen

Druh se rozmnožuje převážně generativně a vyvinuly se u něj zajímavé mechanismy opylování. Nápadné květy s výraznou ostruhou řadíme mezi šálivé, proto rudohlávek kukačka dominuje velkou variabilitou barvy květů. Mají navíc dlouhověké květy, které dokážou bez opylení kvést až dvacet dní. Pro hmyz atraktivní květy jsou sice samosprašné, ale zcela závislé na přenosu pylu opylovači. Hmyz obvykle začíná svou návštěvu na spodních květech a pokračuje směrem vzhůru, rychle ale odhalí absenci odměny, proto navštíví v průměru pouze dva květy na rostlině. V květu se nachází dvě brylky, které mohou opylovači přenášet po jedné či společně. Kapsička v květu obsahuje lepkavé terčíky brylek, které se na opylovače pevně přichytí hned, jak se ji čelem nebo sosákem dotknou. Stopečky brylek se ohnou do pozice, ve které může dojít ke kontaktu s bliznou umístěnou nad ústím ostruhy. Na tu se pak může nalepit část brylky a zbytkem může hmyz opylovat i několik dalších květů (JERSÁKOVÁ et PRŮŠA 2021).

Kromě generativního rozmnožování se může rudohlávek kukačka rozmnožovat i vegetativně. Rostlina vytvoří místo jedné hlízy větší počet nových hlíz, které se po zániku hlízy mateřské od sebe oddělí. Tím vznikají dceřiné rostliny (JERSÁKOVÁ et PRŮŠA 2021). Touto formou se pravděpodobně rudohlávek kukačka rozmnožuje na lokalitách, kde zapojený porost může bránit uchycení a vyklíčení drobných semen (PRŮŠA 2005).

Semeno, které neobsahuje příliš zásobních látek, se skládá pouze z embrya a osemení, které ho kryje. Embryo je jedinou živou částí semene a obal odumřelých buněk pravděpodobně poskytuje mechanickou bariéru a chrání ho před okolními vlivy prostředí. Jediným zdrojem zásob je tedy samotné embryo, které obsahuje menší množství proteinů, lipidů a výjimečně také škrobů, to však není dostačující k tomu, aby vyrostl mladý jedinec. Pokud dojde ke splnění podmínek vhodných pro klíčení, začne se embryo přijímáním vody zvětšovat. Zvětšování objemu buněk způsobuje protržení osemení. Embryonální buňky produkují útvary, které jsou podobné

kořenovým vláskům, k tomuto procesu využívají pouze své vlastní zásoby. Nejdříve dochází k hydrolýze proteinových tělísek a následně ke štěpení lipidů (PONERT 2016). Tím ale semeno své zásoby vyčerpá a musí navázat mykorhizní symbiózu, která je zdrojem chybějící energie (PROCHÁZKA et VELÍŠEK 1983). Proces mykorhizy probíhá tak, jak již bylo popsáno výše.

Pokud bylo klíčící embryo schopno navázat mykorhizní symbiózu, může déle růst. Dělením embrya vzniká stále se zvětšující oválný útvar, který ale neobsahuje žádný meristém. Oválný útvar vzniká pouze zvětšováním embrya, nikoli růstem z dělivého meristému, z toho důvodu nemůže být nazýván například kořenem. Pro tento útvar byl proto zaveden speciální termín protokorm. Části protokormu se během růstu nevyvíjí stejně. Buňky na apikálním konci se dělí rychleji, ale zůstávají menší a postupně tak utváří první meristém jedince. Buňky na bazálním konci protokormu se dělit přestávají, zvětšují se a zvyšují obsah DNA (PONERT 2016). Mykorhizní struktury jsou také jen na bazálním konci, protokorm tak získává výživu pro růst prvního organizovaného pletiva (meristém prýtu). V této fázi nese protokorm pouze kořenové vlášení. Další vývoj probíhá tak, že jako první se ze shluku buněk diferencuje děloha, a poté se vytvoří v pupenu na hlízce další listy. V této fázi už je možné pozorovat postranní kořen diferencující se endogenně. Ten zatahuje klíčící rostlinu do půdy a další kořen, vytvořený pod listem, se začne měnit v kulovitou hlízku (PROCHÁZKA 1980). Protokorm časem zaniká a je nahrazen kořeny, ve kterých mykorhiza pokračuje. Dokud nedojde k olistění rostliny, jsou podzemní orgány plně závislé na mykorhize (PONERT 2016).

3 Metodika

3.1. Monitoring populací na vybraných lokalitách

Monitoring populací probíhal na jaře 15.5.2021 v hlavní době kvetení. Realizovaly jsme ho s vedoucí BP a jednalo se o pět lokalit na území bývalého Východočeského kraje (Obr. 5).

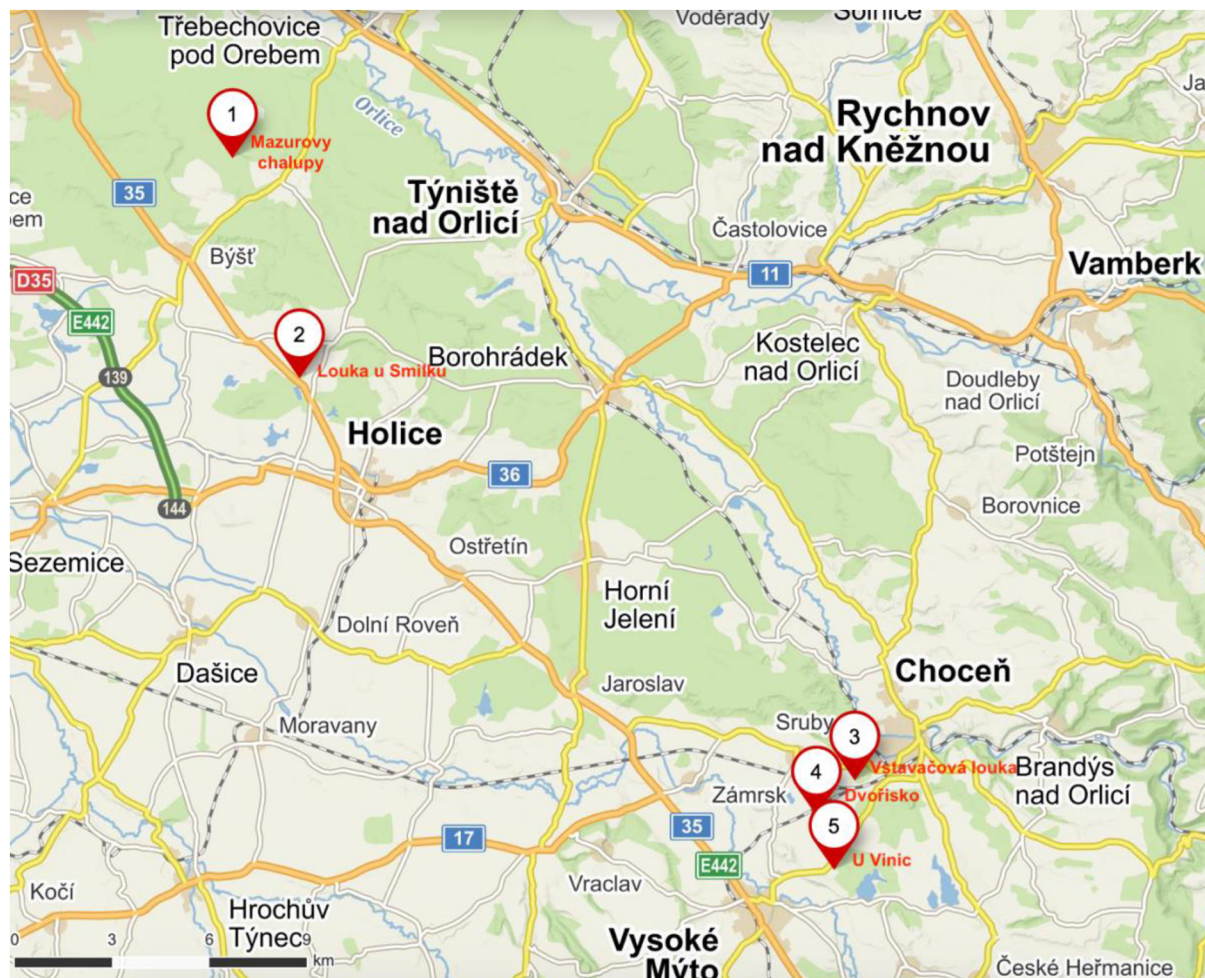
První vybranou lokalitou byly Mazurovy chalupy, na kterých už dlouhodobě monitoring probíhá a jsou zde vystavěny 3 oplocenky s populacemi. V minulosti byla k pozorovaným jedincům přidělena čísla na hliníkových štítcích, které jsou zanořené v zemi v blízkosti rostliny. Podle starých záznamů byly štítky u jednotlivých jedinců hledány. Pokud byl nalezen, bylo zaznamenáno jeho číslo a počet sterilních nebo fertlích rostlin mu náležících. K tomuto kroku byla potřeba pouze pinzeta, kterou jsme v zemi štítky dohledaly. V oplocenkách se nacházely i rostliny nové, tzn. bez štítku, ty jsme zaznamenávaly také. Monitoring jsme prováděly i vně oplocenek, kde se někteří jedinci nacházeli.

U každé rostliny na lokalitě, která měla štítek s číslem, jsem zaznamenávala morfologické znaky. Pokud byla rostlina sterilní, počítala jsem počet listů a pomocí pravítka měřila rozměry tří vybraných listů (délku a šířku). U rostlin fertlích jsem prováděla stejné měření listů doplněné o měření výšky lodyhy a počet květů. Takto jsme postupovaly ve všech oplocenkách na lokalitě. Tato data nám sloužila k porovnání populací s monitoringem realizovaným roku 2014.

Druhou důležitou lokalitou pro můj výzkum bylo Dvořisko. Na této lokalitě byl monitoring prováděn odlišně než na ostatních lokalitách, a to z důvodu velkého počtu jedinců *Anacamptis morio*. S pomocí kolegů jsme utvořili rojnici, kde měl každý z nás na starost koridor o šířce cca 2 metry, ve kterém počítal počet jedinců. Takto jsme společně obešli celý areál Dvořiska a sečetli svá čísla, abychom dosáhli konečného počtu rostlin. Pro záznam morfologických znaků bylo vybráno 5 fertlích rostlin, kde jsem provedla stejná měření (počet, délka a šířka listů, délka lodyhy a počet květů), jako na ostatních lokalitách.

Dalšími lokalitami monitoringu byly přírodní památka U Vinic, přírodní památka Vstavačová louka, Chvojenec u Smilku. V přírodní památce U Vinic jsem u jedince našla štítek, zapsala jeho číslo a provedla morfologické měření zmíněné výše. V přírodní památce Vstavačová louka jsem provedla monitoring, zaznamenala jak označené jedince s číslem, tak i bez něj a provedla morfologické měření. Na lokalitě Chvojenec u Smilku jsem postupovala stejně jako v předchozích případech.

Informace a hodnoty získané monitoringem jsem zpracovala do excelové tabulky pro lepší srovnání s hodnotami z minulých let.



Obrázek 5 Mapa umístění vybraných lokalit

3.2 Sběr tobolek z uměle založených kultur

Zralé tobolky se semeny mi byly poskytnuty panem Milošem Andrešem. Sběry probíhaly v uměle vytvořených kulturách ve vegetační sezóně roku 2020. Rostliny v umělé kultuře pochází ze semen z lokalit Mazurovy chalupy a Dvořisko. Poskytnuto mi bylo 5 tobolek z Mazurových chalup, 5 tobolek z Dvořiska a 5 tobolek kříženců těchto dvou lokalit. Kříženci vznikly asistovaným opylováním, kdy byl pyl jedince z Dvořiska ručně přenesen na květ rostliny z Mazurových chalup, nebo opačně. Tyto tobolky jsem uchovávala jednotlivě ve skleněných zkumavkách uzavřených víčkem, abych zabránila ztrátě semen, a popsala je lihovým fixem Mazurovy chalupy 1–5, Dvořisko 1–5 a Kříženci 1–5. Další sklizeň tobolek Mazurových chalup v kultuře byla uskutečněna následující vegetační sezónu 2021.

3.3 Pozorování tobolek a semen

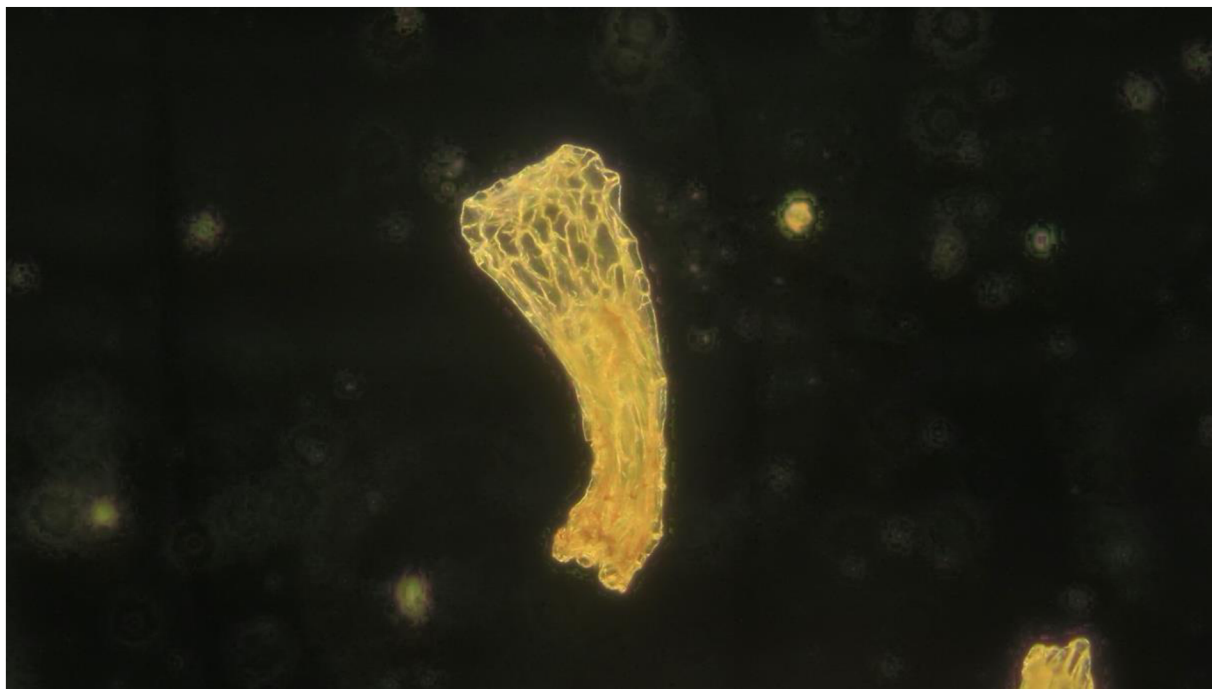
Pomocí stereolupy Keyence typu Digital Microscope VHX-700 Series byly pozorovány drobné, okem hůře pozorovatelné části. Stereolupa byla využívána primárně pro pozorování a focení tobolek a semen uložených uvnitř. Ke snímkům byl použit bílý i černý podklad, který je součástí

vybavení stereolupy. Jednotlivé tobolky byly vloženy pod objektiv stereolupy, byla nastavena potřebná intenzita světla a vhodné zvětšení. Pro zachycení celé tobolky bylo zvoleno zvětšení 6x, zvětšení 16x nebo 26x pro pozorování semen uvnitř tobolek. Jednotlivé snímky byly pořizovány funkcí 3D snímkování, kdy byl povrch objektu zaostřován v různých vrstvách a výsledkem byl kompletně ostrý snímek (Příloha 1). Druhou funkcí stereolupy, která byla využívána, bylo měření délky. Tato funkce byla využita pro měření délky tobolek (Příloha 2). Snímky samotné a poté snímky s hodnotami délky byly ukládány pod jmény lokalit či kříženců do záložek.

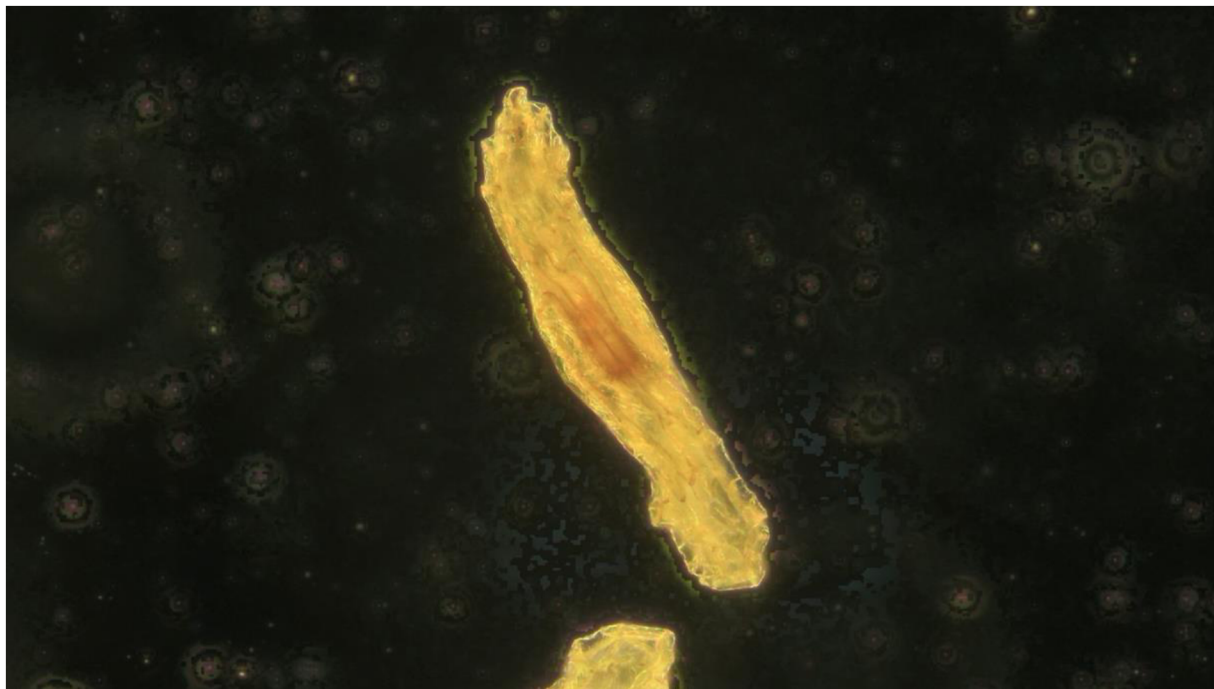
Semena byla dále pozorována pod mikroskopem typu Zeiss Axioscope 5 Digital Microscope. K tomuto kroku byla využita pinzeta k vyjímání semen ze zkumavek, podložní a krycí sklíčka, mezi která byla semena vkládána. Mikroskop nám umožnil pozorování s možností různé intenzity osvětlení a zvětšení. K zachycení ostrého snímku bylo využito funkce složení výsledného snímku z dílčích snímků, kdy byla manuálně nastavena nejvyšší vrstva objektu a mikroskop poté obraz sám zaostřoval ve vrstvách dalších. Zvětšení využívaná v tomto kroku byla 50x a 100x. Nezbytnou funkcí bylo i měření rozměrů (délka a šířka semen a jejich embryí), které byly využity pro měření délky a šířky semen a jejich embryí.

Ke zjištění charakteru semen v tobolkách byly vytvořeny tři skupiny (obr. 6, 7, 8), do kterých byla semena podle stupně vývinu embrya řazena:

- 1) semeno bez vyvinutého embrya
- 2) semeno s méně vyvinutým embryem
- 3) semeno s plně vyvinutým embryem



Obrázek 6 Semeno *Anacamptis morio* bez vyvinutého embrya – 1. stupeň vývinu



Obrázek 7 Semeno *Anacamptis morio* s méně vyvinutým embryem – 2. stupeň vývinu



Obrázek 8 Semeno *Anacamptis morio* s plně vyvinutým embryem – 3. stupeň vývinu

Z každé zkumavky, obsahující tobolku, byla odebírána část semen a zjišťoval se počet semen v daných stádiích pod mikroskopem. Tento proces pokračoval, dokud nebylo v odebraných semenech napočítáno 100 plně vyvinutých semen. Tento postup byl aplikován na všech zkumavkách z Mazurových chalup, Dvořiska a kříženců. Zkumavky Mazurovy chalupy 3 a Kříženci 2 byly podrobeny opakovanému náhodnému odebrání semen pro potvrzení obsahu daných stádií a byly označeny jako Mazurovy chalupy 3B a Kříženci 2B.

Pro měření byla z každé zkumavky vybrána tři plně vyvinutá semena, u kterých byly měřeny šířky a délky semene, šířky a délky embrya, všechny tyto hodnoty byly zaznamenávány v μm (mikrometry).

3.4 Barvení živých částí semen

Barvení bylo prováděno pro zvýšení kontrastu embrya a důkazu obsahu živých buněk. Semena byla pinzetou vložena na podložní sklíčko, pipetou na ně bylo nanесeno barvivo 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) a překryto sklíčkem krycím. Takto připravený preparát s barvivem byl ponechán působení po dobu 24 hodin a poté pozorován pod mikroskopem typu Zeiss Axioscope 5 Digital Microscope, který nám opět umožnil pozorování s možností různé intenzity osvětlení a zvětšení a zachycení ostrého snímku pomocí funkce složení výsledného snímku z dílčích snímků (Příloha 3).

3.5 Založení in-vitro kultur

Pro založení in-vitro kultur bylo z každé zkumavky odebráno 50 plně vyvinutých semen a byla vložena do malých plastových zkumavek s víčkem. Celkem bylo použito 200 plně vyvinutých semen z každé lokality. Pro založení kultury byla využita laboratoř vybavená laminárním flow boxem k dosažení sterilního prostředí. Pomůcky využívané pro založení in-vitro kultur byly kultivační médium Phytamax orchid maintenance medium od společnosti SIGMA-ALDRICH (číslo produktu: P6668), Petriho misky, injekční stříkačky, kádinky, rukavice, tenká látka, skleněné tyčinky.

Založení in-vitro kultur bylo provedeno 30.4.2021 a pro každou lokalitu byly založeny 4 Petriho misky (12 Petriho misek celkem). Prvním krokem byla příprava injekčních stříkaček pro jejich použití při dezinfekci semen. Malý kus látky byl umístěn do náboje jehly, aby semena nemohla proniknout a poté byly stříkačky vybaveny jehlami. Jakmile byla injekční stříkačka sestavena, píst byl odstraněn a semena do ní byla vložena pomocí podélně složeného kusu filtračního papíru. Po přidání semen byly písty zatlačeny do injekčních stříkaček. Takto připravené stříkačky nám umožnily měnit roztoky se semeny, která zůstávají uvnitř stříkačky. Pro dezinfekci semen byl do stříkačky nasáván 70% roztok ethanolu (až do poloviny objemu stříkačky), stříkačka se protřepala a roztok se po dvou minutách odstranil. Následovalo praní destilovanou vodou, které jsme prováděly ve třech opakování. Déle byl aplikován dezinfekční 5% roztok $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, který jsme nechaly působit po dobu 20 minut a následovalo další promývání destilovanou vodou. Pro setí na kultivační médium bylo do stříkačky nasáto malé množství destilované vody (1–5ml) a jehla s látkou byly odstraněny. Semena v injekční stříkačce byla protřepána, aby se získala homogenní suspenze, a poté okamžitě vytlačena na kultivační médium

v Petriho misce. Pak byla Petriho miska uzavřena a semena se rozprostřela na povrchu média mírným horizontálním otáčením. Zbývající voda se snadno vstřebá do agarového média. V průběhu dezinfekce a převádění semen z injekční stříkačky na kultivační médium mohla být některá semena ztracena (prošla skrz látku či uvízla ve stříkačce), výsledky se tak vztahují pouze na dohledatelná semena v Petriho miskách. Petriho misky byly utěsněny vrstvou parafilmu z důvodu uchování sterility a umístěny kultivačního boxu. Kultivace probíhala v kultivačním boxu za následujících podmínek: ve dne (15 hodin) při 21°C, v noci (9 hodin) při 14°C. Metodika založení in-vitro kultury byla převzata z publikace European orchid cultivation – From seed to mature plant (PONERT et al. 2015).

Sledování in-vitro kultur probíhalo každých 14 dní od 14.5.2021 do 9.8.2021 na stereolupě Keyence typu Digital Microscope VHX-700 Series. Pro zaznamenání stádia vývoje byly rozlišeny 4 fáze (obr. 9–12), do kterých se semena v průběhu kultivace řadila:

- 1) mírně nabobtnalé rezavé semeno
- 2) mírně nabobtnalé bílé semeno
- 3) hodně nabobtnalé kulovité bílé semeno
- 4) pučení zárodku



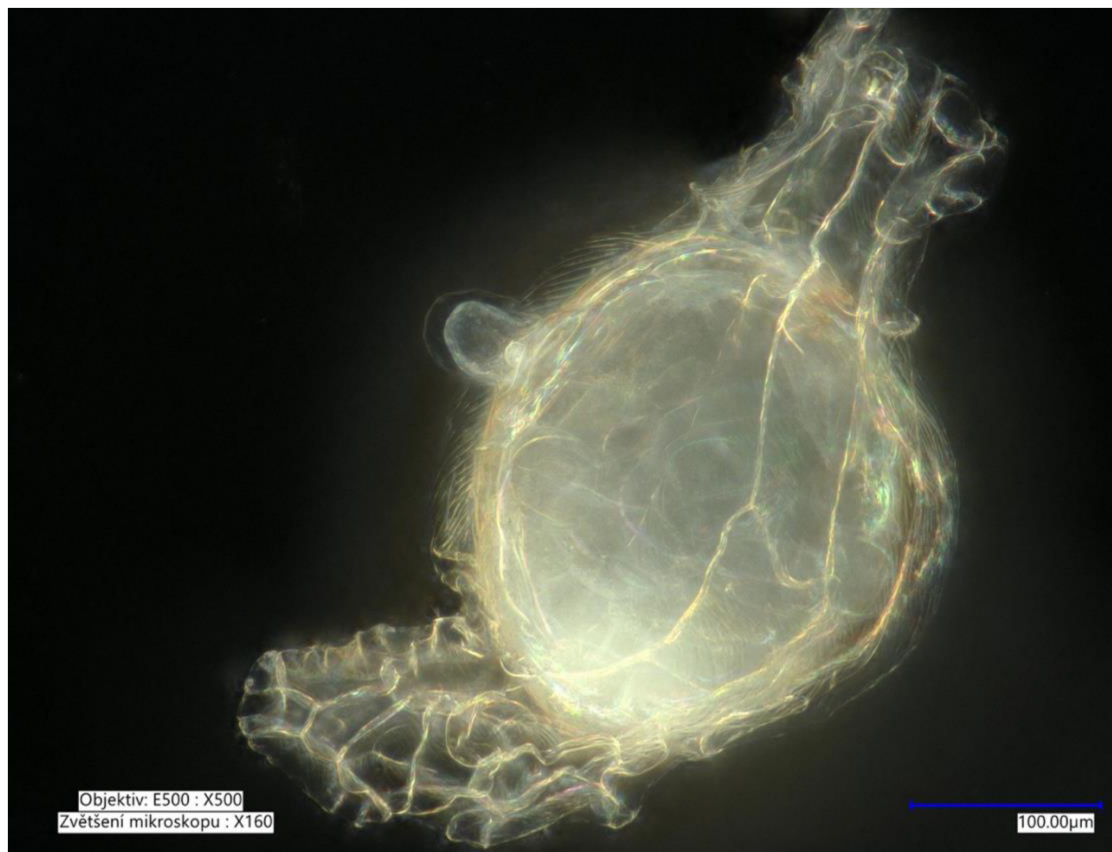
Obrázek 9 Mírně nabobtnalé rezavé semeno – 1. stádium vývoje při kultivaci



Obrázek 10 Mírně nabobtnalé bílé semeno – 2. stádium vývoje při kultivaci



Obrázek 11 Hodně nabobtnalé kulovité bílé semeno – 3. stádium vývoje při kultivaci



Obrázek 12 Pučení zárodku – 4. stádium vývoje při kultivaci

Ke sledování a pořizování snímků byl využit skleněný podklad pro dosažení vyššího prosvícení. Zvětšení, použitá pro sledování různých stádií vývinu, se pohybovala od 32x do 160x. Jednotlivé snímky byly pořizovány funkcí 3D snímkování, kdy byl povrch objektu zaostřován v různých vrstvách a výsledkem byl kompletně ostrý snímek. Počty jednotlivých vývojových stádií semen na Petriho miskách byly zaznamenávány, dokud to bylo možné. Pozorování bylo ukončeno po kontaminaci kultury jinými mikroorganismy (plísně, bakterie).

3.6 Zpracování výsledků

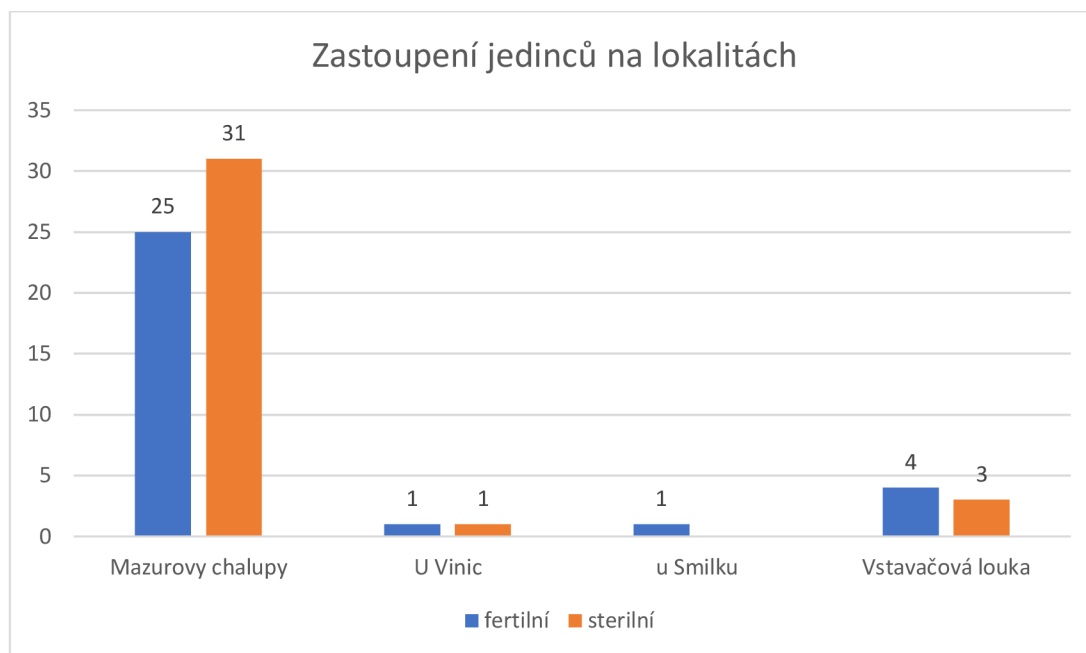
Data monitoringu byla zpracována do tabulek Microsoft Excel k přehlednému porovnání s daty z roku 2014 a 2015. Získaná data z měření semen a embryí byla zpracována do krabičkových grafů. Z výsledků poměrů semen v tobolkách byly vytvořeny sloupcové grafy a vývoj semen v in-vitro kulturách byl zpracován do grafů spojnicových. Srovnání rozdílů vyvinutých semen, (včetně jejich zárodků) sklizených v jednotlivých letech bylo provedeno pomocí metody ANOVA s dvěma faktory (A: vyvinutost embrya: 1 – vyvinutá, 3 – nevyvinutá, B: rok sběru semen). U počtu semen byla použita logaritmická transformace. Vzájemné srovnání rozdílů vyvinutých semen na různých lokalitách bylo provedeno metodou Anova s dvěma faktory (A: vyvinutost embrya 1 – vyvinutá, 3 – nevyvinutá, B: lokalita). Data nebyla transformována. Parametry semen a embryí byly srovnány

pomocí jednocestné ANOVY (semena – bez transformace dat, šířka embrya – logaritmická transformace).

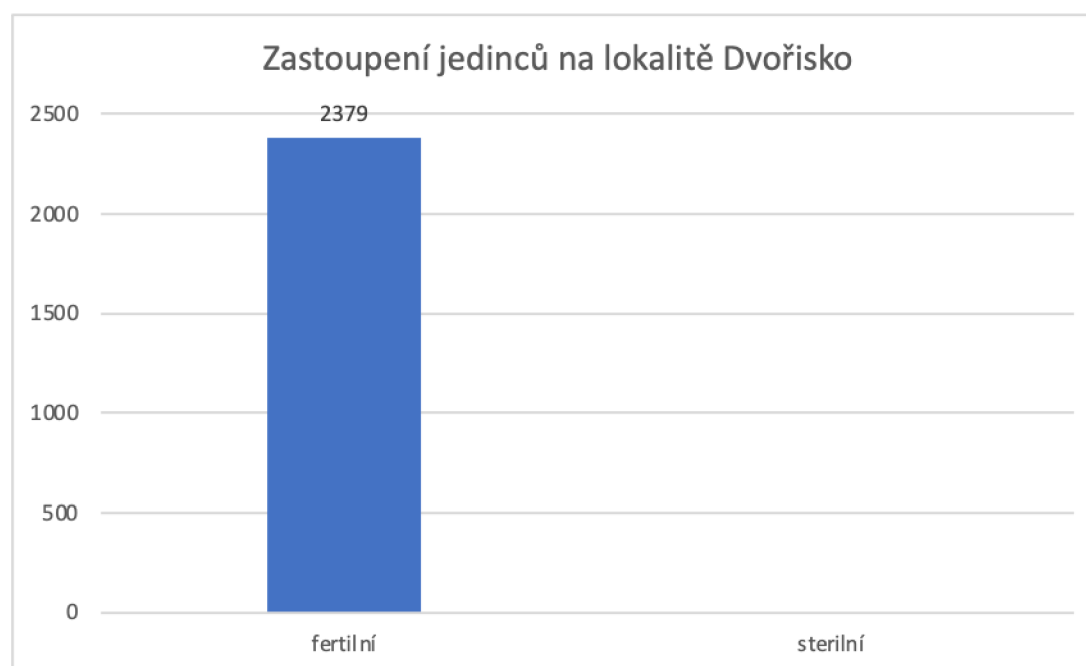
4 Výsledky

4.1 Monitoring populací ve východních Čechách v roce 2021

Monitoring proběhl na pěti lokalitách: Mazurovy chalupy, louka u Smilku, PP Vstavačová louka, Dvořisko a PP U Vinic. Největší populace o 2379 jedincích je na lokalitě Dvořisko, druhou největší lokalitou jsou Mazurovy chalupy (25 fertilních, 31 sterilních). Nejmenší populace jsou na lokalitách: Chvojenec u Smilku (1 fertilní), U Vinic (1 fertilní, 1 sterilní), Vstavačová louka (4 fertilní, 3 sterilní) (Obr. 13, 14). Kvantitativní monitoring byl zaměřen na počty sterilních a fertilních jedinců (Příloha 4).

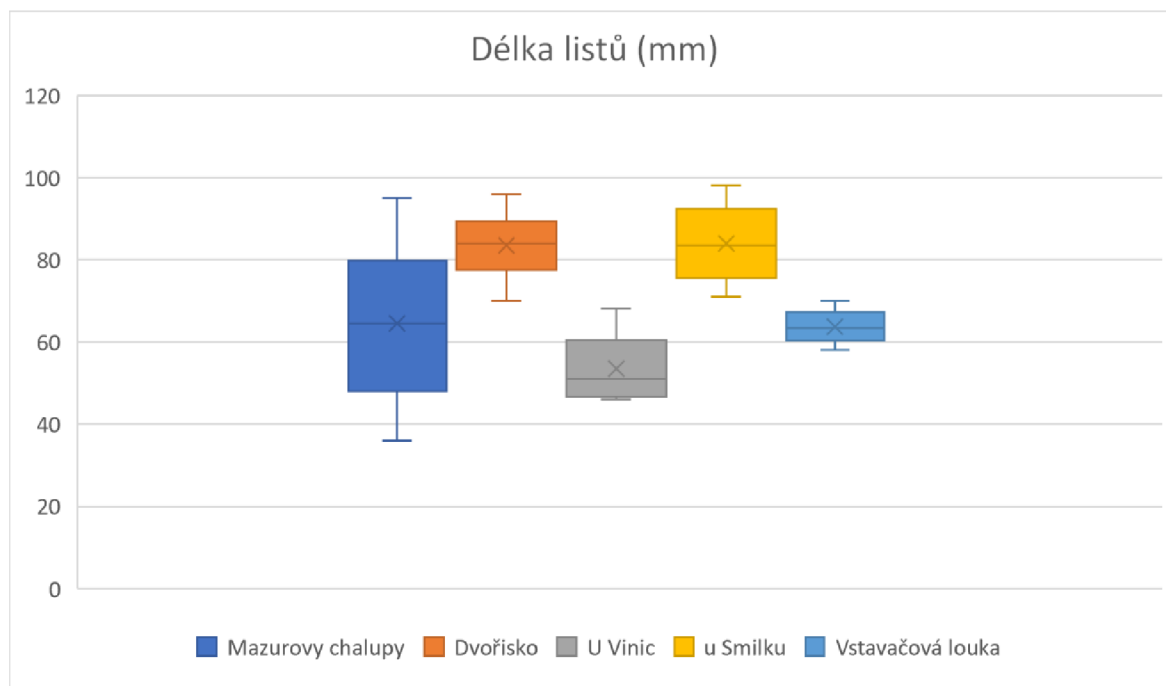


Obrázek 13 Zastoupení fertilních a sterilních jedinců na lokalitách

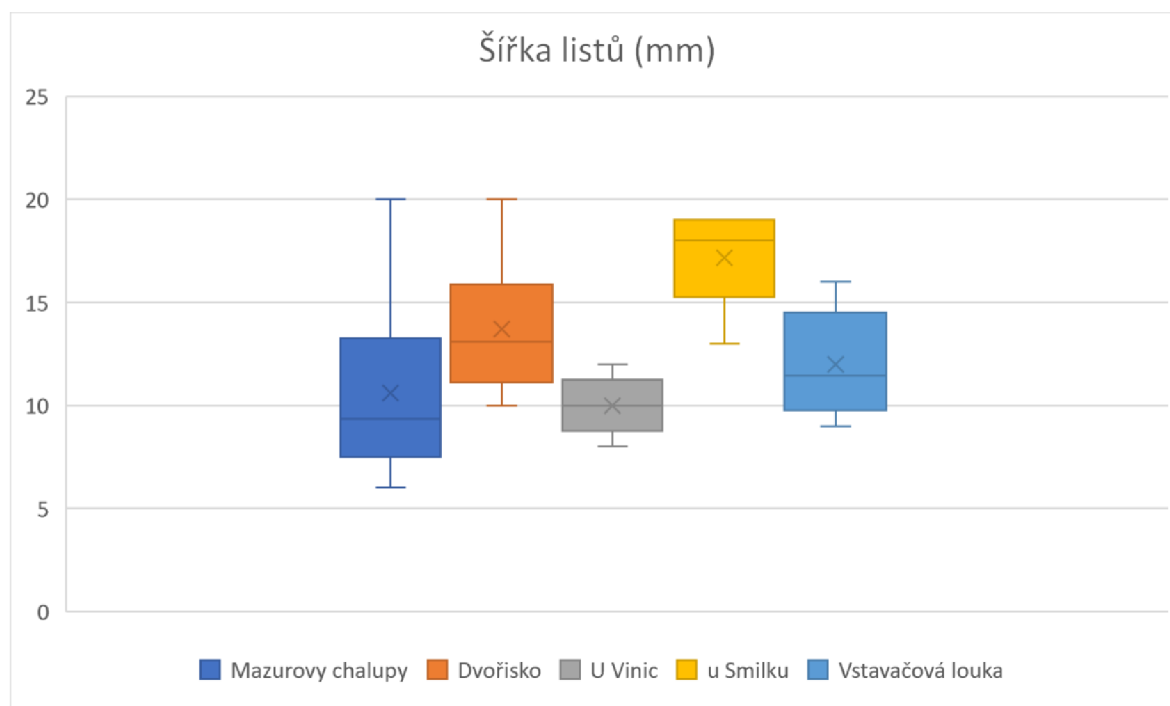


Obrázek 14 Zastoupení fertilních a sterilních jedinců na lokalitě Dvořisko

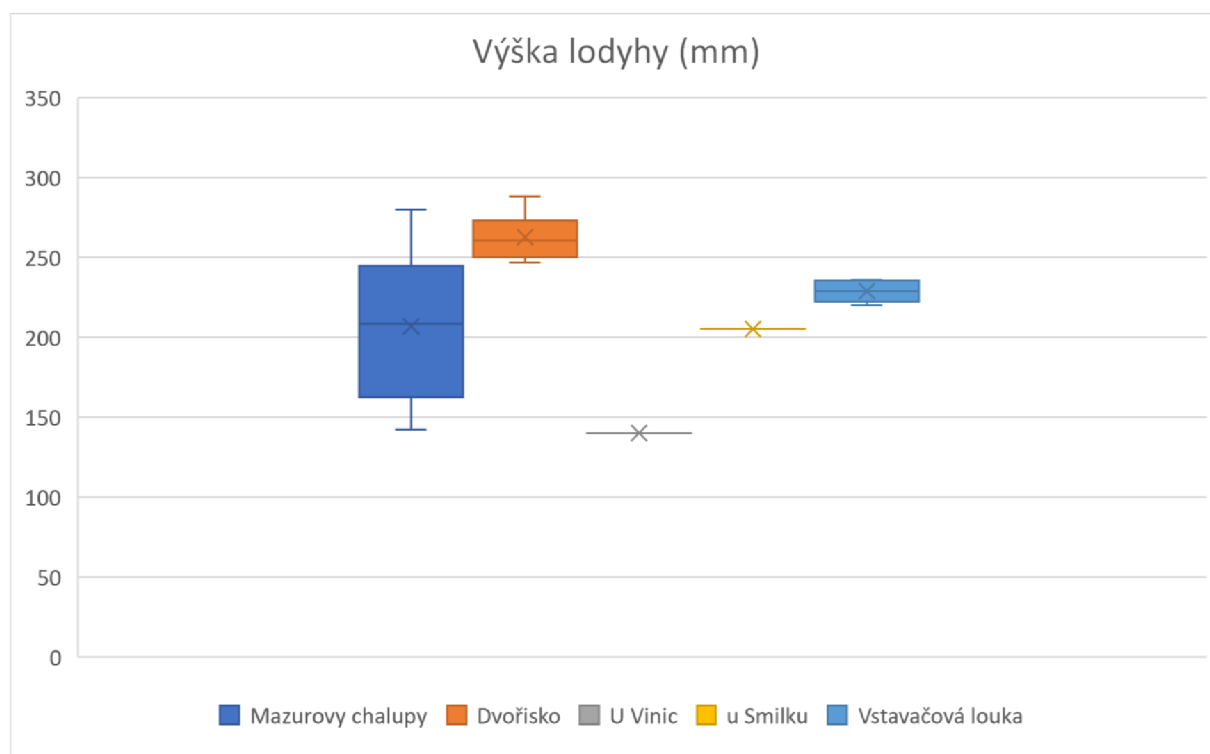
Kvalitativní monitoring byl zaměřen na parametry listů, lodyh a květů (Příloha 4). Nejdelší a nejširší listy měl jedinec rostoucí na lokalitě Chvojenec u Smilku. Nejkratší listy měl jedinec z lokality PP U Vinic, ale nejužší listy měli jedinci z Mazurových chalup. Nejvyšší jedinci s nejdelšími lodyhami byli nalezeni na lokalitě Dvořisko a jedinci s nejkratší lodyhou v PP U Vinic. Nejvyšším počtem květů disponovaly rostliny na lokalitě Dvořisko, naopak nejnižší počet květů měli jedinci na lokalitě PP Vstavačová louka a Chvojenec u Smilku (Obr. 15–18).



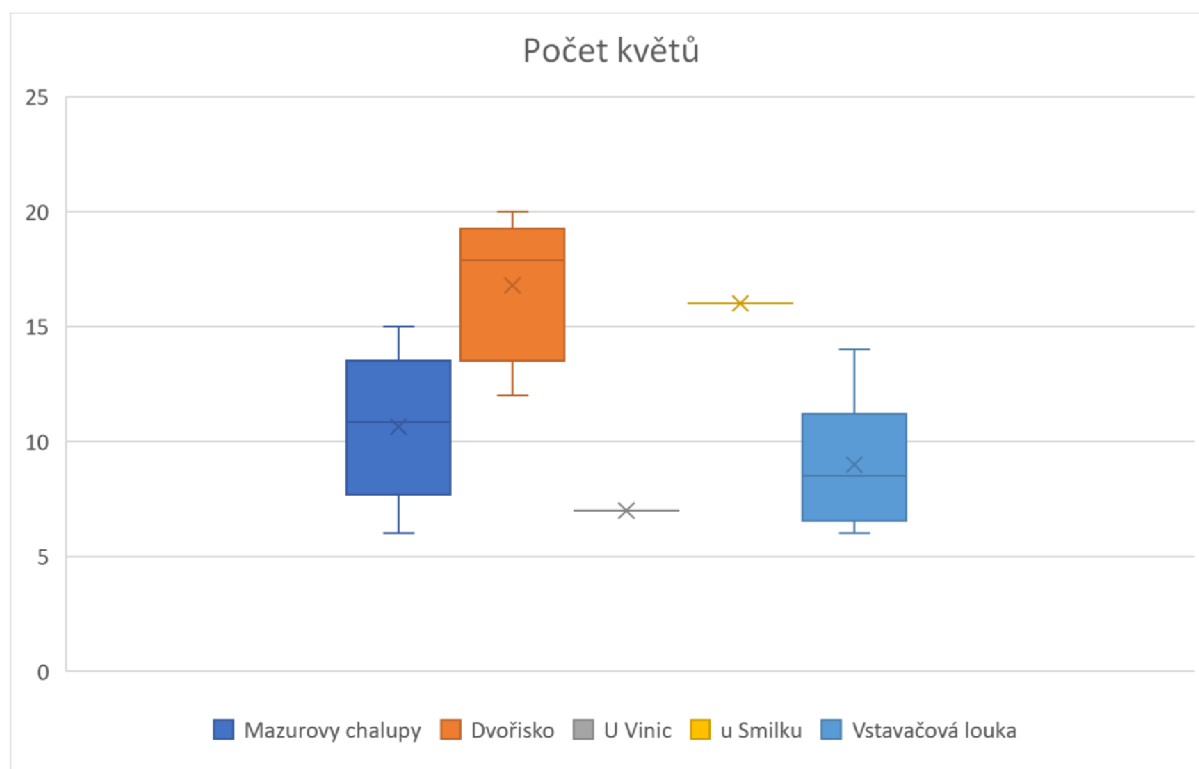
Obrázek 15 Délka listů jedinců z vybraných lokalit



Obrázek 16 Šířka listů jedinců z vybraných lokalit



Obrázek 17 Výška lodyhy jedinců z vybraných lokalit



Obrázek 18 Počet květů jedinců z vybraných lokalit

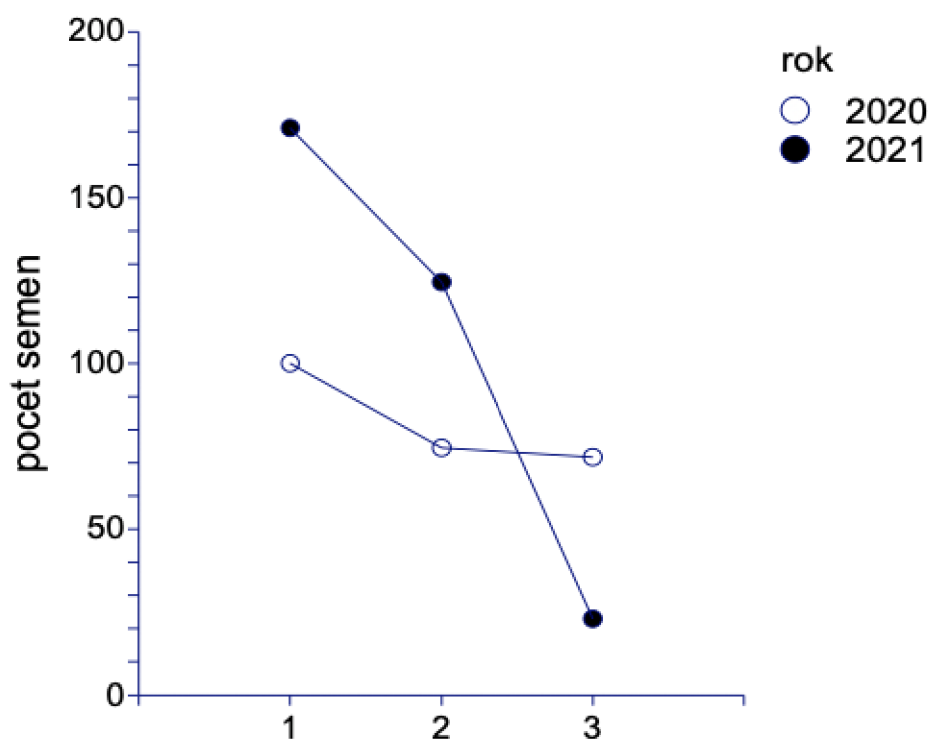
4.2 Zastoupení stupně vývinu semen v tobolkách

Sklizeň tobolek v kultuře probíhala v roce 2020 a u tobolek Mazurových chalup i v roce 2021 (Příloha 5). Sklizeň v roce 2021 probíhala v mírně odlišném stádiu pukání tobolek, proto vzniklo podezření, že v roce 2020 byly tobolky sebrány dříve a semena nemohla dostatečně dozrát. Pro pozorovaná semena byly vytvořeny 3 skupiny, podle stupně vývinu embrya v semenu. Počty vyvinutých, částečně vyvinutých a nevyvinutých semen se mezi jednotlivými lokalitami lišily (Obr. 20). Lišily se i mezi jednotlivými tobolkami z téže lokality (Obr. 22–25, Příloha 6).

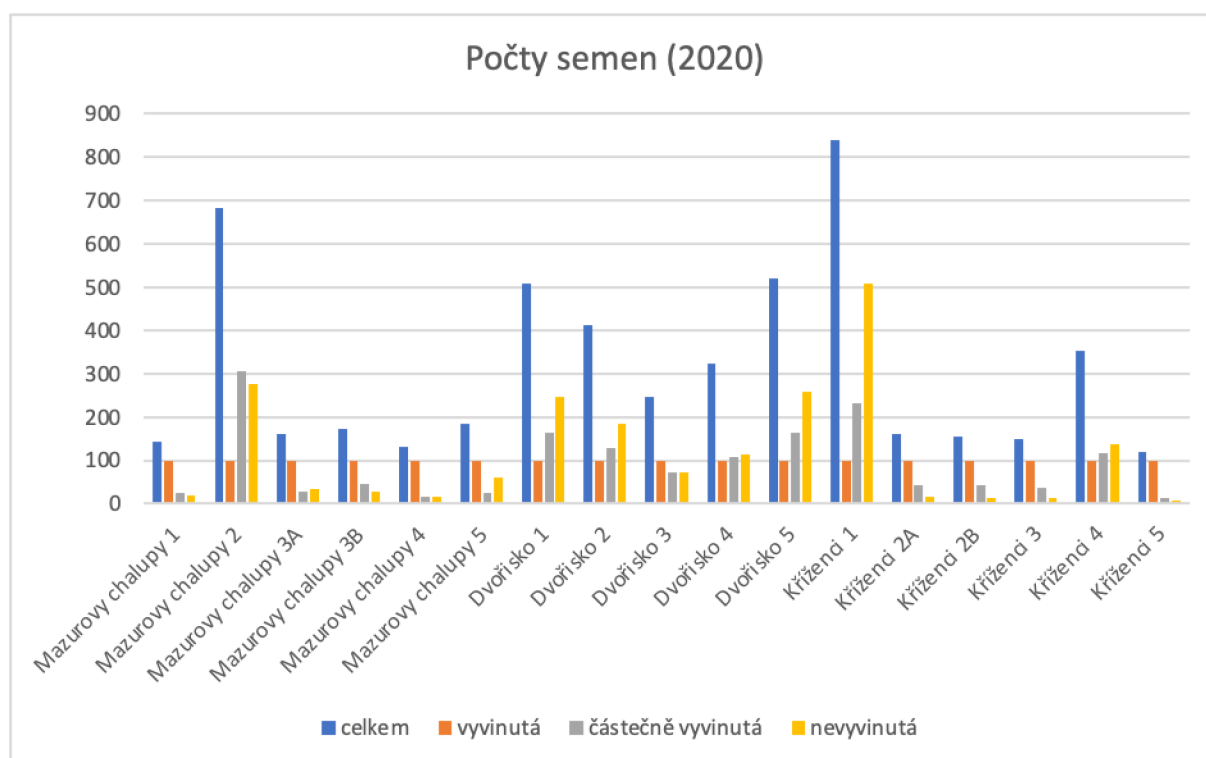
Statistická analýza (Anova) ukázala, že semena sklizená v jednotlivých letech se lišila, a to jak ve stadiu vývinu embrya (počty semen v rozlišovaných stádiích), tak i v kombinaci faktorů vývin embrya a rok sběru semen (Tab. 1, Obr. 19).

	DF	F	P
vývin embria	2	16,81	<0,001
rok	1	0,01	0,93
vývin embria x rok	2	7,66	0,001

Tab. 1 Odlišnost stavu vývinu embryí v semenech sklizených v odlišných letech 2020, 2021 (analýza ANOVA)



Obrázek 19 Odlišnost stavu vývinu embryí v semenech sklizených v odlišných letech 2020, 2021 (analýza ANOVA)

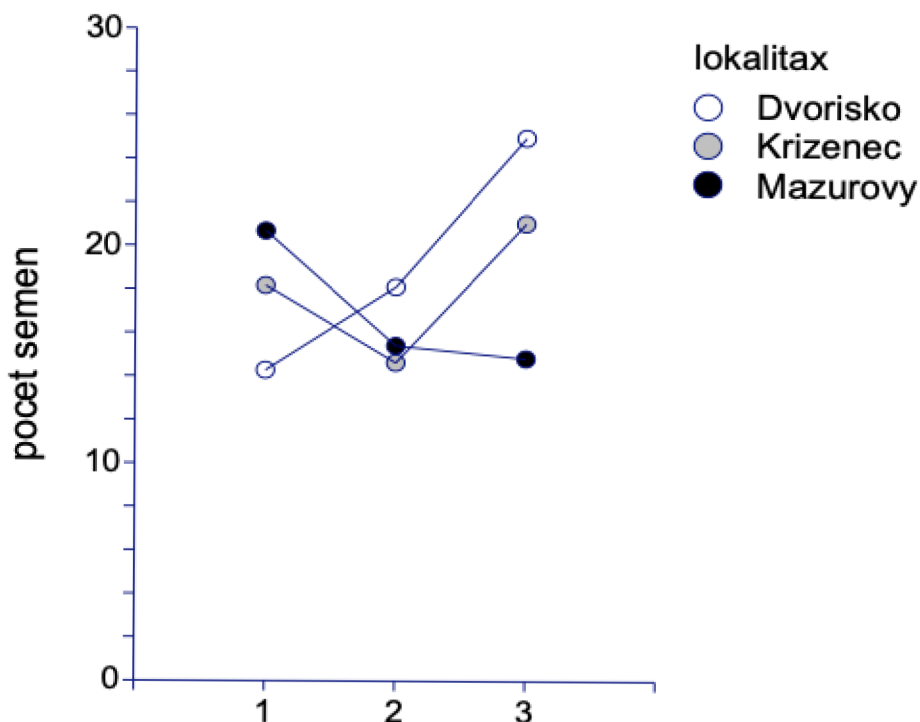


Obrázek 20 Počty semen odebraných z tobolek a jejich stupeň vývinu

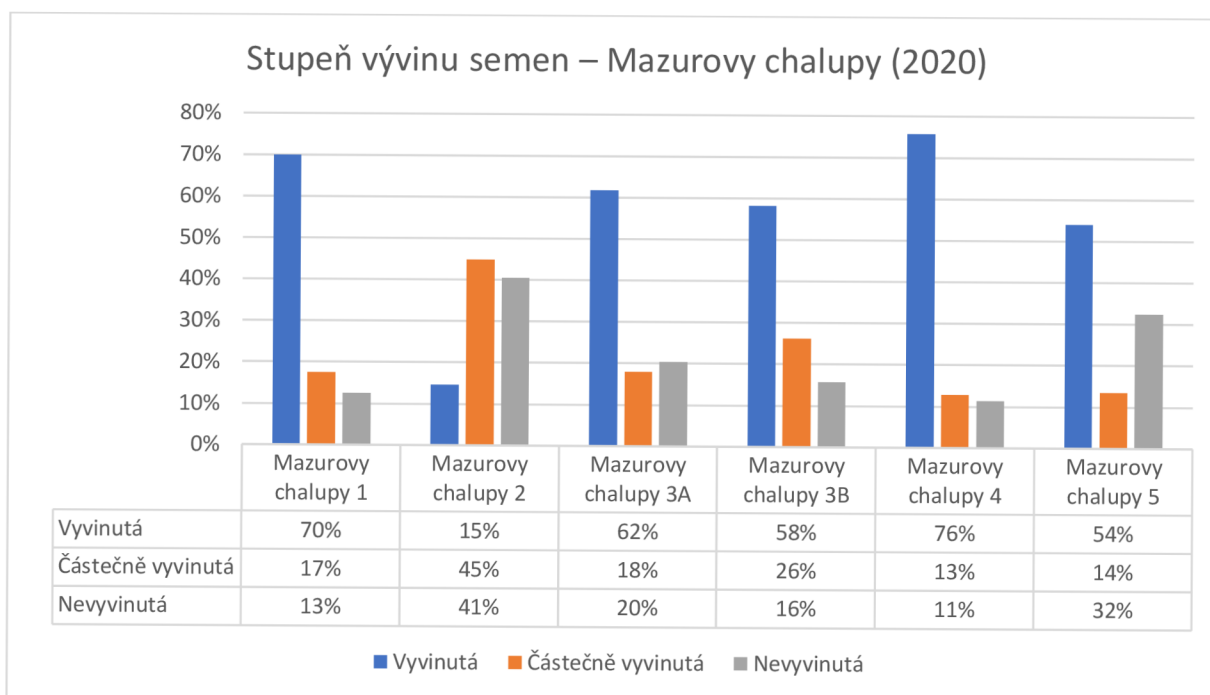
Statistická analýza (Anova) ukázala, že semena sklizená v kulturách z různých lokalit se lišila, a to jak ve stadiu vývinu embrya (počty semen v rozlišovaných stadiích), tak v jednotlivých kategoriích na jednotlivých lokalitách (Tab. 2, Obr. 21).

	DF	F	P
vývin embrya	2	4,22	0,016
lokalita	2	1,07	0,343
vývin embrya x lokalita	4	5,61	<0,001

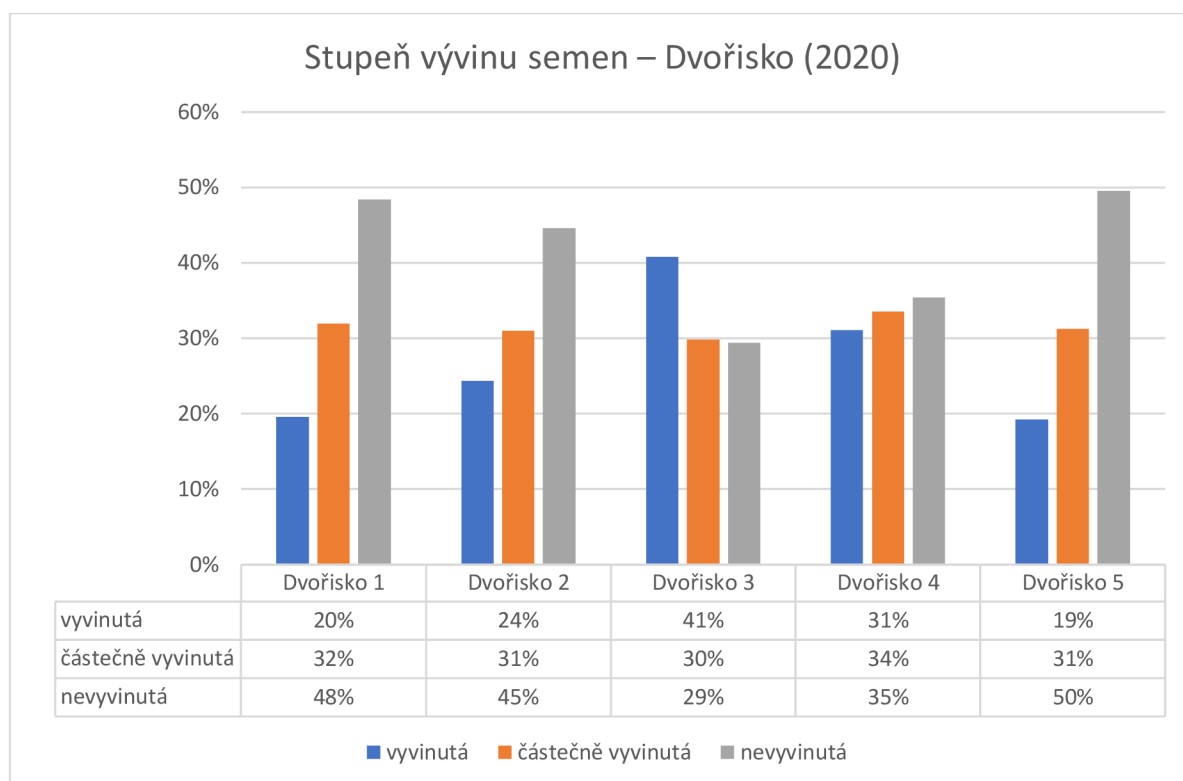
Tab. 2 Odlišnost stavu vývinu embryí v semenech sklizených v kulturách pocházejících z jednotlivých lokalit (analýza ANOVA)



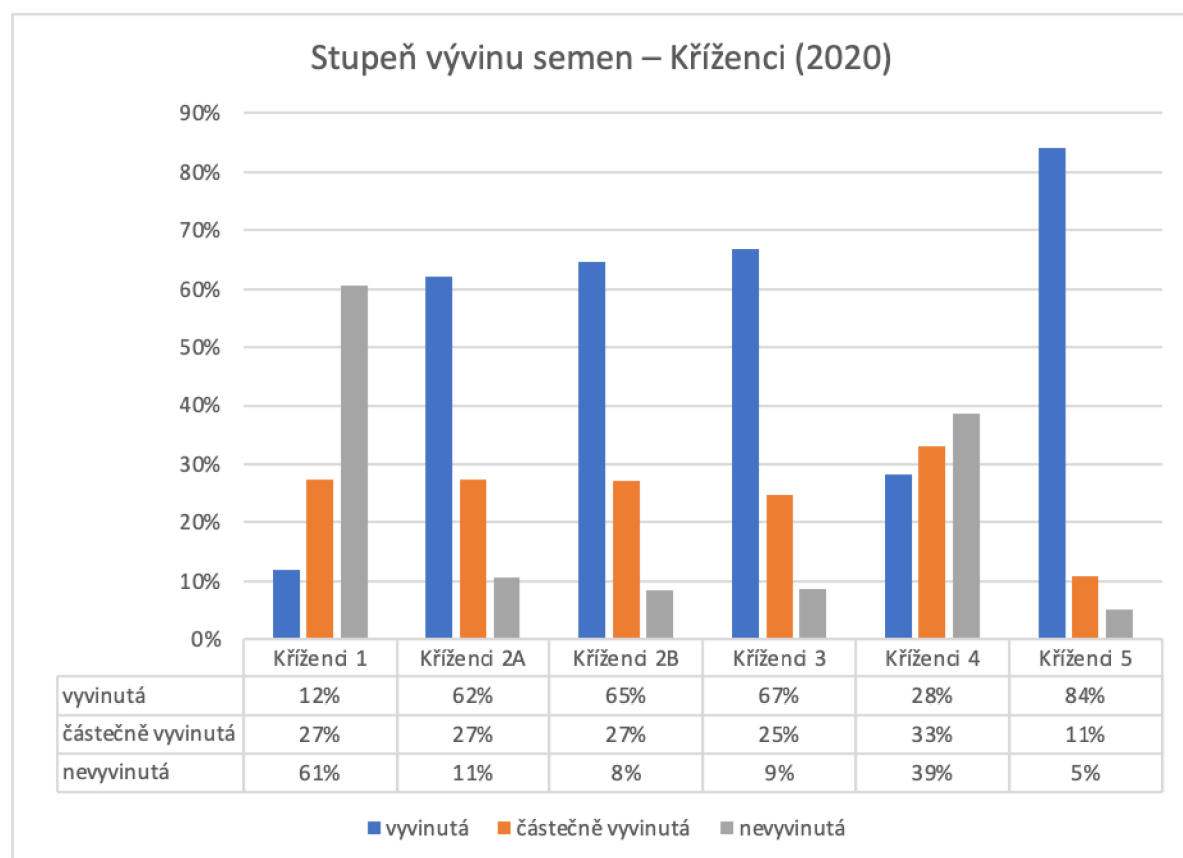
Obrázek 21 Odlišnost stavu vývinu embryí v semenech sklizených v kulturách pocházejících z jednotlivých lokalit (analýza ANOVA)



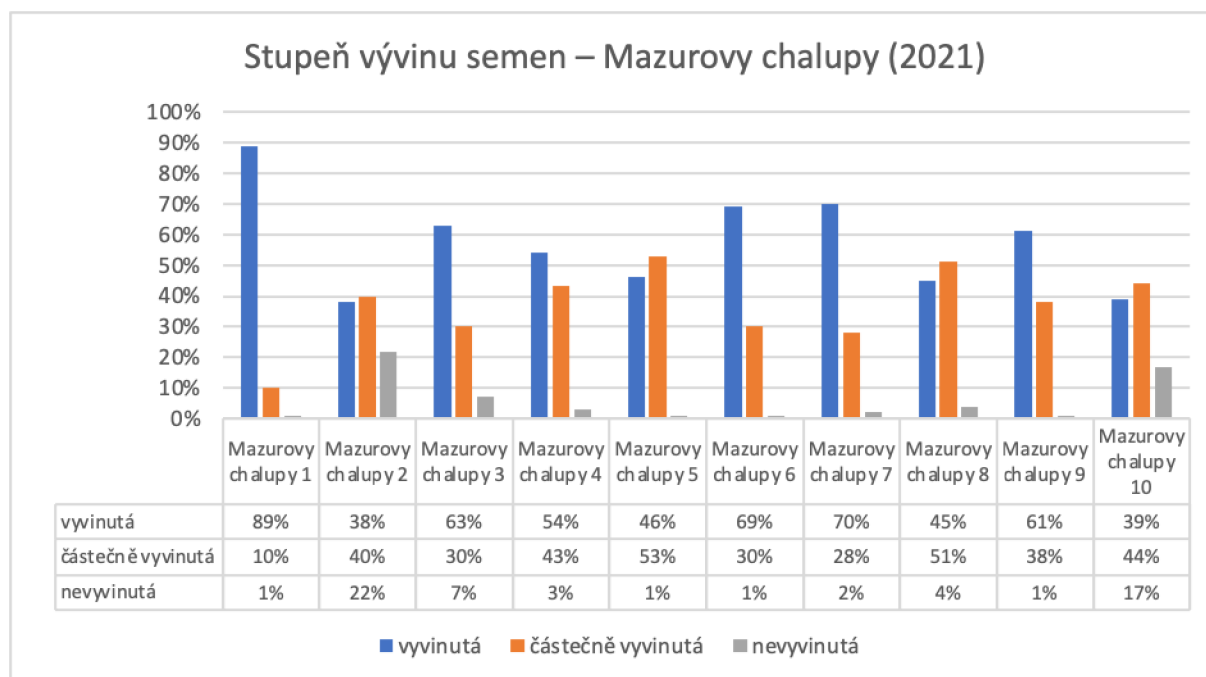
Obrázek 22 Obsah stádií vývinu semen z tobolek z lokality Mazurovy chalupy za rok 2020



Obrázek 23 Obsah stádií vývinu semen z tobolek z lokality Dvořisko za rok 2020



Obrázek 24 Obsah stádií vývinu semen z tobolek kříženců z lokalit Mazurovy chalupy a Dvořisko za rok 2020



Obrázek 25 Obsah stádií semen z tobolek z lokality Mazurovy chalupy za rok 2021

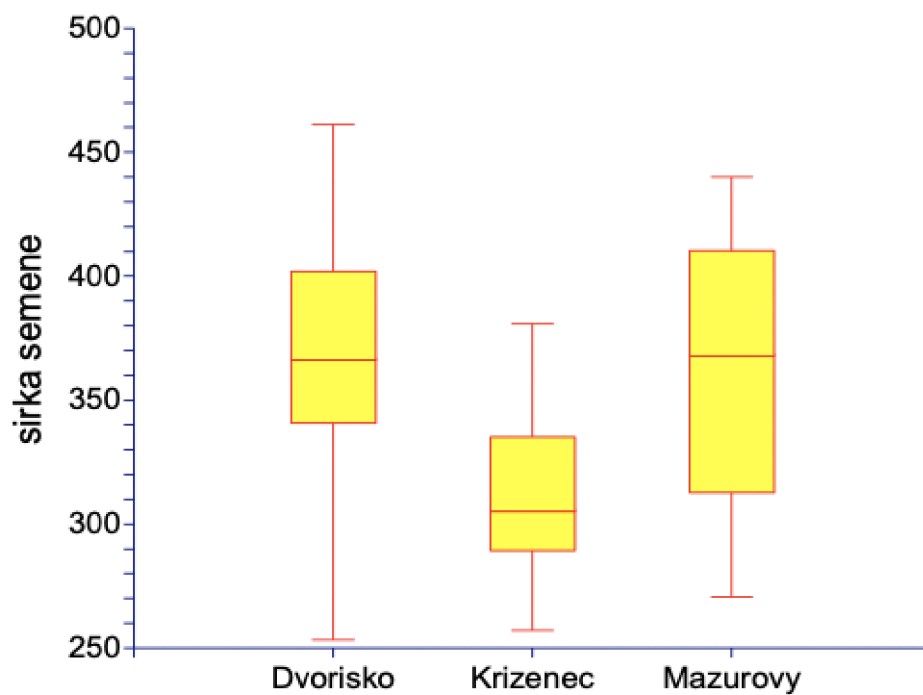
4.3 Rozměry pozorovaných semen a embryí

Na semenech, která byla sklizena v roce 2020, byly měřeny parametry délka a šířka semene (Příloha 7) a délka a šířka embrya (Příloha 8). Nejširší semena byla z první tobolky Dvořiska, nejužší byla semena kategorie Kříženci (Příloha 9). Nejdelší semena obsahovaly tobolky z lokality Mazurovy chalupy, naopak nejkratší byla semena z první tobolky Dvořiska (Příloha 10). Nejširší embrya semen byla nalezena v druhé tobolce Dvořiska a nejužší v tobolce čtvrté z téže lokality (Příloha 11). Nejvyšší hodnoty délky embrya byly naměřeny v třetí tobolce lokality Dvořisko, naopak nejnižší hodnoty délky embrya v první tobolce Dvořiska (Příloha 12).

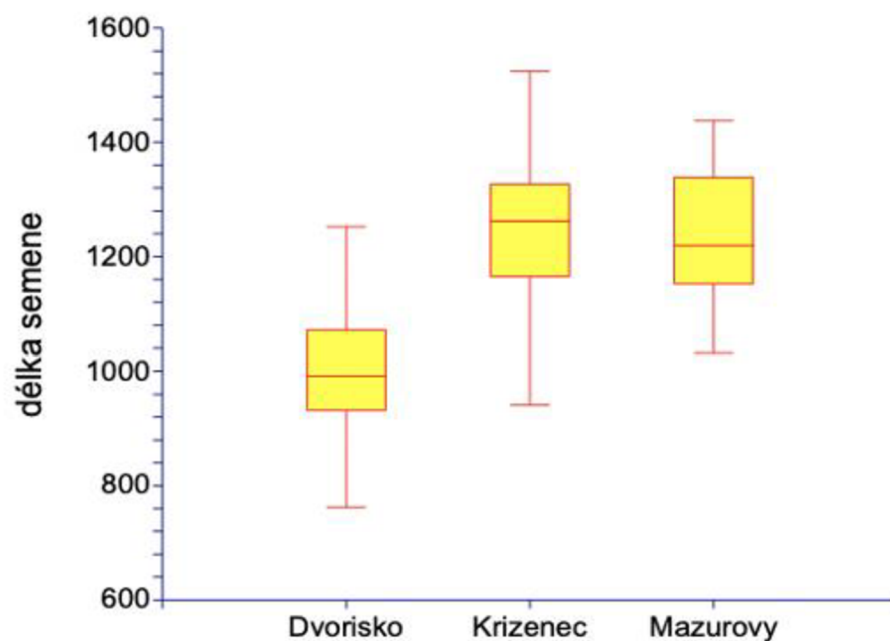
Bonferroniho test ukázal, že šířka semen se liší v kulturách kříženců od dvou zbývajících kultur. V případě délky semene se odlišovala semena z lokality Dvořisko od ostatních. Průkazné rozdíly nevyšly v případě porovnávání parametrů embryí mezi těmito třemi kulturami (Tab. 3, Obr. 26, 27).

	transformace	DF	F	P
šířka semene		2	9,43	<0,001
délka semene		2	63,42	<0,001
šířka embrya	LOG	2	0,55	0,577
délka embrya		2	1,16	0,318

Tab. 3 Odlišnost parametrů semen a embryí sklizených v kulturách pocházejících z jednotlivých lokalit (analýza ANOVA)



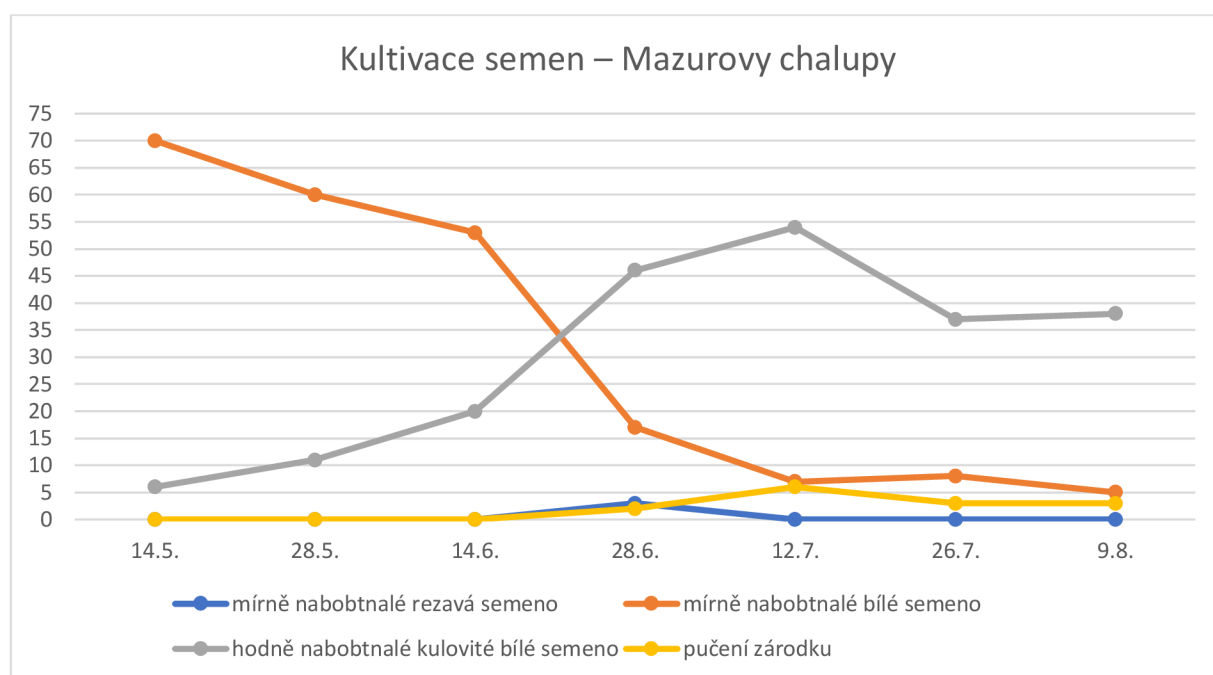
Obrázek 26 Odlišnost šířky semen sklizených v kulturách pocházejících z jednotlivých lokalit (analýza ANOVA)



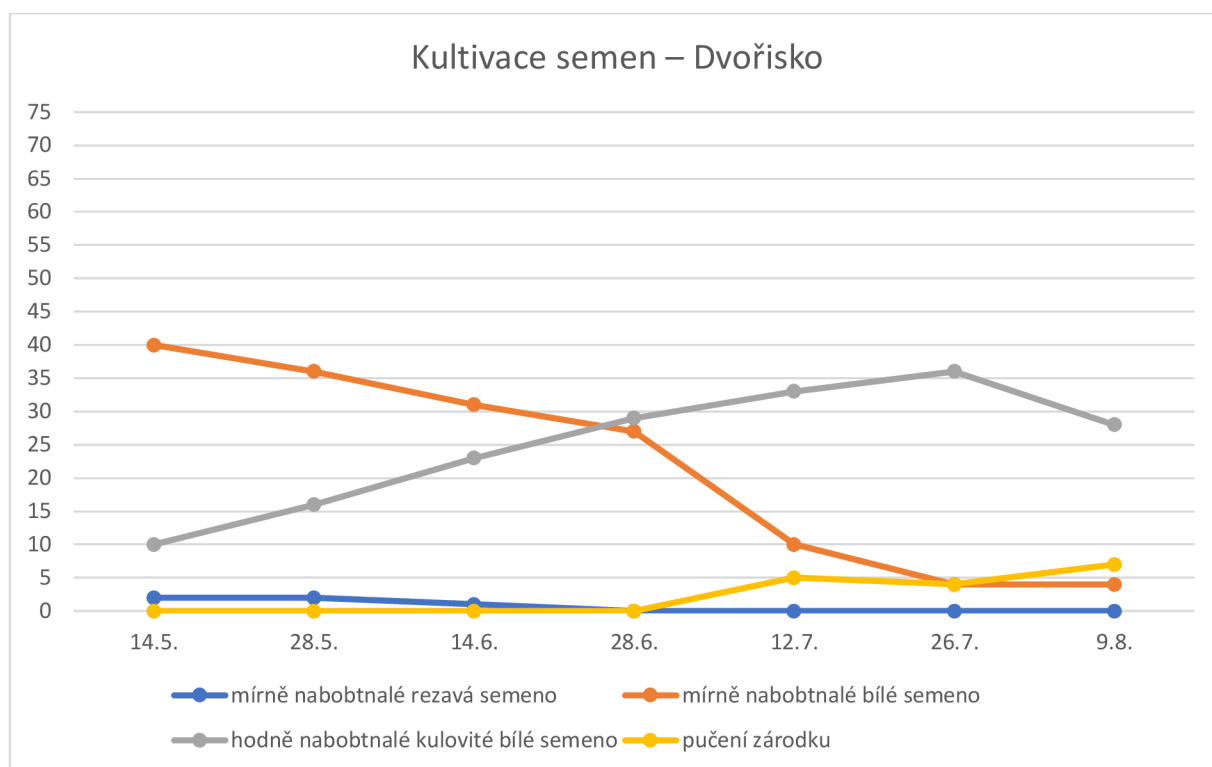
Obrázek 27 Odlišnost délky semen sklizených v kulturách pocházejících z jednotlivých lokalit (analýza ANOVA)

4.4 Zastoupení vývojových stádií v in-vitro kulturách

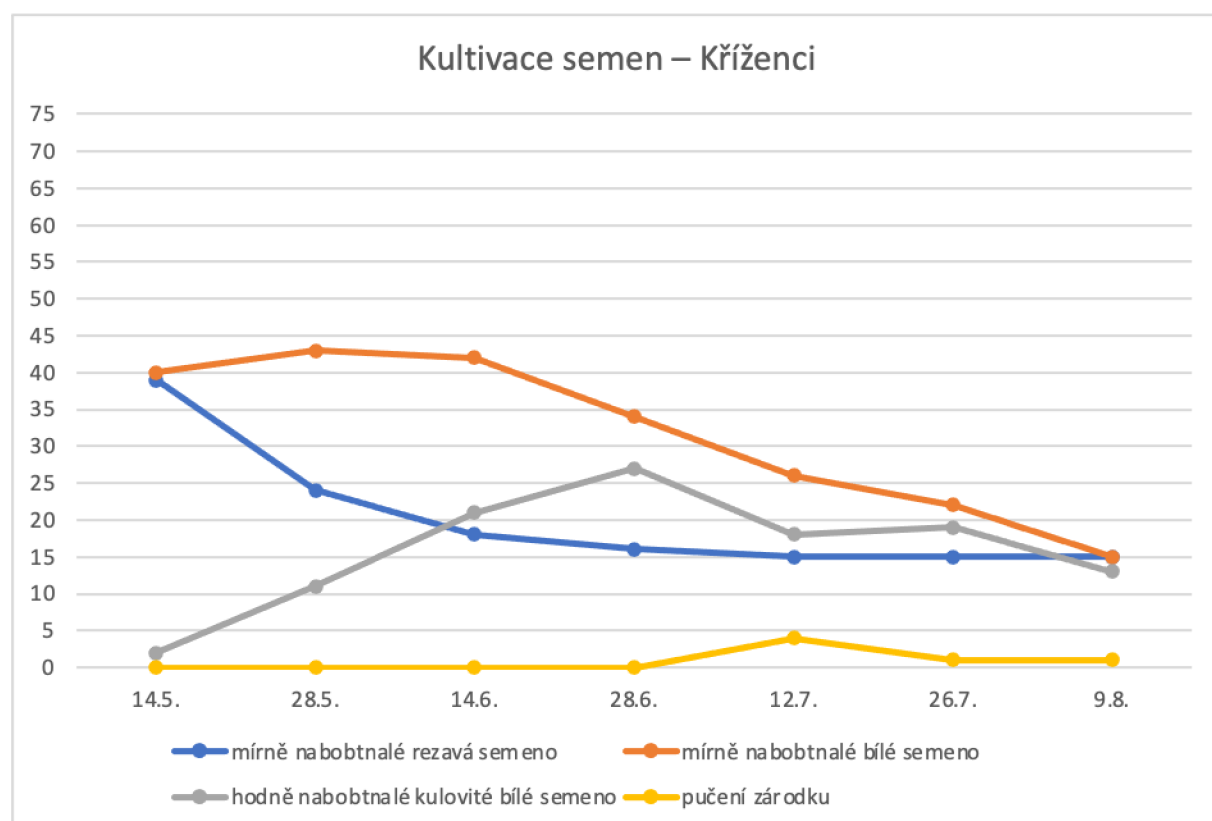
Semena z lokalit Mazurovy chalupy, Dvořisko a jejich kříženců byla kultivována v Petriho miskách od 30.4.2021 do 9.8.2021 (Příloha 13). Rozlišeny byly čtyři fáze vývoje semen (embrya). Mírně nabobtnalých rezavých semen (první fáze) bylo nalezeno nejvíce v Petriho miskách kříženců, kde nám i v závislosti na čase klesají počty mírně nabobtnalých bílých semen a hodně nabobtnalých kulovitých bílých semen (Obr. 30). Nejvyššího počtu poslední fáze (pučení zárodku) dosáhla semena z lokality Dvořisko (Obr. 29). Petriho misky se semeny z Mazurových chalup obsahovaly vysoké množství mírně nabobtnalých bílých semen v prvních 14 dnech pozorování a jejich další vývin zajistil vzestup počtu hodně nabobtnalých kulovitých bílých semen (Obr. 28).



Obrázek 28 Stupeň vývinu semen z lokality Mazurovy chalupy v in-vitro kultuře



Obrázek 29 Stupeň vývinu semen z lokality Dvořisko v in-vitro kultuře



Obrázek 30 Stupeň vývinu semen kříženců v in-vitro kultuře

5 Diskuze

5.1 Východočeské populace rudohlávku kukačky (*Anacamptis morio*)

Vývoj populací rudohlávku kukačky (*Anacamptis morio*) na lokalitách bývalého východočeského kraje se značně mění zejména na lokalitě Dvořisko a Mazurovy chalupy. Roku 2014, kdy byl proveden první monitoring Mazurových chalup, bylo nalezeno pouze 17 jedinců (4 fertlní a 13 sterilních). Nejvyšší počet jedinců byl v roce 2020, ve kterém bylo nalezeno 62 rostlin (35 fertlních, 25 sterilních a 2 semenáčky), za tímto nárustem populace stojí změna managementu a vystavění třech oplocenek. Ve vegetační sezoně 2015 bylo nalezeno 22 jedinců (21 fertlních, 1 sterilní), v roce 2016 55 jedinců (47 fertlních, 8 sterilních) a v roce 2017 bylo zaznamenáno snížení populace na 34 jedinců (19 fertlních, 15 sterilních), z důvodu nízkých úhrnů srážek a vysokého počtu mrazových dní. V roce 2018 bylo napočítáno 40 jedinců (25 fertlních, 15 sterilních) a v roce 2019 35 jedinců (21 fertlních a 14 sterilních) (PRAUSOVÁ et al. 2021). Při monitoringu, který byl vykonán 15.5. 2021, bylo na lokalitě Mazurovy chalupy nalezeno 25 fertlních, 31 sterilních jedinců a 1 semenáč.

Vývoj populace na lokalitě Dvořisko je sledován od roku 2013, kdy bylo nalezeno téměř 1100 fertlních jedinců (PRAUSOVÁ et al. 2014). Pozorovány byly pouze kvetoucí rostliny a počet nalezených jedinců mezi roky 2014 a 2020 se pohybují od 1500 do 2000. Pouze ve vegetační sezoně 2014 a 2019 se počet snížil pod hranici 1000 jedinců, kdy bylo v roce 2014 nalezeno 800 fertlních rostlin a v roce 2019 500 fertlních rostlin (PRAUSOVÁ et al. 2021). Nejvíce jedinců bylo zaznamenáno při našem monitoringu 15.5. 2021 (2 379 fertlních).

Populace rudohlávku kukačky na lokalitě U Vinic nepřekračuje hranici pěti jedinců už od roku 2014. Nejvyšší počet jedinců byl nalezen v roce 2015 (4 fertlní, 1 sterilní) a nejnižší v roce 2017, kdy nebyli nalezeni žádní jedinci z důvodu jejich nelegálního odstranění (PRAUSOVÁ et al. 2021). V rámci našeho monitoringu v roce 2021 byl nalezen 1 fertlní a 1 sterilní jedinec.

Na lokalitě Louka u Smilku byl zaznamenán nejvyšší počet jedinců v roce 2016 (6 fertlních, 2 sterilní), 2017 (6 fertlních) a 2015 (5 fertlních). V ostatních vegetačních sezonách počet dosahoval maximálního počtu 2 jedinců (PRAUSOVÁ et al. 2021). Při monitoringu v roce 2021 byl nalezen jeden fertlní jedinec.

Výskyt rudohlávku kukačky na lokalitě PP Vstavačová louka čítala až do roku 2020 do pěti jedinců. Nejméně jich bylo nalezeno v letech 2014 (2 fertlní) a 2017 (2 fertlní) (PRAUSOVÁ et al. 2021). Monitoring, probíhající v roce 2021, nám umožnil nalézt 4 fertlní jedince a 3 sterilní jedince.

Nejnovější výskyty rudohlávku kukačky zaznamenané Agenturou ochrany přírody a krajiny ČR, které jsou datovány od roku 2010 do současnosti, jsou především v Podšumaví, v horním Podyjí, v předhůří Karpat, na území Zlínského, Plzeňského, Karlovarského a Jihočeského kraje, kde bylo pravděpodobně zaznamenáno nejvíce nálezů (AOPK ČR 2022a).

5.2 Plody a semena rudohlávku kukačky (*Anacamptis morio*)

Průša (2005) uvádí, že plodem rudohlávku kukačky je úzce elipsoidní tobolka, která dosahuje délky 15–23 mm. Tobolky pozorované v rámci této práce stereolupou typu Digital Microscope VHX-700 Series dosahovaly délky 14,74–18,12 mm. Rozměry tobolek se lišily jak mezi lokalitami, tak i mezi tobolkami téže lokality. Největší i nejmenší tobolka byla z lokality Mazurovy chalupy. Podle studie Gülera (2016) se protáhlá semena skládají z eliptického embrya, které je uzavřeno v průhledném obalu. Testa a embrya disponují hnědou barvou, antiklinální a periklinální stěny buněk testa síťovinou, která je tenká, nenápadná a příčně diagonální. Semena zkoumané v této studii dosahovaly délky 376–640 μm a šířky 141–208 μm . Embrya dosahovala délky 124–183 μm a šířky 92–140 μm . Přítomnost eliptického embrya a tenké příčně diagonální síťoviny lze podle aktuálních pozorování potvrdit, ale rozměry semen i embryí se v tomto případě liší. Zkoumaná semena dosahovala délky 762–1524 μm , nejkratší semeno obsahovala tobolka z lokality Dvořisko a nejdelší semeno tobolka kříženců. Šířka semen dosahovala 266–460 μm . Nejužší semeno bylo z tobolky kříženců a nejširší z tobolky Dvořiska. Délky a šířky embryí zkoumaných semen byly také o poznání vyšší, délka 231–469 μm a šířka 130–334 μm . Nejdelší i nejširší embrya měla semena z lokality Dvořisko, nejkratší naopak kříženci jedinců z lokalit Dvořisko a Mazurovy chalupy. Nejužší embrya se také nacházela v semenech z lokality Dvořisko. Rozměry semen i embryí byly odlišné mezi lokalitami i mezi tobolkami téže lokality. Podle statistických analýz (Anova) byly rozdíly v parametrech semen pocházejících z různých kultur (Mazurovy chalupy, Dvořisko, Kříženci) průkazné. U rozměrů embryí rozdíly v šířce a délce embryí průkazné nebyly.

5.3 Kvalita semen rudohlávku kukačky (*Anacamptis morio*)

Zastoupení jednotlivých kategorií semen podle vyvinutosti se mezi lokalitami průkazně lišilo. Nejnížší zastoupení plně vyvinutých semen měly tobolky z lokality Dvořisko, kde se počty plně vyvinutých semen pohybovaly mezi 19–41 %, částečně vyvinutá semena byla zastoupena mezi 30–34 % a nevyvinutá 29–50 %. Tobolky z lokality Mazurovy chalupy obsahovaly až 76 % plně vyvinutých semen, pouze jedna z pěti tobolek obsahovala jen 15 % plně vyvinutých semen. Částečně vyvinutá semena byla v tobolkách zastoupena v rozmezí 13–45 % a nevyvinutá 11–41 %. Zastoupení vyvinutých semen v tobolkách kříženců bylo také vysoké, jen dvě tobolky obsahovaly nižší počet plně vyvinutých semen (12 % a 28 %), v ostatních tobolkách se vyvinutá semena pohybovala mezi 62–84 %. Obsah částečně vyvinutých semen v tobolkách kříženců byl 11–33 % a nevyvinutých 5–61 %. Důkazem přítomnosti živé části semene (embrya) bylo barvení pomocí 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride, který umožnil zdůraznit živé embryo s typickým eliptickým tvarem.

Statisticky bylo prokázáno, že odlišná doba sběru tobolek Mazurových chalup mezi roky 2020 a 2021 neměla vliv na obsah jednotlivých kategorií semen v tobolkách. Hypotéza je tedy nulová, počet plně vyvinutých semen v tobolkách se nelišil.

5.4 Klíčení semen rudohlávku kukačky (*Anacamptis morio*)

Ke klíčení semen dochází v okamžiku, kdy jsou splněné podmínky vhodné pro klíčení. Embryo začne přijímat vodu a zvětšovat svůj objem, tento jev vede k protržení osemení a jeho možné ztrátě. Embryonální buňky produkují útvary podobné kořenovým vláskům za využití svých vlastních zásob. Pokud semeno své zásoby vyčerpá, musí navázat mykorrhizní symbiózu, která dodává chybějící energii. Přítomnost mykorrhizy umožňuje další dělení embrya za vzniku oválného útvaru (protokorm). V Petriho miskách, využívaných ke kultivaci semen, bylo možné sledovat semena se zvětšujícím se embryem. Další fází, kterou bylo možné sledovat byla ztráta osemení (pouze u několika semen) a vznik hodně nabobtnalého kulovitého bílého semena. Poslední sledovanou fází bylo vyklíčené semeno, ze kterého vyrůstal protokorm. Petriho misky se semeny z lokality Mazurovy chalupy dosáhly 12.7.2021 počtu 7 (fáze 2), 54 (fáze 3) a 6 (fáze 4). Petriho misky se semeny z lokality Dvořisko dosáhly 9.8.2021 počtu 4 (fáze 2), 28 (fáze 3) a 7 (fáze 4). Petriho misky se semeny kříženců dosáhly 12.7.2021 počtu 15 (fáze 1), 26 (fáze 2), 18 (fáze 3) a 4 (fáze 4). Nejvyššího počtu semen s přítomností protokormu (4. stádium vývoje) dosáhly Petriho misky se semeny z lokality Dvořisko. Další vývoj semen byl zastaven z důvodu kontaminace.

V případě semen z lokality Mazurovy chalupy dosáhlo 4. stádia vývoje pouze 6 semen (ze 76 semen skutečně přenesených na kultivační medium), v přírodě bude toto číslo negativně ovlivněno nepříznivým počasím, nepřítomností skupiny symbiotických hub, zvěří či třeba anemochorií, kdy je semeno přeneseno na nevhodná stanoviště.

6 Závěr

Největší populace rudohlávku kukačky ve východních Čechách se nachází na sportovním letišti Dvořisko u Chocně, tato stabilní populace čítá přes dva tisíce jedinců a má kolísající trend vývoje. Další populace s kolísajícím trendem vývoje roste v přírodní rezervaci Mazurovy chalupy. Vstavačová louka a přírodní památka U Vinic s mikropopulací rudohlávku kukačky má kolísající vývojový trend. Nejméně jedinců se nachází na louce u Smilku, tato mikropopulace má kolísající až klesající trend vývoje.

Obsah životaschopných semen z tobolek Mazurových chalup se pohybuje v rozpětí 15–76 %. První tobolka Mazurových chalup obsahovala v průměru na 100 semen 70 plně vyvinutých (životaschopných) semen, druhá tobolka měla nejnižší obsah plně vyvinutých semen a to 15. Tobolka číslo tři, kterou jsme opakovaně zkoumaly, obsahovala 58 a 62 plně vyvinutých semen v průměru na 100. Čtvrtá tobolka obsahovala 76 životaschopných semen a pátá 54. Obsah plně vyvinutých semen z tobolek Dvořiska se pohybuje v rozpětí 19–41 %. Nejnižší počet životaschopných semen v průměru na 100 měla tobolka číslo pět s obsahem 19 semen. Naopak nejvyšší počet byl zaznamenán u tobolky číslo tři (41 životaschopných semen). Obsah životaschopných semen z tobolek kříženců se pohybuje v rozpětí 12–84 %. Nejméně plně vyvinutých semen se nacházelo v tobolce číslo jedna (12), naopak nejvíce (84) plně vyvinutých semen v průměru na 100 obsahovala tobolka číslo pět. Průměrný obsah plně vyvinutých (životaschopných) semen v tobolkách z lokality Mazurovy chalupy je 55,8 %, tobolky Dvořiska průměrně obsahují pouhých 27 % plně vyvinutých semen a tobolky kříženců těchto dvou lokalit obsahují 53 % životaschopných semen.

Počet skutečně vyklíčených semen, respektive semenáčků, je výrazně nižší než počet životaschopných semen. V jejich klíčení hraje roli mnoho faktorů (přítomnost mykorhizní houby nebo dostatek živin v náhradním mediu v in-vitro kultuře, přítomnost kontaminujících mikroorganismů, teplotní a vlhkostní poměry na lokalitě). V in-vitro kultuře, kde klíčení probíhalo za stabilních teplotních a vlhkostních podmínek a testována byla pouze plně vyvinutá semena, bylo schopno dosáhnout nejvyššího stupně klíčení 6 ze 76 semen lokality Mazurovy chalupy, 7 z 52 semen lokality Dvořisko a 4 z 81 semen kříženců. Tyto hodnoty budou v přírodě ještě nižší vzhledem k proměnlivosti stanovištních poměrů.

7 Literatura

AOPK ČR, 2022: Nálezová databáze ochrany přírody. [on-line databáze; portal.nature.cz]. RRRR-MM-DD; Dostupné z: < https://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez_public.php?idTaxon=38459 >

BAUMANN H., KÜNKELE S., LORENZ R., 2009: Orchideje Evropy a přilehlých oblastí. Praha: Academia. Atlas (Academia). 355 p., ISBN 978-80-200-1692-8.

FALTYSOVÁ H., BÁRTA F. et al. (2002): Pardubicko. – In: Mackovčín P. et Sedláček M. [eds]: Chráněná území ČR, svazek IV. AOPK ČR, EkoCentrum Brno, Praha, 319 pp.

GRULICH V. et CHOBOT K., 2017: Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Cévnaté rostliny. Praha: Příroda, 35: 1–178. 92 p., ISBN: 978-80-88076-47-6.

GRYNDLER M. et al., 2004: Mykorhizní symbióza: O soužití hub s kořeny rostlin. Praha: Academia. 366 p., ISBN 80-200-1240-0.

GÜLER N., 2016 Seed micromorphology of *Orchis Tourn. ex L.* (Orchidaceae) and allied genera growing in Edirne province, Turkey 68: 9–25

HOSKOVEC L., 2007: ANACAMPTIS MORIO (L.) R. M. Bateman, Pridgeon et M. W. Chase – rudohlávek kukačka / červenohlav obyčejný. [online] BOTANY. CZ. Dostupné z: <<http://botany.cz/cs/Orchis-morio/>>

CHYTRÁ M., 2015: Vstavačovité – Orchidaceae. [online] Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/bot_zahr/media/pdf/clanky/Vstavacovite.pdf>

JERSÁKOVÁ J. et KINDLMANN J., 2004: Zásady péče o orchidejová stanoviště. České Budějovice: Kopp. 119 p., ISBN 80-7232-254-0

JERSÁKOVÁ J. et MALINOVÁ T. 2007: Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* 176: 237–241

JERSÁKOVÁ J. a PRŮŠA D. 2021: Rostlina roku 2021 – vstavač kukačka / Plant of the Year 2021 – Green-winged Orchid. *ŽIVA* 2021(3): 114-116

JEŽEK J., 2013: Orchideje na letišti. [online]. *Krajinou a přírodou východních Čech*. Dostupné z: <<http://bohemiaorientalis.cz/orchideje-na-letisti-2>>

KOCIÁN P., 2006: Vstavač kukačka. [online] *Květena ČR*. Dostupné z: <<http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=422>>

MACHOVÁ I. et KUBÁT K., 2004: Zvláště chráněné a ohrožené druhy rostlin Ústecka. Praha: Academia. 220 p., ISBN 80-200-1158-7.

PLADIAS, 2022: Databáze české flóry a vegetace. [online, cit. 16.5. 2022] Dostupné z: <<http://pladias.ibot.cas.cz/search>>

PONERT J., 2016: Jak rostou orchideje ze semen. *ŽIVA* 2016(4): 168-171

- PONERT J., VOSOLSOBĚ S., KMECOVÁ K. et LIPA VSKÁ H., 2012: European orchid cultivation – from seed to mature plant. *EUROPEAN JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES.*, 1(2), 95-107. ISSN 2336-1964
- PRAUSOVÁ R., 2000: Plán péče PR Mazurovy chalupy na období 2001–2010. Ms. [Depon in: Krajský úřad Pardubického kraje, Pardubice].
- PRAUSOVÁ R., 2014: Plán péče o PR Mazurovy chalupy. [online] Krajský úřad Pardubického kraje. Dostupné z: <<https://www.pardubickykraj.cz/plany-pece-o-zvlaste-chranena-uzemi/76913/prirodni-rezervace-mazurovy-chalupy-prehlaseni>>
- PRAUSOVÁ R. & MAŠKOVÁ K., 2012: Rostlinná společenstva s výskytem zvláště chráněných a ohrožených druhů cévnatých rostlin v přírodní rezervaci Mazurovy chalupy (okres Pardubice). – *Vč. sb. přír. – Práce a studie, Pardubice*, 19: 57–92.
- PRAUSOVÁ R., ANDRES M. & ŠIMŮNEK J., 2021: Záchrana populace vstavače obecného (*Orchis morio*) v PR Mazurovy chalupy. – *Vč. sb. přír. – Práce a studie, Pardubice*, 27: 77–98.
- PRAUSOVÁ R., ANDREAS M., ŠIMŮNEK J., ANDREASOVÁ T. et al., 2021: Stav populací rudohlávku kukačky – *Anacamptis morio* (L.) Bateman, Pridgeon & Chase v Choceňské plošině ve východních Čechách. *ACTA MUSEI REGINAEHRADECENSIS S. A.*, 39: 89-104. ISSN 0231-9616
- PROCHÁZKA F., 1980: Naše orchideje. Pardubice: Krajské muzeum východních Čech – pracoviště Pardubice. 296 p.
- PROCHÁZKA F. et VELÍŠEK V., 1983: Orchideje naší přírody. Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd. Živou přírodou. 284 p. ISBN 21- 018-83.
- PRŮŠA D., 2005: Orchideje České republiky. Brno: Computer Press. 192 p. ISBN 80-251-0726-4
- RASMUSSEN, H. N., 2006: Terrestrial orchids- from seed to mycotrophic plant. Cambridge, U.K: Cambridge University Press. ISBN 978-0521451659.
- STROH P. A., 2015: *Anacamptis morio* (L.) Bateman, Pridgeon & Chase. Green – winged Orchid. Species Account. Botanical Society of Britain and Ireland.
- SZKANDEROVÁ M., 2006: Využití mykorrhizních hub při pěstování rostlin. Brno. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta. Dostupné na portálu univerzity: is.mendelu.cz
- SWARTS N. D. et DIXON K. W., 2009: Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3): 543-556. ISSN 1095-8290
- ŠTĚPÁNKOVÁ J., CHRTEK J., KAPLAN Z. (eds.), 2010: Květena České republiky. Sv. 8. Praha: Academia. 712 p., ISBN 978-80-200-1824-3.

8 Přílohy

Příloha 1. Tobolka rudohlávku kukačky (*Anacamptis morio*)



Příloha 2. Tobolka rudohlávku kukačky (*Anacamptis morio*) s měřenými hodnotami



Příloha 3. Semeno rudohlávků kukačky (*Anacamptis morio*) s plně vyvinutým embryem barveno barvivem TTC



Příloha 4. Výsledky monitoringu Mazurovy chalupy (oplocenka1)

číslo štítku	počet <i>Anacamptis morio</i>	počet štů	počet štů	délky štů (ks)	délky štů (ks)	délky štů (ks)	šířky štů (ks)	šířky štů (ks)	šířky štů (ks)	délky štů (ks)	délky štů (ks)	délky štů (ks)	šířky štů (ks)	šířky štů (ks)	šířky štů (ks)	výška body (ks)	výška body (ks)	počet větvi	počet větvi
č. 3	2F	8	7	60	60	52	6	9	7	63	48	39	8	8	10	163	144	6	8
u. 4 (bez štítku)	1S nová	7	7	79	62	58	8	9	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
č. 8	1F	10	7	54	53	52	11	10	9	7	7	7	7	7	7	142	7	13	7
č. 11	1S	3	7	39	40	49	10	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
č. 12	1S	10	7	69	86	79	13	13	12	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
u. 4 (bez štítku)	1S	4	7	47	41	45	7	10	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

7

Mazurovy chalupy (vně oplocenky 2)

číslo štítku	č. 16	1F + 1S	9	94	69	81	14	12	11	11	9	210	223	218	13	10	počet květů 2. ks			
	č. 50	1F + 1S	8	93	83	92	11	12	11	11	9	210	223	218	13	10	počet květů 1. ks			
	č. 51	1F	5	61	72	72	12	12	11	9	9	210	223	218	13	10	výška lodyhy 2. ks (mm)			
																	výška lodyhy 1. ks (mm)			
																	šířky listů 2. ks			
																	šířky listů 2. ks			
																	šířky listů 2. ks			
																	délky listů 2. ks (mm)			
																	délky listů 2. ks (mm)			
																	délky listů 2. ks (mm)			
																	šířky listů 1. ks (mm)			
																	šířky listů 1. ks (mm)			
																	šířky listů 1. ks (mm)			
																	délky listů 1. ks (mm)			
																	délky listů 1. ks (mm)			
																	délky listů 1. ks (mm)			
																	počet listů 2. ks			
																	počet listů 1. ks			
																	počet ks <i>Anacamptis morio</i>			

Mazurovy chalupy (oplocenka 3)

číslo štítku	č. 9	1F	8	53	54	72	16	13	8	8	11	182	196	240	12	7	počet květů 2. ks			
	č. 10	1F + 1S	8	66	71	77	9	11	14	14	11	182	196	240	12	8	počet květů 1. ks			
	č. 12	1F + 3S	10	82	83	65	10	9	6	6	11	182	196	240	12	7	výška lodyhy 2. ks (mm)			
	č. 13	1S	7	71	70	64	8	7	8	8	11	182	196	240	12	7	výška lodyhy 1. ks (mm)			
	č. 16	2F	8	92	82	52	10	9	11	11	11	182	196	240	12	7	šířky listů 2. ks			
	u č. 16 (bez štítku)	6S															šířky listů 2. ks			
	č. 26	1F	11	74	68	49	15	8	11	11	11						šířky listů 2. ks			
	u č. 26 (bez štítku)	1F + 2S															délky listů 2. ks (mm)			
	č. 42	1F	6	75	56	54	10	12	7	7	7						délky listů 2. ks (mm)			
	u č. 42 (bez štítku)	1F + 1 semenáč															délky listů 2. ks (mm)			

Dvořísko (celkem 2 379 jedinců)

počet květů 2. ks					
počet květů 1. ks	20	19	14	12	19
výška lodyhy 2. ks (mm)					
výška lodyhy 1. ks (mm)	288	278	255	247	265
šířky listů 2. ks					
šířky listů 2. ks					
šířky listů 2. ks					
délky listů 2. ks (mm)					
délky listů 2. ks (mm)					
délky listů 2. ks (mm)					
šířky listů 1. ks (mm)	10	10	14	12	15
šířky listů 1. ks (mm)	12	11	15	13	14
šířky listů 1. ks (mm)	13	13	20	15	11
délky listů 1. ks (mm)	75	77	83	84	95
délky listů 1. ks (mm)	89	87	96	70	85
délky listů 1. ks (mm)	87	76	87	84	83
počet listů 2. ks					
počet listů 1. ks	11	10	7	5	11
počet ks <i>Anacamptis morio</i>	1F	1F	1F	1F	1F
číslo štítku	bez štítku	bez štítku	bez štítku	bez štítku	bez štítku

U Vinic

počet květů 2. ks		
počet květů 1. ks	7	
výška lodyhy 2. ks (mm)		
výška lodyhy 1. ks (mm)	140	
šířky listů 2. ks		
šířky listů 2. ks		
šířky listů 2. ks		
délky listů 2. ks (mm)		
délky listů 2. ks (mm)		
délky listů 2. ks (mm)		
šířky listů 1. ks (mm)	8	
šířky listů 1. ks (mm)	12	
šířky listů 1. ks (mm)	10	
délky listů 1. ks (mm)	48	
délky listů 1. ks (mm)	46	
délky listů 1. ks (mm)	48	
počet listů 2. ks		
počet listů 1. ks	6	
počet ks <i>Anacamptis morio</i>	1F + 1S	
číslo štítku	č. 4	

Chvojenec u Smilku

počet květů 2. ks		
počet květů 1. ks	16	
výška lodyhy 2. ks (mm)		
výška lodyhy 1. ks (mm)	205	
šířky listů 2. ks		
šířky listů 2. ks		
šířky listů 2. ks		
délky listů 2. ks (mm)		
délky listů 2. ks (mm)		
délky listů 2. ks (mm)		
šířky listů 1. ks (mm)	19	
šířky listů 1. ks (mm)	19	
šířky listů 1. ks (mm)	13	
délky listů 1. ks (mm)	71	
délky listů 1. ks (mm)	98	
délky listů 1. ks (mm)	83	
počet listů 2. ks		
počet listů 1. ks	7	
počet ks <i>Anacamptis morio</i>	1F	
číslo štítku	č. 11	

Vstavačová louka

číslo štítku	počet ks <i>Anacamptis morio</i>	počet listů 1. ks	počet listů 2. ks	délky listů 1. ks (mm)	délky listů 1. ks (mm)	délky listů 1. ks (mm)	šířky listů 1. ks (mm)	šířky listů 1. ks (mm)	šířky listů 1. ks (mm)	délky listů 2. ks (mm)	délky listů 2. ks (mm)	délky listů 2. ks (mm)	šířky listů 2. ks	šířky listů 2. ks	šířky listů 2. ks	výška lodyhy 1. ks (mm)	výška lodyhy 2. ks (mm)	počet květů 1. ks	počet květů 2. ks
č. 1	2F + 1S	5	5	58	62	61	10	10	12	61	67	66	11	11	9	220	224	7	6
č. 8	1F + 2S	6		70	65	61	10	10	14							236		9	
bez štítku	1F	9		68	61	64	16	14	16							235		14	

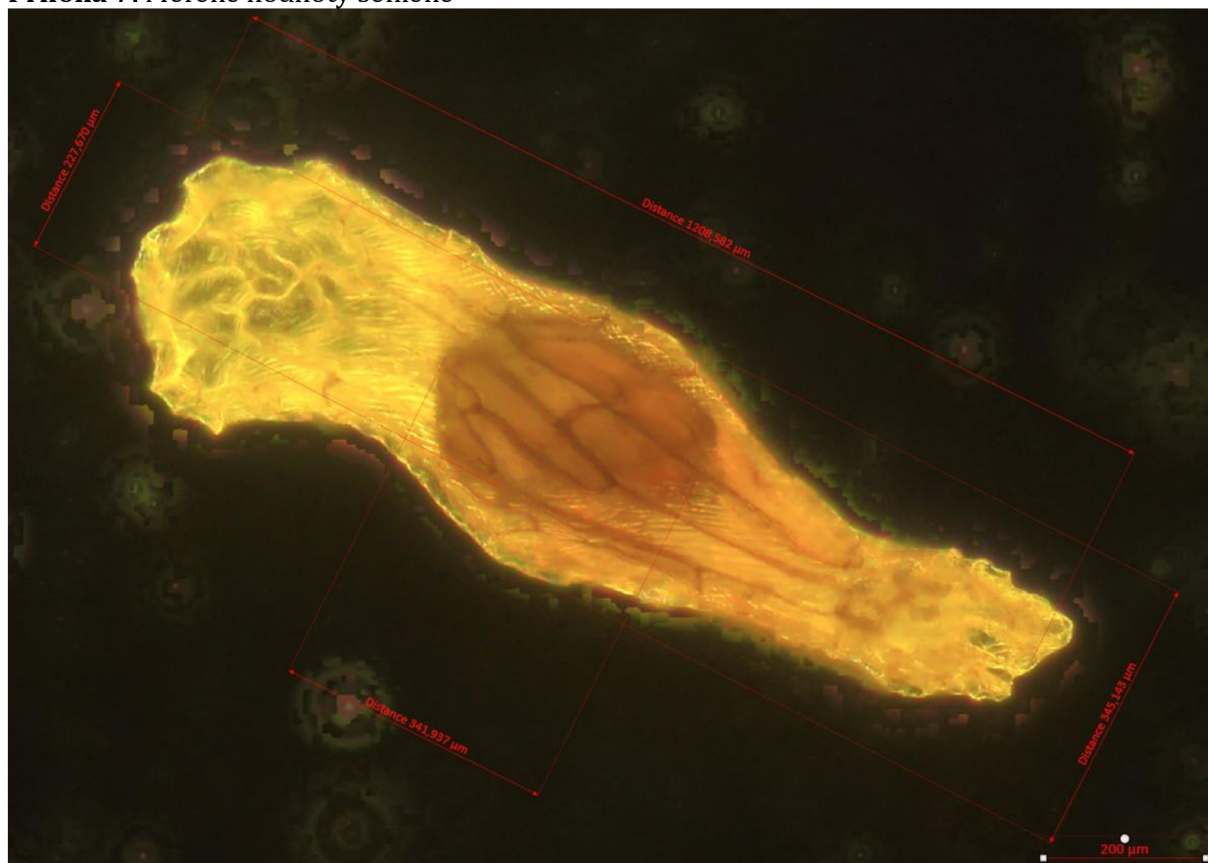
Příloha 5. Srovnání vývojových stupňů semen Mazurových chalup za rok 2020 a 2021

2020	celkem semen	vyvinutá		částečně vyvinutá		nevyvinutá	
			%		%		%
Mazurovy chalupy 1	143	100	69,93	25	17,483	18	12,587
Mazurovy chalupy 2	683	100	14,641	306	44,802	277	40,556
Mazurovy chalupy 3A	162	100	61,728	29	17,901	33	20,37
Mazurovy chalupy 3B	172	100	58,14	45	26,163	27	15,698
Mazurovy chalupy 4	132	100	75,758	17	12,879	15	11,364
Mazurovy chalupy 5	185	100	54,054	25	13,514	60	32,432
Průměr			55,708		22,124		22,168
2021	celkem semen	vyvinutá		částečně vyvinutá		nevyvinutá	
			%		%		%
Mazurovy chalupy 1	167	148	88,62	17	10,18	2	1,1976
Mazurovy chalupy 2	386	145	37,56	154	39,896	87	22,539
Mazurovy chalupy 3	302	188	62,25	92	30,464	22	7,2848
Mazurovy chalupy 4	267	144	86,23	115	68,862	5	2,994
Mazurovy chalupy 5	324	149	45,99	171	52,778	4	1,2346
Mazurovy chalupy 6	262	182	69,47	79	30,153	1	0,3817
Mazurovy chalupy 7	303	213	70,30	85	28,053	5	1,6502
Mazurovy chalupy 8	423	189	44,68	215	50,827	19	4,4917
Mazurovy chalupy 9	282	171	60,64	108	38,298	3	1,0638
Mazurovy chalupy 10	471	181	38,43	209	44,374	81	17,197
Průměr			60,42		39,388		6,0035

Příloha 6. Srovnání vývojových stupňů semen zkoumaných tobolek

	počet vyvinutých	vyvinutá (%)	počet částečně	částečně (%)	počet nevyvinutých	nevyvinutá (%)
Mazurovy ①halupy ①	100	70%	25	17%	18	13%
Mazurovy ①halupy ②	100	15%	306	45%	277	41%
Mazurovy ①halupy ③A	100	62%	29	18%	33	20%
Mazurovy ①halupy ③B	100	58%	45	26%	27	16%
Mazurovy ①halupy ④	100	76%	17	13%	15	11%
Mazurovy ①halupy ⑤	100	54%	25	14%	60	32%
Dvořisko ①	100	20%	163	32%	247	48%
Dvořisko ②	100	24%	127	31%	183	45%
Dvořisko ③	100	41%	73	30%	72	29%
Dvořisko ④	100	31%	108	34%	114	35%
Dvořisko ⑤	100	19%	163	31%	258	50%
Kříženci ①	100	12%	230	27%	509	61%
Kříženci ②A	100	62%	44	27%	17	11%
Kříženci ②B	100	65%	42	27%	13	8%
Kříženci ③	100	67%	37	25%	13	9%
Kříženci ④	100	28%	117	33%	136	39%
Kříženci ⑤	100	84%	13	11%	6	5%

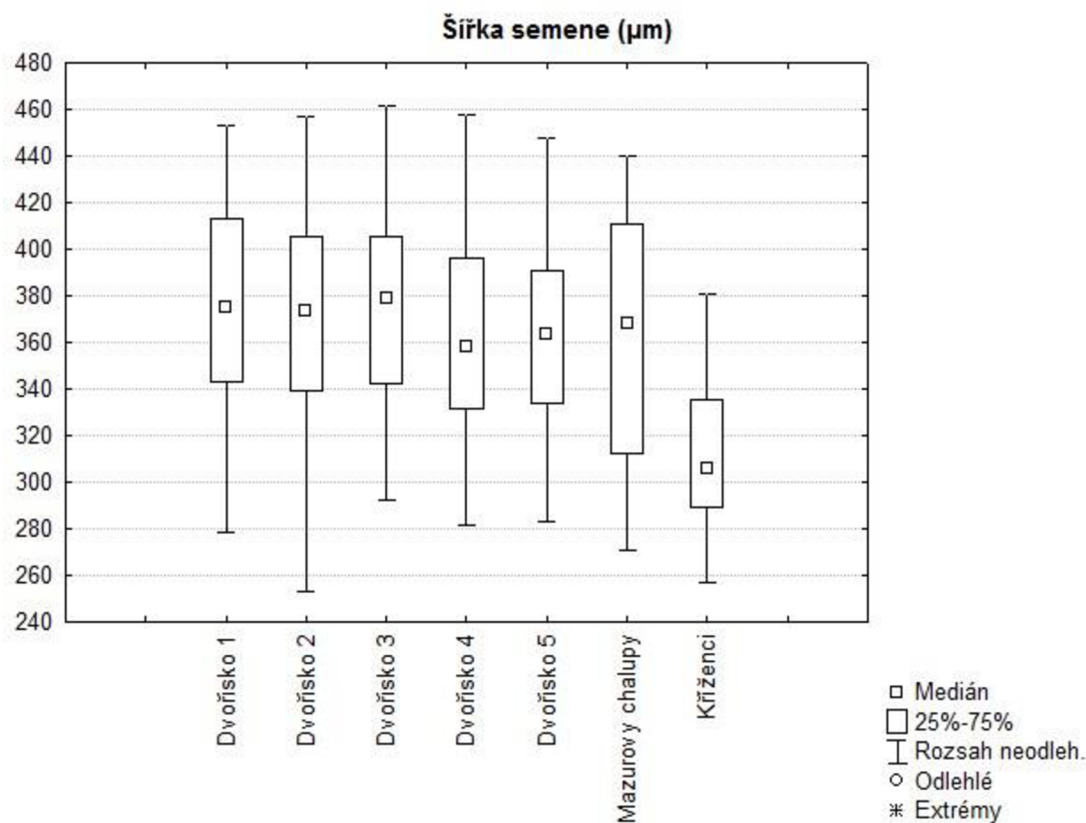
Příloha 7. Měření hodnoty semene



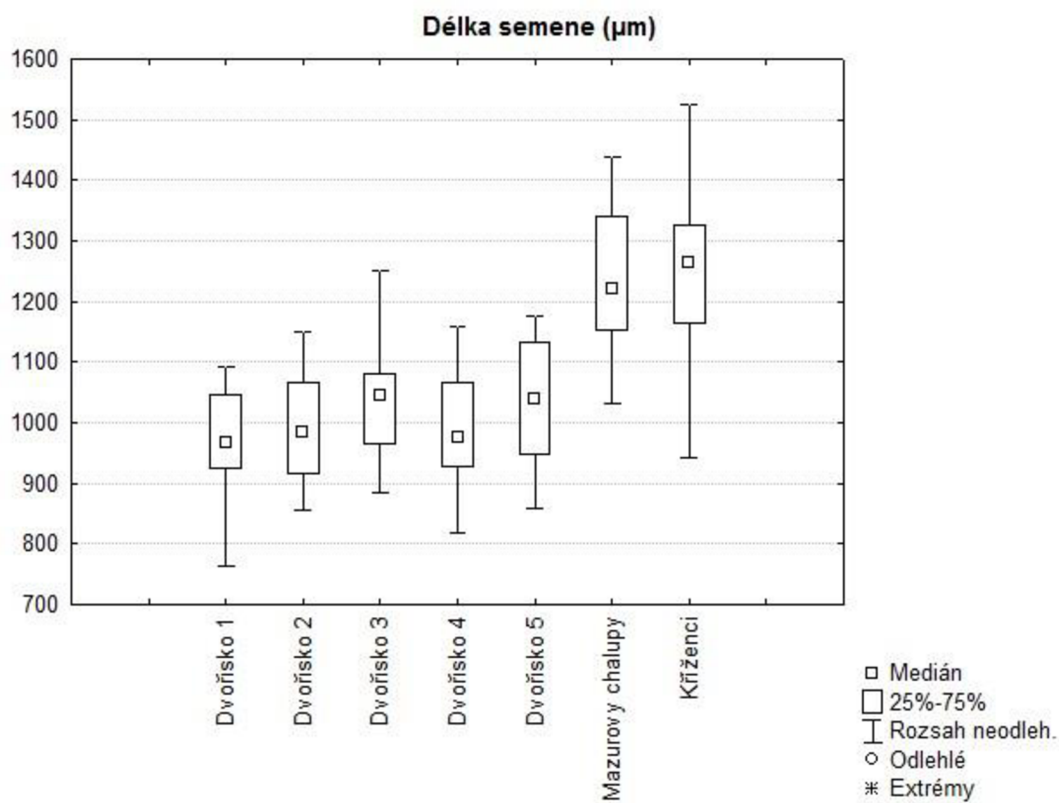
Příloha 8. Měření hodnoty embrya



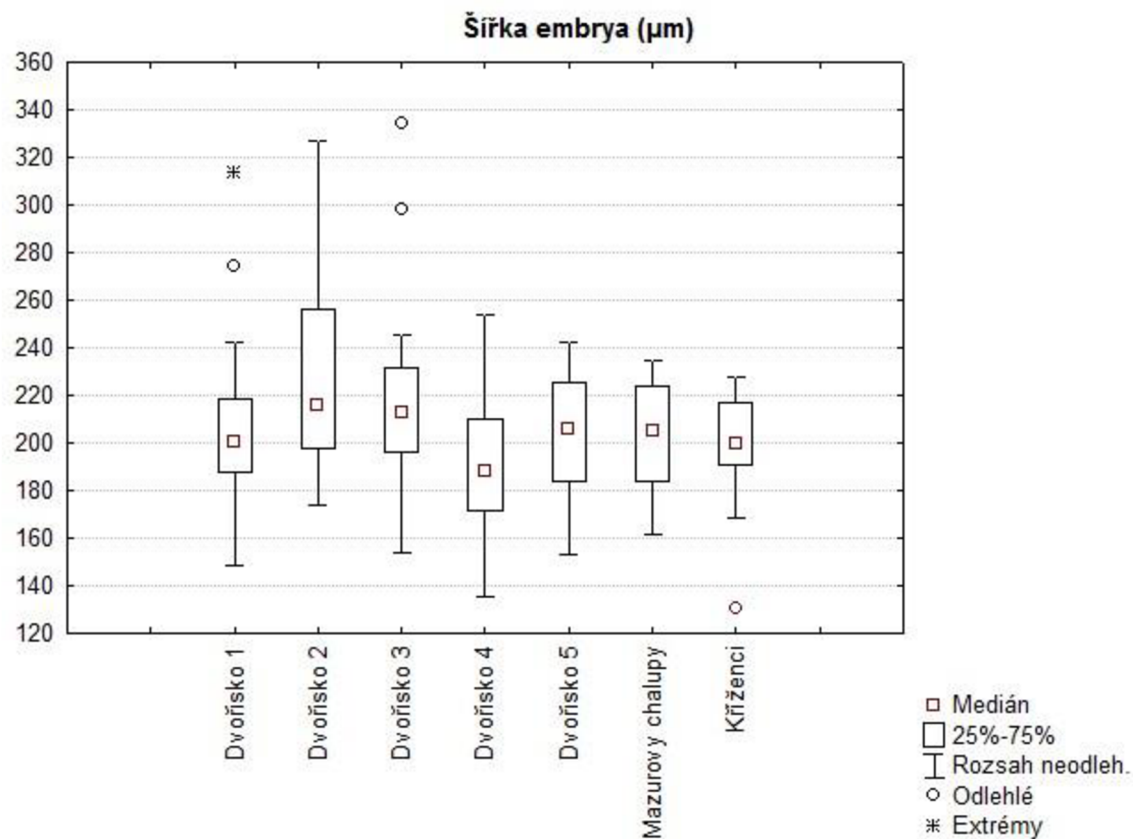
Příloha 9. Šířka semen z lokalit Dvořísko, Mazurovy chalupy a jejich kříženců



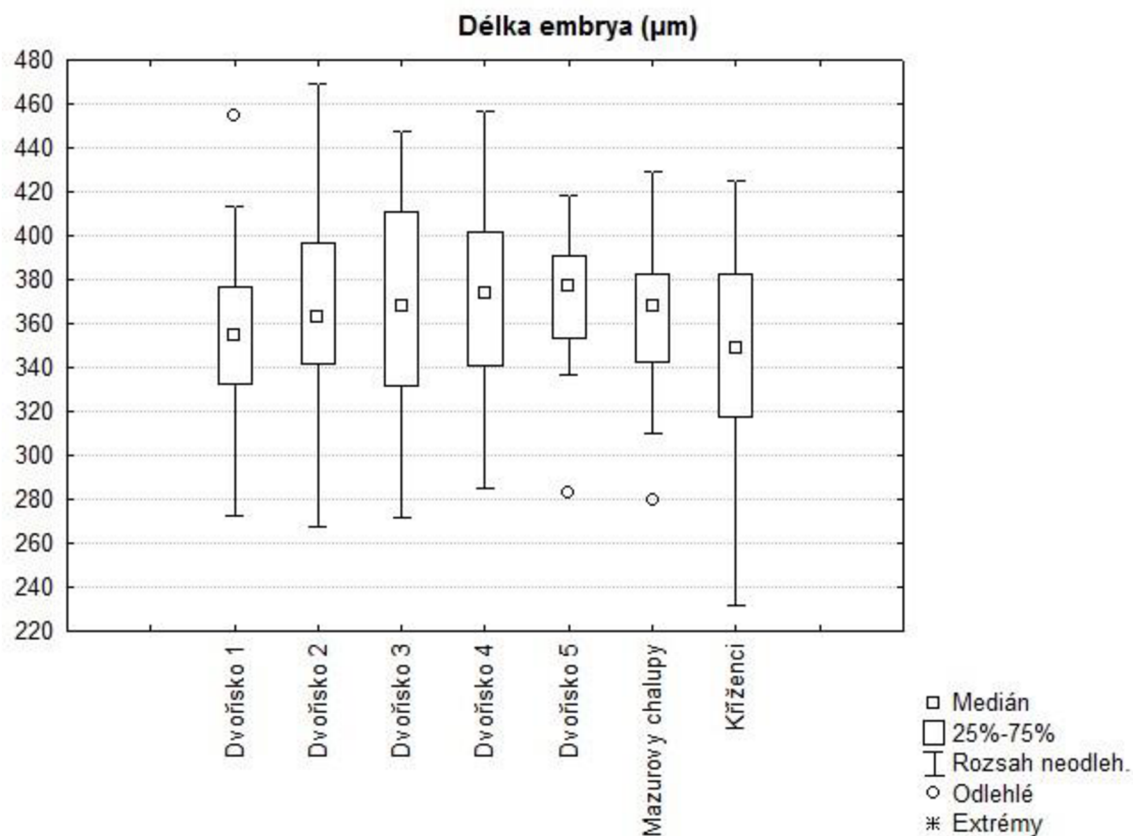
Příloha 10. Délka semen z lokalit Dvořísko, Mazurovy chalupy a jejich kříženců



Příloha 11. Šířka embryí z lokalit Dvořiško, Mazurovy chalupy a jejich kříženců



Příloha 12. Délka embryí z lokalit Dvořiško, Mazurovy chalupy a jejich kříženců



Příloha 13. Vývoj semen v in-vitro kulturách

Mazurovy Chalupy							
	14.5.	28.5.	14.6.	28.6.	12.7.	26.7.	9.8.
mírně nabobtnalé rezavé semeno	0	0	0	3	0	0	0
mírně nabobtnalé bílé semeno	70	60	53	17	7	8	5
hodně nabobtnalé kulovité bílé semeno	6	11	20	46	54	37	38
pučení zárodku	0	0	0	2	6	3	3
Dvořisko							
	14.5.	28.5.	14.6.	28.6.	12.7.	26.7.	9.8.
mírně nabobtnalé rezavé semeno	2	2	1	0	0	0	0
mírně nabobtnalé bílé semeno	40	36	31	27	10	4	4
hodně nabobtnalé kulovité bílé semeno	10	16	23	29	33	36	28
pučení zárodku	0	0	0	0	5	4	7
Kříženci							
	14.5.	28.5.	14.6.	28.6.	12.7.	26.7.	9.8.
mírně nabobtnalé rezavé semeno	39	24	18	16	15	15	15
mírně nabobtnalé bílé semeno	40	43	42	34	26	22	15
hodně nabobtnalé kulovité bílé semeno	2	11	21	27	18	19	13
pučení zárodku	0	0	0	0	4	1	1