

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Význam kryokonzervace semen pro jejich klíčivost na příkladu terestrických a vodních rostlin

Rigorózní práce

Autor: Mgr. Ivona Špringrová
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: RNDr. Romana Prausová, Ph.D.

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí rigorózní práce RNDr. Romaně Prausové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále děkuji Mgr. L. Šafářové, Ph.D. za statistické zpracování výsledků testů klíčivosti.

Anotace

ŠPRINGROVÁ I. *Význam kryokonzervace semen pro jejich klíčivost na příkladu terestrických a vodních rostlin*. Hradec Králové, 2023. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové. Vedoucí rigorózní práce RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 98 s.

Rigorózní práce se zabývá studiem významu zamrazení semen terestrických a vodních rostlin pro uchování schopnosti klíčivosti a snížení nebezpečí kontaminace při jejich kultivaci v laboratorních podmínkách. Současné studie dokládají význam včasného a správného uložení semen nebo plodů cévnatých rostlin pro jejich následné úspěšné klíčení. Významné zpomalení fyziologických procesů v semenech a plodech udržuje vyšší vitalitu a oddaluje ztrátu schopnosti klíčení. Ke kryokonzervaci se používají různé metody zmrazení při teplotách -20 °C, -80 °C nebo v tekutém dusíku při teplotě -180 °C (které se nejčastěji používá při manipulaci s biologickým materiálem v nestabilních teplotních podmínkách).

Rigorózní práce je zaměřena na testování vlivu kryokonzervace u 1 druhu terestrické rostliny – zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) a 2 druhů vodních rostlin – autotrofního rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*) a mixotrofní bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*) na jejich klíčení. U všech těchto druhů jsou již na základě testů klíčivosti známy nejúspěšnější metody přerušování dormance jejich semen a způsoby kultivace. Ty budou použity v kombinaci se dvěma způsoby uložení semen (při teplotě místnosti 21±1°C, kryokonzervací při teplotě -80 °C). Cílem práce je ověřit, zda kryokonzervace zvýší klíčivost semen těchto rostlin a zda bude se stejnou účinností fungovat u terestrických i vodních rostlin (s odlišnou trofí – autotrofie, mixotrofie).

Klíčová slova: *Adenophora liliifolia*, kryokonzervace, *Potamogeton praelongus*, *Utricularia vulgaris*

Annotation

ŠPRINGROVÁ I. *Impact of cryopreservation of seeds on germination of terrestrial and aquatic plants*. Hradec Králové, 2023. Rigorous Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové, Thesis Supervisor RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 98 pp.

This Rigorous thesis studies an impact of freezing of seeds for germination of terrestrial and aquatic plants, mainly for preservation of their ability to germinate and for decreasing a risk of contamination during their cultivation under laboratory conditions. Recent studies show the importance of timely and correct storage of seeds or fruits at vascular plants for their subsequent successful germination. Significant decrease of physiological processes in the seeds and fruits is important for maintaining a higher vitality and delay the loss of germination. There are used various methods for cryopreservation e. g. 1) freezing at -20 °C, -80 °C or 2) liquid nitrogen at -180 °C, which is most often used at manipulation with biological material in unstable thermal conditions. The thesis is focused on a testing the effect of cryopreservation on a germination of three species – one terrestrial species plant – *Adenophora liliifolia* and two aquatic species plants – autotrophic *Potamogeton praelongus* and mixotrophic *Utricularia vulgaris*.

There are known successful germination test methods breaking dormancy of seeds and appropriate methods of cultivation at all these species. They will be used in combination with two ways of storage the seeds (at room temperature 21 ±1°C, cryopreservation at -80 °C). The aim of this thesis is to verify whether the cryopreservation increases the germination of the seeds of these plant species and whether it works on the same principle both terrestrial and aquatic plants (with a different trophic – autotrophy, mixotrophy etc.).

Keywords: *Adenophora liliifolia*, cryopreservation, *Potamogeton praelongus*, *Utricularia vulgaris*

Obsah

Úvod	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 Klíčení semen	10
1.1.1 Fyziologie klíčení	10
1.2 Faktory ovlivňující klíčení	11
1.2.1 Vnější podmínky klíčení.....	11
1.2.2 Vnitřní podmínky klíčení	13
1.3 Dormance.....	14
1.3.1 Morfologická dormance	15
1.3.2 Morfofyziologická dormance.....	16
1.3.3 Fyziologická dormance.....	18
1.3.4 Fyzikální dormance.....	19
1.3.5 Kombinovaná dormance.....	19
1.3.6 Mechanická dormance	19
1.3.7 Chemická dormance	19
1.4. Přerušování dormance.....	20
1.4.1 Působení rostlinných hormonů (fytormonů)	20
1.4.2 Stratifikace	23
1.5 Životaschopnost semen	24
1.5.1 Vitalita semen.....	24
1.5.2 Ukládání semen	25
1.5.3 Kryokonzervace semen	25
1.5.4. Semenné banky.....	27
1.6 Bublinatka obecná (<i>Utricularia vulgaris</i>).....	28
1.6.1 Taxonomické zařazení	28

1.6.2 Morfologie.....	29
1.6.3 Výskyt druhu	30
1.6.4 Ekologie	32
1.6.5 Generativní reprodukce a klíčivost semen	33
1.7 Rdest dlouholistý (<i>Potamogeton praelongus</i>).....	35
1.7.1 Taxonomické zařazení.....	35
1.7.2 Morfologie.....	35
1.7.3 Výskyt druhu	36
1.7.4 Ekologie	38
1.7.5 Generativní reprodukce a klíčivost.....	39
1.8 Zvonovec liliolistý (<i>Adenophora liliifolia</i>)	40
1.8.1 Taxonomické zařazení.....	40
1.8.2 Morfologie.....	40
1.8.3 Výskyt druhu	41
1.8.3.2 Výskyt ve světě.....	41
1.8.4 Ekologie	43
1.8.5 Generativní reprodukce a klíčivost semene	44
2 Praktická část.....	46
2.1 Metodika.....	46
2.1.1 Testy klíčivosti	46
2.1.2 Původ, sběr, uložení semen.....	46
2.1.3 Ošetření semen	47
2.1.4 Postupy při zakládání testů	47
2.1.5 Kontrola klíčivosti semen	52
2.1.6 Vyhodnocení testů.....	52
2.2 Výsledky	53
2.2.1 Bublínatka obecná (<i>Utricularia vulgaris</i>)	53

2.2.2 Rdest dlouholistý (<i>Potamogeton praelongus</i>)	55
2.2.3 Zvonovec liliolistý (<i>Adenophora liliifolia</i>).....	57
3 Diskuze	59
4 Závěr	66
5 Literatura.....	68
6 Seznam příloh	90
6.1 Seznam obrázků.....	90
6.2 Seznam tabulek.....	91

Úvod

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit, zda u semen vybraných terestrických a vodních rostlin dochází ke změně klíčivosti semen, pokud jsou před testy klíčivosti uložena v hlubokomrazicím boxu.

Jednotlivé varianty testů klíčivosti v laboratorních podmínkách byly naplánovány na základě již známých údajů o účinném způsobu přerušení dormance. Pro úspěšné klíčení byla semena vystavena různým faktorům jako je expozice světla, teplota, způsob skladování, ošetření, klíčící roztok imitující přirozené prostředí, ve kterém druh přirozeně klíčí. Ve variantách testů klíčivosti byla použita semena, která byla předtím uložena na sucho při pokojové teplotě $21\pm 1^\circ\text{C}$ nebo skladovaná kryokonzervací při teplotě -80°C .

Kryokonzervace je úspěšná metoda, která umožňuje dlouhodobé skladování semen při nízké teplotě. Při tomto způsobu uložení nedochází k fyziologickým změnám v semenech. Součástí rigorózní práce je také rešerše zdrojů zaměřených na zájmové ohrožené druhy: bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*), rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*), zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*), jejich morfologické znaky, areál rozšíření včetně ČR a jejich ekologické nároky.

1 Teoretická část

1.1 Klíčení semen

Klíčení zahrnuje procesy, které začínají vychytáváním vody suchým semenem a končí prodloužením embryonální osy (Bewley 1997). Klíčení semen je mechanismus, při kterém dochází k různým morfologickým a fyziologickým změnám vedoucím ke klíčení embrya. Semeno má schopnost klíčit za normálních fyzikálních podmínek životního prostředí (Baskin et Baskin 1998, 2004).

1.1.1 Fyziologie klíčení

Klíčení semen závisí především na fyzikálních procesech bobtnání. Semena rostlin začínají klíčit po příjmu potřebného množství vody (Kincl et Krpeš 2000, Campbell et Reece 2008). Příjem vody je třífázový proces s rychlým počátečním vychytáváním (fáze I), následuje plošná fáze (fáze II) a dále fáze zvýšení příjmu vody (fáze III). Osa embrya se prodlužuje, a tím protíná krycí vrstvy semene (Schopfer et Plachý 1984, Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006).

K růstu semene dochází díky vstřebání vody a prolomení obalu (Campbell et Reece 2008). Buněčné vakuoly a buněčné koloidy přijímají vodu pomocí rozpínatelných pletiv. Díky nim přibývají na svém objemu (Kincl et Krpeš 2000). Tento proces je nazýván bubření semen, při kterém vzniká bubřivý tlak a zvětšuje se objem semene (Tůma et Tůmová 1998, Kincl et Krpeš 2000,). Embryo je obklopeno dvěma krycími vrstvami, triploidním endospermem (vyživující živé buňky) a diploidní testou (vrstva semena, převážně mrtvé buňky). U několika druhů rostlin je endosperm zcela zničen během vývoje semen a živiny jsou přemístěny do zásobních děloh (Watkins et Cantlife 1983).

Velmi důležitými spouštěči jsou metabolické změny v embryu, které umožňují pokračování v růstu (Campbell et Reece 2008). Svoji činností štěpí složité zásobní látky (proteiny, škrob, tuky) na jednodušší látky, které jsou především potřebné pro růst pletiv (Kincl et Kolková 1984). Viditelným znakem zdařilého klíčení je penetrace radikuly skrz semenné obaly (Bewley 1997) a vyrašení výhonků na povrch půdy (Fenner et Thompson 2005).

1.2 Faktory ovlivňující klíčení

Klíčení semen závisí na celém souboru podmínek, které jsou pro klíčení zcela nepostradatelné (Kincl et Krpeš 2000). Semena potřebují k vyklíčení specifické vnější podmínky jako je voda, světlo, kyslík, teplota a chemické vlivy (Šebánek 1998, Tůma et Tůmová 1998, Kincl et Krpeš 2000).

Vhodnost semen pro klíčení kromě vnějších podmínek určují také vnitřní podmínky. Nejsou-li splněny vnitřní podmínky, semena neklíčí, popřípadě mohou klíčit velmi pomalu a obtížně, i když vnější podmínky jsou příznivé (Prášková 2013).

1.2.1 Vnější podmínky klíčení

Voda

Životní strategie rostlin závisí na úspěšném klíčení semen v prostředí s dostatkem půdní vody, což je považováno za nejdůležitější vnější faktor (Obroucheva et al. 2017). Semena obsahují obvykle 7–16 % vody. Jestliže podíl vody v semeni klesne pod normu, dochází nejčastěji k úhynu klíčku (Kincl et Krpeš 2000). I když semena obsahují minimum vody, jsou schopná si udržet svoji vitalitu. Semena se vzájemně odlišují těmito specifickými hodnotami vody (Fenner et Thompson 2005). Studie ukazují, že semena konkrétních druhů musí před vyklíčením dosahovat minimálního obsahu vody, např. sójové boby 50 %, cukrová řepa 31 %, kukuřice 30,5 % a rýže 26,5 % (Hunter et Erickson 1952). Voda má u klíčících rostlin významnou roli jako transportní prostředek. Působením vody v semeni dochází k aktivaci metabolismu, přenosu minerálních a organických látek do míst intenzivní biosyntézy (Tůma et Tůmová 1998, Kincl et Krpeš 2000).

Kyslík

Kyslík je další nepostradatelný faktor pro klíčení (Tůma et Tůmová 1998, Procházka 2003). Semena několika vodních druhů potřebují pro své klíčení dostatek kyslíku. Nedostatek kyslíku může rovněž vést k přerušení dormance u semen, která potřebující stratifikaci chladem (Come et al. 1991). Ve vodním prostředí je důležitá koncentrace rozpuštěného kyslíku, která závisí na hloubce, teplotě vody a činnosti organismů (Sculthorpe 1967). Vodní a bažinné druhy mohou vyklíčit bez přítomnosti kyslíku. Plyny pozitivně ovlivňují klíčivost semen, především vyšší

koncentrace oxidu dusného, který pravděpodobně ruší některé druhy dormance (Sarath et al. 2006). Snížené množství kyslíku anebo zvýšené množství oxidu uhličitého inhibuje klíčivost u mnoha druhů rostlin. Čím jsou semena uložena více k povrchu, tím mají větší dosažitelnost potřebného množství kyslíku. Semena a půdní organismy dýchají, tudíž dochází ke spotřebě vzdušného kyslíku. Nedostatek kyslíku je kompenzován zvýšením anaerobního metabolismu, který způsobuje akumulaci toxických látek v okolí semen (Benvenuti et Macchia 1995, Corbineau et Côme 1995).

Teplota

Pro klíčení rozlišujeme kardinální teplotní body, tj. hodnoty minima, optima, maxima (Tůma et Tůmová 1998, Kincl at Krpeš 2000, Procházka 2003). Rostliny v našich podmínkách mívají teplotní minimum 1–10 °C, optimum 25–28 °C a maximum kolem 37 °C. Některé druhy rostlin musí zpočátku promrznout, přičemž dochází k porušení endospermu. Rostlina díky tomu může začít klíčit (Tůma et Tůmová 1998).

Semena některých druhů vyžadují pro klíčení stálou teplotu, jiná semena naopak vyžadují střídání teplot (Atkins et al. 1987). Dormance semen bývá přerušena v zimním období studenou stratifikací, poté mohou semena v období jara začít klíčit v teplotním optimu za přijatelných světlených podmínek (Baskin et Baskin 1998).

Světlo

Semena reagují na přítomnost světla tím, že dokáží regulovat klíčení v přijatelnou dobu (Fenner et Thompson 2005). Světlo není podmínkou pro klíčení, i když některá semena mohou rychleji klíčit na světle než ve tmě. Proto se rostliny člení podle reakcí na světlo (Procházka 2003), a to na druhy reagující záporně (světlo klíčení inhibuje), a reagující kladně (světlo klíčení stimuluje) a fotoblasticky (adaptační význam). Pro klíčení semen je důležité zachycení světla v podobě fytochromu. Mezi hlavní patří fytochrom A, fytochrom B. Fytochrom A reaguje od UV po infračervené záření. Fytochrom B reaguje na infračervené záření (Shinomura 1997). Aktivní forma fytochromů zahájí klíčení, inaktivní forma klíčení inhibuje (Baskin et Baskin 2014).

Chemické a fyzikální vlivy

U některých druhů rostlin byly prováděny pokusy zaměřené na zásahy, které by mohly ovlivnit klíčivost. Pozitivní účinek byl zjištěn, když bylo semeno před zahájením testu klíčivosti ozářeno laserem, radioaktivním zářením (Procházka 2003). U druhu *Potamogeton praelongus* bylo k ošetření semen použito UVA záření (Prausová et al. 2013). Toto záření má více energie než viditelné světlo, ale je méně energetické než UVB záření. Test působení UVA na semena tohoto druhu po dobu 30 minut ukázal, že nažky mohou přežít v terestrických podmínkách, kde vyschnou a jsou vystaveny UVA záření. To může aktivovat jejich klíčení, které nastane po zvýšení vlhkosti (Prausová et al. 2013).

Pozitivní účinek na klíčení semen má i etylen. V laboratorních testech klíčivosti se využívá synteticky vyráběný regulátor růstu Ethephon (2 - chlorethylfosfonová kyselina) (Durrant et Masch 1991). Ve vodném prostředí je Ethephon rozložen na etylen, fosfát a chloridové ionty (Roberts 1998). Účinek etylenu na přerušení dormance a aktivování klíčení semen je znám např. u druhu *Amaranthus retroflexus*, stejně jako pozitivní účinek kyseliny giberelové (Kępczyński et Sznigir 2012). Dormantní semena mohou být uvolněna z dormance též studenou stratifikací, dále dozríváním v suchých podmínkách nebo působením dalších chemických látek (Bewley et Black 1994). Uvolňování z dormance zahrnuje změny koncentrací kyseliny abscisové (ABA), giberelinů (GA) a etylenu, a změny citlivosti na tyto hormony (Kępczyński et a Kępczyńska 1997, Matilla 2000, Hilhorst 2007).

1.2.2 Vnitřní podmínky klíčení

Vnitřní podmínky klíčení jsou určeny chemickým složením, propustností obalů, hydratační schopností a její velikostí (Copeland et McDonald 2001). Živá semena rostlin, která mají vyhovující podmínky pro klíčení, nemusí obvykle vyklíčit. Důvodem nevyklíčení může být nepropustnost osemení pro vodu, výskyt palisádového sklerenchymu v osemení, který brání průniku vody testou, dále též nedostatečná permeabilita pro O₂ a CO₂, kdy ve vnější vrstvě semene (endosperm, nucelus, testa) neprobíhá dostatečná výměna plynů (Procházka 2003).

1.3 Dormance

Dormance semen představuje určité brzdící mechanismy klíčení přítomné v embryu nebo semenných obalech (Hess 1983). Za dormanci semen označujeme stav, kdy zralé zdravé semeno zůstává v klidu, i když jsou přijatelné podmínky pro jeho klíčení a růst (Vleeshouwers et al. 1995, Baskin et Baskin 2004). Dormantní stav semene také souvisí s vyšším obsahem kyseliny abscisové (ABA), což je látka inhibičního charakteru (Bewley 1997, Tůma et Tůmová 1998).

U semen můžeme rozlišit dva typy dormancí jako je primární a sekundární dormance. Primární dormance (vrozená) probíhá u semen, která nevyklíčí okamžitě po dozrání na mateřské rostlině. Tato dormance je řízena inhibičními vlivy ABA při zrání semen na mateřské rostlině (Finch-Savage et Leubner-Metzger 2006). Sekundární (vyvolaná) dormance vzniká reakcí na nepříznivé životní podmínky. Semena s touto dormancí mohou přečkávat v klidu krátkodobě, do období zlepšení podmínek nebo dlouhodobě po několik sezón (Harper 1977, Fenner 1985).

Dormance je adaptace rostlin na přežití v měnících se podmínkách (Harper 1977). K dormanci semene mohou být různé příčiny, například krátká doba slunečního záření, pokles teploty (Campoy et al. 2011). Aby došlo k přerušení dormance, musí přijít podnět z prostředí. Mezi tyto podněty řadíme především teplotu, působení dusičnanů, světla a dokonce i složek kouře (Bewley et al. 2013).

Nejnovější vysvětlení dormance předložili Baskin et Baskin (2004), Finch-Savage et Leubner-Metzger (2006), kteří dormanci semen definují jako potřebné podmínky, tedy faktory prostředí důležité pro klíčení semen, které by uvolnily semeno z dormance. Dá se říci, že dormance podle všeho souvisí s klimatickými změnami, které probíhají během historie Země (Bewley et al. 2013). Proto se blokování klíčení vyvinulo u různých druhů včetně jejich adaptací na prostředí umožňujících klíčení za vhodných podmínek (Hilhorst 1995, Vleeshouwers et al. 1995, Bewley 1997, Baskin et Baskin 2004, Fenner et Thompson 2005).

Semena jsou schopna přetrvat v dormanci rok i více let. Některá dormantní semena mohou být vitální a schopná klíčit od několika dnů po desetiletí, dokonce i déle. Tento fakt záleží na druhu a přírodních podmínkách (Campbeel et Reece 2008). Proto je mnoho bloků klíčení, které vznikly jako adaptace na různá přírodní

stanoviště a klima, ve kterých působí (Bewley et al. 2013). Dormance může některým druhům zaručit přežití přírodních katastrof (Finkelstein 2008). V půdě se hromadí velké zásoby nevyklíčených semen, která se mohou nakupit během několika let. Proto se ve vegetaci okamžitě objeví po suchu, záplavách a požáru, případně dalším narušením (Campbeel et Reece 2008).

Dormance semen úzce souvisí s jejich anatomí (Atwater et Vivrette 1987). Nikolaeva (2004) vytvořila klasifikační systém dormance, který je určován morfologickými a fyziologickými vlastnostmi semen. Baskin et Baskin (1998, 2004) na základě vytvořeného systému navrhli komplexnější klasifikační systém, který zahrnuje několik tříd dormancí: fyziologickou, morfologickou, morfofyziologickou, fyzikální a kombinovanou, chemickou a mechanickou.

Z toho se některé třídy dormance dále dělí na nižší úrovně (Baskin et Baskin 1998, 2004). Výše uvedený klasifikační systém dormance ukazuje na velkou rozmanitost morfologických a fyziologických vlastností v reakci na různá prostředí (Vleeshouwers et al. 1995, Baskin et Baskin 2004, Donohue 2005).

Morfologické rozdíly ve zralých semenech jsou dány velikostním poměrem embrya k semenu a relativním množstvím endospermu, který během vývoje semene zaniká. Dále je významné zapojení živin do radikuly (Martin 1946, Baskin et Baskin, 1998, 2004, Forbis et al. 2002). Martin (1946) na základě vnitřní morfologie zralých semen definoval typy zralých semen s odlišným poměrem embrya k endospermu.

1.3.1 Morfologická dormance

U mnoha druhů rostlin s morfologickou dormancí rozlišujeme diferencované embryo, radikulu s děložními lístky. V semeni se nachází embryo, které není dostatečně vyvinuté. Aby došlo k vyklíčení, je zapotřebí, aby embryo dostatečně vyrostlo. Jiné druhy semen s morfologickou dormancí mají nediferencované embryo, což je masové rozptýlení buněk. U tohoto typu semen nedochází ke klíčení, dokud se diferenciací a růst úplně nedokončí. Zralému semeni je zabráněno vyklíčit kvůli morfologické charakteristice embrya (Baskin et Baskin 1998).

Embrya semen s morfologickou dormancí nepotřebují specifické podmínky ani ošetření, aby došlo k přerušování dormance a vyklíčení. Dormance je tedy doba mezi inkubací čerstvého semene a vznikem radikuly (Baskin et Baskin 2004).

Morfologická dormance se vyskytuje především u semen s lineárním a rudimentálním embryem (Baskin et Baskin 1998).

Semena některých tropických druhů s morfologickou dormancí vyklíčí za vhodných podmínek za 1–3 měsíce (Hayat 1963). Při přijatelných podmínkách začne zralé semeno růst v době několika dnů až týdnů. Následně semena vyklíčí v průběhu 30 dní (Baskin et Baskin 2004).

1.3.2 Morfofyziologická dormance

Čerstvě vyzrálá semena mající morfologickou dormanci, jsou schopná si současně vyvinout fyziologickou dormanci. Tato dormance je tedy kombinací morfologické a fyziologické dormance (Baskin et Baskin 1998). Semena s morfofyziologickou dormancí mají nedostatečně vyvinutá embrya. Semena v tomto typu dormance vyžadují ošetření, aby došlo k přerušení dormance. Příkladem ošetření semen může být kombinace teplé anebo studené stratifikace, která může být nahrazena aplikací kyseliny gibberelové (Baskin et Baskin 2004).

Morfofyziologická dormance se objevuje u semen, která mají primitivní nebo lineární embrya. Některé čeledi rostlin mají nedostatečně vyvinutá embrya, proto nelze přesněji určit, zdali se jedná o morfologickou nebo fyziologickou dormanci. Přerušení dormance embrya se odvíjí od specifických podmínek prostředí, které souvisí s druhem rostliny (Baskin et Baskin 1998). V závislosti na druhu dochází k přerušení dormance stratifikací při teplotě 15 °C (Baskin 1990b) nebo chladovou stratifikací při teplotě 0–10 °C (Baskin et Baskin 1984), příp. teplou stratifikací (Nikolaeva 1977). Morfofyziologická dormance (MFD) byla rozčleněna na několik typů (Baskin et Baskin 1998, 2004).

- **Nehluboká jednoduchá dormance**

Tento typ MFD byl poprvé popsán u čeledi *Apiaceae* (Baskin et Baskin 1990a). Dozrávající semena pozdního jara klíčí následující podzim, pokud je přerušena fyziologická a morfologická dormance. Při nízkých teplotách (5,15/6 a 20/10 °C) nedochází k přerušení dormance, naopak je tomu při vyšších teplotách v létě, kdy je dormance přerušena při teplotě 25/15, 30/15 a 35/20 °C. Morfologická dormance nemůže být přerušena dříve než fyziologická dormance, proto embryo nezačíná růst dříve než v době podzimu. Semena pro své klíčení potřebují přijatelnou teplotu,

např. 25/15 °C, vlhký substrát a dobré světelné podmínky. Pokud semena vstoupí do nehluboké fyziologické dormance, nedochází ke klíčení semen ve vhodných podmínkách. Z fyziologické dormance semeno zpravidla vystoupí další léto. Morfologická dormance většinou bývá ukončena na podzim, kdy jsou omezené světelné, vodní a teplotní podmínky (Baskin et Baskin 1990a).

- **Středně jednoduchá**

Semena střední jednoduché MFD potřebují v době léta teplou stratifikaci, aby se přerušily obě dormance. Po přerušení fyziologické dormance dochází k růstu embryí na podzim při teplotách 15–20 °C. Semena, která mají prodloužená embrya, vyžadují studenou stratifikaci začátkem léta. Čerstvě zralá semena, nacházející se v půdě za přirozených sezónních teplotních změn, vyklíčí následující března duben (Baskin et Baskin 1998).

- **Hluboká jednoduchá**

Semena s hlubokou jednoduchou MFD vyžadují zahřátí a následnou studenou stratifikaci předtím, než začne semeno klíčit, protože hluboká jednoduchá MFD obsahuje jednu morfologickou a dva typy fyziologické dormance (Baskin et Baskin 1998). Nikolaeva (1977) zdůraznila, že druhá část tepelné stratifikace by měla mít nižší teplotu než první část. Aby došlo ke zrušení morfologické dormance, musí být přerušeny oba typy fyziologické dormance. Teplotní požadavky na přerušení prvního typu fyziologické dormance jsou splněny v létě (stratifikace teplem při relativně vysoké teplotě). Na podzim (stratifikace teplem při relativně nízkých teplotách) a v zimě (studená stratifikace) se přeruší druhý typ fyziologické dormance, což umožňuje semeni začít klíčit v době jara.

- **Nehluboká komplexní**

Pro tuto dormanci je potřeba studená stratifikace. Aby byla stratifikace účinná, musí nejprve proběhnout stratifikace teplem (Baskin et Baskin 1998). Při působení stratifikace chladem na semena s nehlubokou fyziologickou dormancí může docházet k uvolnění zásobních látek v endospermu, které se stanou přístupnými pro rostoucí embryo (Stokes 1952b).

- **Středně komplexní**

Semena při této dormanci potřebují studenou stratifikaci v době podzimu a zimy, aby byla přerušena morfoloická a fyziologická dormance. Při působení nízkých teplot dochází v semenech k růstu embrya (Baskin et Baskin 1998).

- **Hluboká komplexní**

Semena s hlubokým komplexem MFD vyžadují v době zimy chladovou stratifikaci, aby došlo k přerušení fyziologické a morfoloické dormance. Semena začínají klíčit na začátku jara (Baskin et Baskin 1998). Nízké teploty jsou potřebné pro uvolňování zásobních rezerv endospermu, které používá rostoucí embryo (Stokes 1952a). Při nízké teplotě (2 °C) dochází k rozkladu bílkovin na rozpustné dusíkaté sloučeniny (Stokes 1953) a tvorbě aminokyselin glycinu a argininu, které jsou důležité pro růst embrya.

1.3.3 Fyziologická dormance

Tato dormance je způsobena fyziologickými inhibičními mechanismy embrya, které chrání před vznikem radikuly. Mnoho semen s touto dormancí nepropouští vodu (Baskin et Baskin 1998). Fyziologickou dormanci můžeme rozdělit do tří úrovní: nehluboká, středně hluboká a hluboká (Nikolaeva 1977, Baskin et Baskin 2004).

- **Nehluboká fyziologická dormance**

Nehluboká fyziologická dormance je z těchto tří typů nejčastější (Baskin et Baskin 2004). Tato dormance v semenném plášti vyvolává nepropustnost pro kyslík (Nikolaeva 1969). Je prokázáno, že kyselina giberelová a skarifikace podporují klíčení u semen s tímto typem dormance (Baskin et Baskin 2004).

- **Středně hluboká fyziologická dormance**

U středně fyziologické dormance jsou semena přerušena stratifikací chladem (Nikolaeva 1969). Aby došlo k přerušení dormance, vyžadují 3–4 měsíční stratifikaci chladem. Kromě toho závisí na druhu rostliny a době působení stratifikace (Baskin et Baskin 1998, 2004).

- **Hluboká fyziologická dormance**

Při hluboké fyziologické dormanci musí být semena v chladu, aby došlo k přerušení jejich dormance (Baskin et Baskin 1998). Po aplikaci kyseliny gibberelové nedochází k přerušení dormance (Nikolaeva 1977).

1.3.4 Fyzikální dormance

Fyzikální dormance je způsobena jednou nebo více vrstvami palisádových buněk v semeni nebo obalu, které jsou nepropustné pro vodu (Baskin et al. 2000). K přerušení fyzikální dormance musí být provedena mechanická nebo chemická skarifikace (Baskin et Baskin 1998, Fing-Savage et Leubner-Metzger 2006). Podmínkou klíčení semen u fyzikální dormance je otevření semene nebo narušení palisádového parenchymu nebo jiné nepropustné vrstvy, což by umožnilo průchodnost vody do semene (Baskin et Baskin 1998).

1.3.5 Kombinovaná dormance

Přítomnost fyzikální a fyziologické dormance u semene je označována jako kombinovaná dormance (Nikolaeva 1969). Pro zahájení klíčení semene musí být přerušeny obě dormance (Barton 1934). Při této dormanci mají semena nepropustný plášť pro vodu v kombinaci s dormantním embryem (Baskin et Baskin 1998, 2004).

1.3.6 Mechanická dormance

Mechanická dormance je způsobena výskytem tvrdé dřevnaté plodové stěny (Nikolaeva 1969). Endokarp u některých čeledí rostlin může být nepropustný pro vodu, což znamená, že se jedná o kombinaci s fyzikální dormancí. Jiné čeledi rostlin mají endokarp propustný pro vodu, ale klíčení nenastane, dokud nedojde k jeho odstranění (Baskin et Baskin 1998).

1.3.7 Chemická dormance

Chemická dormance semen může být přerušena odstraněním perikarpů nebo vyluhováním inhibitorů klíčení (Nikolaeva 1969, 1977). Studie ukazují, že se nemusí jednat o skutečnou chemickou dormanci, protože účinky inhibitorů byly testovány na semenech za účelem přerušení fyziologické dormance (Baskin et Baskin 1998).

1.4. Přerušení dormance

1.4.1 Působení rostlinných hormonů (fytohormonů)

Fytohormon je organická sloučenina, která je po syntéze v jedné části rostliny transportována do jiné části (Gloser 1995, Campbeel et Reece 2008). Rostlinné hormony můžeme označit jako přirozené regulátory (Psota et Šebánek 1999), chemické sloučeniny působící ve velmi malém stopovém množství ($<1\text{mmol.l}^{-1}$ nebo $\leq 1\mu\text{mol.l}^{-1}$). Látky, které podporují růst, jsou označovány jako stimulatory, naopak látky s opačným účinkem jsou označovány jako inhibitory (Tůma et Tůmová 1998). Působením fytohormonů dochází k biochemické, fyziologické a morfologické reakci, která působí v místě vzniku nebo je transportována vodivými svazky nebo difúzí do jiného místa (Psota et Šebánek 1999).

Rostliny používají širokou škálu fytohormonů, jako jsou například auxiny, kyselina abscisová, cytokininy, etylen a gibereliny, které působí v malém množství (Teale et al. 2006). Fytohormony hrají důležitou roli ve fyziologii rostlin, např. u klíčivosti semen, tvorby kořenů, květů atd. (MacDonald 1997, Woodward et Bartel 2005). V současné době můžeme považovat za pět nejdůležitější fytohormonů: auxiny, gibereliny, cytokininy, kyselinu abscisovou (ABA) a plynný etylen (Gloser 1995, Hopkins 1995). Další fytohormony v menších zastoupeních jsou brassinosteroidy, kyselina jasmonová a fenolické látky (Gloser 1995).

Auxiny

Auxiny jsou skupinou přirozeně se vyskytujících fytohormonů, které mají v rostlině mnoho funkcí a podílí se na vývoji a růstu (Tivendale et Cohen 2015). Mezi nejznámější auxiny patří IAA (indol-3-oxalová kyselina), která představuje nejvíce bohatý nativní auxin (Hopkins 1995, Fallon et al. 2012). Auxiny ovlivňují kromě růstu a vývoje rostlin také fotoperiodismus, gravitropismus a vývoj reprodukčních orgánů. Významně se podílí na apikální dominanci, tedy vzniku a tvorbě adventivních a postranních kořenů (Aloni et al. 2005, Pagnussat et al. 2009).

Kromě rostlin produkují své metabolity také půdní mikroorganismy, bakterie, houby a řasy (Sarwar et Kremer 1995). Bakterie na rhizodermis stimulují proliferaci postranních kořenů, které zvyšují povrch pohlcující živiny a výsledkem je lepší asimilace vody a živin z půdy. Mohou zlepšit růst rostlin tím, že zvyšují klíčivost,

chrání rostliny před škůdci a chorobami přenášenými půdou (Thomashow et Weller 1996, Berg et al. 2005).

Cytokininy

Cytokininy jsou N⁶ substituované deriváty adeninu s dusíkovou purinovouází. Nejrozšířenějším přirozeným cytokininem ve vyšších rostlinách je zeatin (Hopkins 1995). Tento fytohormon je spojen s mnoha aspekty růstu a vývoje rostlin, včetně klíčivosti semen, funkcí meristému, apikální dominance a senescence listů (Mok et Mok 2001).

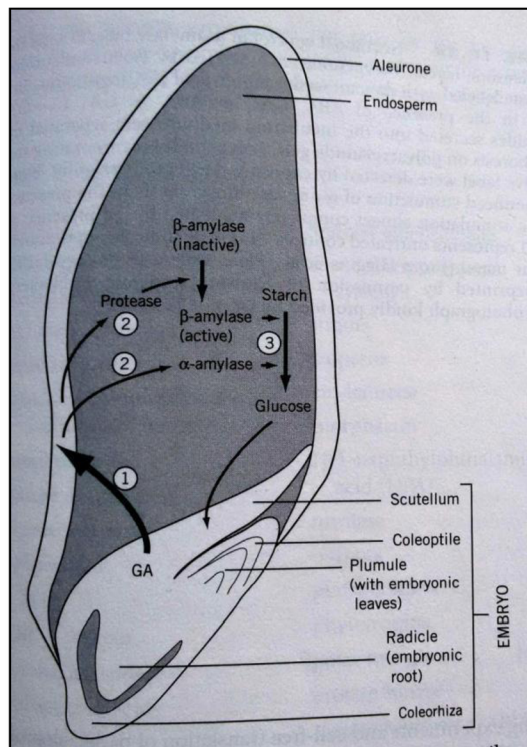
Gibereliny

Gibereliny jsou skupinou rostlinných hormonů, které se můžou definovat více podle chemické struktury než jejich biologické aktivity (Hopkins 1995). První gen giberelinové dráhy byl izolován z rýžového patogenu *Gibberella fujikuroi*. Tato houba se komerčně používá pro výrobu kyseliny giberelové a příbuzných giberelinů (Tudzynski 1999). Za první izolovaný a popsáný hormon je považován GA₃, který je znám jako GA (*Gibberellic Acid*), protože je snadno extrahován z houbových kultur. Gibereliny jsou nejvíce dostupné, v důsledku toho se nejčastěji zkoumají (Hopkins 1995).

Gibereliny (GA) jsou nezbytnými regulátory mnoha aspektů vývoje rostlin, včetně klíčivosti semen, prodloužení stonku a kvetení. Jsou důležité pro růst a vývoj rostlin, proto se stále častěji využívají v zemědělství a zahradnictví (Gadea 2003). Gibereliny se světlem a dalšími hormony (ABA a etylen) regulují klíčení, které souvisí s dormancí semen (Leubner-Metzger 2001). Exogenní aplikace giberelinů působí pozitivně na klíčení semen a mobilizaci rezerv endospermu během růstu embryí, podílí se na kvetení (Hopkins 1995).

Rozklad rezervních sacharidů a proteinů v endospermu umožňuje růst embrya. V endospermu při klíčení dochází k aktivitě hydrolytických enzymů (amylázy, proteázy a cytázy), které svojí činností uvolní cukry a aminokyseliny ze zásob endospermu (Paleg 1961). Kyselina giberelová (GA) je schopna aktivovat enzymy hydrolyzující škrob, včetně α -amylázy (Paleg 1960a), uvolňuje redukující cukry – dochází k mobilizaci rezervy škrobu (Paleg 1960b). Kromě α -amylázy se mobilizují

rezervy endospermu účinkem proteolytických enzymů (proteázy), β -amylázy a dalších enzymů degradujících škrob. Proces při klíčení semene můžeme rozdělit do tří fází (Obr. 1). V první fázi se gibereliny pohybují od embrya k aleuronu, kde stimulují syntézu enzymů α -amylázy a proteázy. V druhé fázi se proteáza přemění na neaktivní β -amylázu a aktivní α -amylázu. Ve třetí fázi společně α , β amylázy štěpí škrob na glukózu, a tím dochází k růstu embrya (Hopkins 1995).



Obr. 1 Schéma klíčení na semeni ječmene (*Hordeum vulgare*), (převzato z: HOPKINS 1995)

Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je sloučenina, která se primárně podílí na regulaci klíčivosti semen, syntézy skladovacích proteinů a modulaci vodního stresu. Poměrně velké množství ABA se rychle syntetizuje v listech v reakci na vodní stres, kde významně působí při regulaci otevírání a uzavírání stomat (Hopkins 1995). Rostlinný hormon kyselina abscisová (ABA) má důležitou roli při zrání a dormanci semen za nepříznivých podmínek (Yan et Chen 2017).

Důležitým faktorem při klíčení semen je bilance ABA a GA (Seo et al. 2006, Yan et Chen 2017). Působením ABA dochází k celkové inhibici syntézy proteinů a enzymů

(například hydroláz), které se podílejí na nastartování dormance. Proto je důležitý poměr obsahu ABA k obsahu GA v semenech. Obsah hormonů rozhoduje o tom, jestli jsou semena klíčivá nebo dormantní (Gloser 1995). Po uplynutí doby se semeno stává citlivým na změnu okolních podmínek, jako je například světlo, chladová teplota, která může přerušit dormanci semena tím, že sepotlačí nebo změní činnost ABA, a to vede k nástupu klíčení semen (Yan et Chen 2017). Uvolnění z dormance je doprovázeno sníženou hladinou ABA a naopak zvýšenou hladinou GA, což přispívá ke snížení syntézy ABA a zvýšení katabolismu ABA (Sasaki et al. 2015).

Etylen

Je to plynný fytohormon chemické struktury $H_2C = CH_2$. Etylen působí inhibičními účinky na prodlužování buněk. Kromě zmíněných účinků také působí stimulačně na dozrávání plodů a klíčení semen, urychluje stárnutí a opad listů (Gloser 1995, Tůma et Tůmová 1998, Psota et Šebánek 1999).

Etylen se běžně používá k dozrávání například banánů a jiného ovoce, které jsou během přepravy zelené (Hopkins 1995). Zvýšení tvorby etylenu v rostlině je reakcí na působení stresoru. Zvýšenou tvorbu mohou vyvolat teplotní výkyvy, poranění nebo napadení patogeny atd. (Procházka 2003).

1.4.2 Stratifikace

Podstata stratifikace je vystavení semen nízkým a následně vysokým teplotám, nebo nejprve vysokým a poté nízkým teplotám. Tímto způsobem u některých druhů rostlin dochází při několikátýdenním působení nízkých teplot ke klíčení semen (Tůma et Tůmová 1998). U mnoha druhů rostlin dochází k přerušení dormance stratifikací při nízkých teplotách, ale málo druhů získává možnost klíčit při nízkých teplotách pod $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Schütz 2000). Semena rozšiřovaná na podzim potřebují studenou stratifikaci. Semena šířená na jaře potřebují teplou stratifikaci. Účinné teploty studené stratifikace jsou $0\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$, s tím že $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ je optimální pro většinu druhů. Účinné teploty teplé stratifikace jsou $20\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$ s optimem $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, tímto jsou simulované letní teploty (Baskin et Baskin 1998). Některé mrazuvzdorné rostliny jsou tímto způsobem chráněny proti vyklíčení v době podzimu (Tůma et Tůmová 1998). Při studené stratifikaci dochází k odbourávání kyseliny abscisové (ABA), tím

pádem dochází k navýšení hladiny giberelinů. Působením teplé nebo studené stratifikace může u mnoha rostlin dojít k přerušení dormance semen (Baskin et Baskin 1998).

1.5 Životaschopnost semen

1.5.1 Vitalita semen

Vitalitu a životaschopnost (klíčivost) semen můžeme popsat jako přirozenou vnitřní sílu u zdravých semen. Tato schopnost se projevuje okamžitým vyklíčením semen, to znamená, že semena po zasetí rychle vyklíčí za různých podmínek (Hosnedl et al. 2002).

Na prověření klíčivosti semen se provádí zkouška klíčivosti. Realizuje se za optimálních podmínek prostředí pro klíčení semen, které jsou specifické pro různé druhy. Semena jsou schopná si udržet svoji schopnost klíčení v rozmezí 3–15 let, ale jsou i případy taxonů, jejichž semena klíčí po více letech (Tůma et Tůmová 1998, Kincl et Krpeš 2000).

Stárnutí semen vede ke snížení jejich vitality, což vede ke ztrátě jejich životaschopnosti (McDonald 1999). Ztráta životnosti je spojená s degradací DNA (Procházka 2003). Procesem stárnutí dochází v semeni ke ztrátě aktivních enzymů, které se podílejí na přestavbě bílkovin, dochází k postupnému nahromadění škodlivých produktů látkového metabolismu, vyčerpání živných zásobních látek. Kromě těchto zmíněných procesů dochází ke strukturální změně v protoplastech, degradaci buněčných jader a porušení funkce osemení. Uchování klíčivosti je druhově specifické (Tůma et Tůmová 1998, Kincl et Krpeš 2000).

Podle ČSN 460610 je zkouška životnosti semen prováděna biochemickou cestou (Kroc 1961). Pro živá (klíčivá semena) se používá biochemická metoda, která spočívá v zabarvení pletiv zárodků nebo endospermu (Kincl et Krpeš 2000). Životaschopnost semen se může dokázat difúzí barviv do odumřelých pletiv nebo použitím 1% roztoku tetrazolia chloridu. Podstata testu spočívá v zabarvení bezbarvého roztoku na karmínově červený formazan, kde se živé pletivo zabarví červeně a mrtvé buňky zůstanou neobarvené (Kroc 1961). Po dobu 24 hodin semena nasávají vodou na filtračním papíře. Za pomoci skalpelu se semeno rozřízne podélným řezem na dvě půlky, ty se vystaví působení v 0,1% roztoku tetrazolia

chloridu opět po dobu 24 hodin při pokojové teplotě (Giménez-Benavides et al. 2005). Následně jsou pozorovány barevné změny.

1.5.2 Ukládání semen

Za optimální podmínku skladování semen je považovaný snížený obsah vody, což souvisí se snížením teploty. Vysoká teplota a vlhkost během skladování mohou na semeno působit negativně. Může docházet ke ztrátám zásob v důsledku prodýchávání. Uvolněné teplo při dýchání semene může poškodit probuzený zárodek. Doba skladování někdy způsobuje ztrátu klíčivosti semen, jelikož může docházet k poruchám transkripce a translace nukleových kyselin, tím pádem dochází ke snížení enzymatické aktivity. Poškození semen nastává při sklizení nedostatečně vyzrálých semen anebo při skladování semen za nevhodných podmínek (Procházka 2003).

1.5.3 Kryokonzervace semen

Kryokonzervace je metoda zmrazování rostlinných semen při nízkých teplotách. Většina semen může být skladována za sucha v mrazících boxech Millennium Seed Bank (MSB) hluboko v podzemí. Některá semena nesnesou proces sušení. Proto k jejich dlouhodobému skladování a konzervaci je nutné použít speciální metody (Bargues 2019).

Kryokonzervace při ultra nízkých teplotách (tekutý dusík -196 °C) umožňuje dlouhodobé skladování rostlinných materiálů. Klasické kryokonzervační techniky jsou založeny na dehydrataci vyvolané zmrazením (Engelman 2004). Dehydratace semen během dozrávání zajišťuje jejich dlouhodobé skladování a úspěšnou kryokonzervaci. Při procesu dochází k expresi mnoha genů, které působí na měnění metabolismus semene (Askochenskaya 1982). Kryokonzervace zabraňuje vyčerpání rezervních látek, akumulaci toxinů, rozkladu a inaktivaci enzymových komplexů (Stanwood 1985), čímž se minimalizuje riziko genetických změn (Bonner 1990). Kryokonzervace je jedinou technikou, která zajišťuje bezpečné a dlouhodobé uchování různých kategorií rostlin neortodoxních (neprocházejících fází vyschnutí) druhů semen, vzácných a ohrožených druhů (Engelman 2011).

Přínosem kryokonzervace je vysoká bezpečnost uchování, malá náročnost v období uchovávání. Je to metoda, která přispívá k uchování genetické stability, zabraňuje

stárnutí skladovaného materiálu. Je využívána pro uchování genetických zdrojů kulturních a planých forem rostlin (Svoboda et Faltus 2007).

Kryokonzervační metoda se snaží ochránit ohrožené druhy rostlin např. orchidejí (Bustam et al. 2016) nebo endemické druhy, které mají k dispozici pouze malé množství semen (Pérez-García 2008, Ensconet 2009). Většina evropských semenných bank využívá nízké teploty, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a technologie sušení (Goméz-Campo 1972, Puchalski 2004, Pérez-García et al. 2007).

Pro uskladnění semen byl vytvořen standart pro ochranu semen – Millennium Seed Bank (MSB) UK Programme, který patří k největším programům na světě zabývající se ochranou stanovišť rostlin ex situ (Trivedi 2017, Liu et al. 2018). Zmíněný program je veden Královskou botanickou zahradou v Kew ve Velké Británii (Liu et al. 2018). První krok ke správnému uložení semen do banky začíná již při jejich sběru v terénu. Pro uložení semen do MSB je nejdříve zapotřebí shromáždit základní údaje o sběru. Údaje o sběru musí obsahovat geografickou lokaci, popis stanoviště a roční období, ve kterém proběhl sběr semen z populace rostlin. Ke sběru semen jsou přesně dané pokyny. Z rostliny se může shromáždit méně než 20 % zralých semen tak, aby dopad sběru neohrozil přežití populace. Jakmile jsou semena shromážděna a přenesena do MSB, jsou jim přidělena referenční čísla, která se mohou porovnat s terénními údaji a herbářovými položkami. Následuje sušení semen s kontrolovanou vlhkostí. Po vysušení semen pokračuje vyčištění a testování semen řezem, která odhalí, zdali jsou semena plná nebo jsou napadena hmyzem. Po vyčištění a vysušení mohou být semena přidána do sbírek MSB. Poté jsou semena označena a umístěna do vzduchotěsných nádob a skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v podzemních komorách. Po zmrazení se vzorky vyjmou a jsou podrobeny testu klíčivosti. Testování se opakuje v desetiletých intervalech, aby se zjistilo, zda uložená semena zůstávají životaschopná pro budoucí potřebu (Johnston 2022).

Kryokonzervační metoda není vhodná pro všechny typy rostlinných semen. Příkladem můžou být rekalcitní semena (velká semena např. jírovec, dub), která špatně snášejí tradiční konzervační techniky. Semena těchto rostlin jsou velmi velká a pokud zmrznou celé žaludy a šišky, vytvoří se v tkáních semen led, který je usmrtí. Aby se předešlo k usmrcení, musí se z rekalcitních semen odebrat semenné embryo, které se zmrazí rychle při ultra nízké teplotě. V kryokonzervačních pokusech se

zjistilo, že takto malá část semene je schopna po hlubokém zmrazení vytvořit novou rostlinu. Embrya rekalcitních semen však můžeme sušit i částečně. Tento krok je nezbytný k odstranění vody z tkání embrya, která by mohla během chladicího kroku zmrznout v led a poškodit embryo. Aby se vzorky semen ochladily rychle a předešlo se vytvoření ledu, používají se zkapalněné plyny při velmi nízkých teplotách, běžně kapalný dusík (-196 °C) nebo směs kapalného dusíku, která se vytvoří pomocí vakuové pumpy (-210 °C). Poté následuje kultivace *in vitro*, kdy se semenná embrya rozmrazí. Následně jsou pěstována ve zkumavkách ve sterilních podmínkách obsahujících speciální kultivační médium, které podporuje jejich klíčivost a růst (Bargues 2019).

Jiní autoři používají ultra nízké teploty uchovávání v tekutém dusíku pro dlouhodobou ochranu zárodku semen a spor, která se stala populární v zemích jako USA, Austrálie, Japonsko a Rusko (Voronkova et Kholina 2010, Ashmore et al. 2011). Chlazení obecně prodlužuje životnost suchého semene, kryokonzervace zajišťuje dlouhodobé skladování (10–100 let) krátkodobě žijících orthodoxních semen (Walters et al. 2004, Pritchard et Nadarajan 2008).

Kryokonzervace rostlin se používá k ochraně biologické rozmanitosti druhů. Tímto se předchází zániku mnoha druhů rostlin, proto byly v mnoha zemích vytvořeny národní programy pro zachování přírodních genetických zdrojů. Vznikly semenné banky pro uchovávání semenných zárodků, meristémů, pylu a buněčných kultur, které umožňují dlouhodobé uchovávání genomů a ochranu genetického materiálu pěstovaných a volně žijících druhů rostlin (Roos 1989, Pence 1991, Rao 2004).

1.5.4. Semenné banky

Semenné banky jsou praktickým a efektivním nástrojem pro dlouhodobou ochranu rostlin *ex situ* (mimo jejich přirozené prostředí). Jsou prostředkem pro zachování rozmanitosti planě rostoucích rostlin a zásadním doplňkem ochrany a obnovy druhů a stanovišť (Chapman et al. 2019). Semenné banky patří k nejdůležitějším a neúčinnějším místům pro ochranu vzácných a ohrožených druhů. Poslední dobou se počet těchto míst, kde se semena mohou uchovávat, výrazně zvyšuje (Müller et al. 2017). Původně byly semenné banky využity pro uskladnění semen plodin. Dnes se semenné banky budují také pro ochranu planě rostoucích rostlin (O'Donnell et al. 2017). Botanické zahrady a semenné banky se svými dovednostmi vzájemně

doplňují, a to společně vede k propojení ochrany in situ a ex situ. Hlavním cílem bank je zachovat biologickou rozmanitost rostlin tak, abychom zabránili vymírání druhů a zachovali rostlinný materiál pro budoucí generace. Proto v botanických zahradách po celém světě byly vytvořeny živé sbírky rostlin a založeny semenné banky, které podporují ochranu a výzkum (Breman et al. 2021).

Sebraný a uchovaný materiál podle standardu se dá využít pro znovuvysazení nebo pro obnovu původních stanovišť in situ. Mezi nejdůležitější standardy patří duplikace sbírky semen v jiném zařízení, které jsou geograficky oddělena (Ó Donnell et al. 2017). Semena jsou shromažďována a konzervována v zemi původu, a poté jsou duplikáty zasílány do MSB RBG Kew ke skladování (Liu et al. 2018). Následující postup byl zaveden z důvodu možného poškození skladované sbírky nebo možných úhynů. Tento standard pomáhá minimalizovat ztráty ohrožených druhů (Ó Donnell et al. 2017). Konvenční uchovávání semen, která jsou vysušená a zmrazená několik nebo desítek let, je považováno za cenný nástroj ex situ pro ochranu rostlin, archivaci a zdroj genetické variability (Gargiulo et al. 2019).

1.6 Bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*)

1.6.1 Taxonomické zařazení

Bublinatku obecnou (*Utricularia vulgaris*) řadíme do skupiny mixotrofních rostlin, což je pestrá skupina rostlin z odlišných řádů a čeledí. Vlastnost, která tyto rostliny spojuje, je schopnost lovit, konzumovat živočichy v různých podnebných a zeměpisných oblastech, které se navíc odlišují ekologicky a morfologicky (Studnička 1984). Tento druh patří do čeledi *Lentibulariaceae*, která zahrnuje tři rody *Utricularia* (bublinatka), *Genlisea* (genlisej) a *Pinguicula* (tučnice) (Fischer et al. 2000, Barthlott et al. 2004).

Rod *Utricularia* v dnešní době zahrnuje asi 240 druhů. Patří mezi největší a nejrozšířenější rod masožravých rostlin po celém světě. Klasifikovány jsou do dvou poddruhů *Polypompholyx* a *Utricularia*, které jsou založené na obecné morfologii a morfologii pastí. Z fylogenetických studií patří většina sekcí do monofyletické skupiny (Silva et al. 2018).

Systematické členění rodu *Utricularia* je založeno na morfologii pastí a květenství. Je známo, že se vyskytují přechodné druhy například rod *Biovularia*, které jsou

sjednoceny s rodem *Utricularia* na základě morfologie pasti a vodního habitatu. Rod je rozdělen do 35 sekcí. Například sekce *Oligocista* má pasti s dvěma jednoduchými hřbetními přívěsky a listeny (*U. foveola*), pasti s rozvětvenými přívěsky a absencí listenů má druh *U. heterosepala*.

Sekce *Vesiculina* je velice rozmanitá, rozlišuje se typem pasti s přívěsky. Řada sekcí (*Stylozheca*, *Stomiosia*, *Benjaminia*) se odlišují na základě typu pasti, které mohou být podobného tvaru. Druhy *Utricularia* jsou řazeny do mnoha sekcí, které se od sebe liší morfologií pastí nebo květenství a habitatem. Sekce *Utricularia* je vymezena jednotným typem pastí, vodním habitatem a nepřítomností listenců. Vnitřní žlázy pastí jsou většinou stejného typu, který se vyskytuje v evropské skupině (*U. vulgaris*, *U. australis*, *U. intermedia*), ale některé jsou poněkud nebo výrazně odlišné (Taylor 1989).

1.6.2 Morfologie

Bublinatka (*Utricularia* sp.) je vodní bezkořenná masožravá rostlina, která je volně plovoucí pod vodní hladinou, nebo může být ukotvena svými prýty v řídkém sedimentu (Adamec 2006). *Utricularia vulgaris* roste v chladnějších místech a vytváří před zimou na konci prýtů zimní pupeny tzv. turiony. Jsou to zelená, oválná tělíska, která se vytvoří po zkrácení lodyžních článků a seskupení mladých asimilačních orgánů. Po následném oddělení zbylé odumírající lodyhy klesají na dno, kde přezimují (Studnička 1984).

Jedna hlavní osa stonku způsobuje vznik řady bočních větví. Osy nesou fotosyntetizující listy, které jsou střídavě uspořádané po třech nebo čtyřech listech (Friday 1989). Listy mají mnohokrát čárkovitě dělené, zelené barvy (Frank 2009). Past je listového původu, má tvar měchýřku (Juniper et al. 1989). Lapací past je připojena ke stonku krátkou stopkou (Obr. 2). Stěna pasti je obvykle tvořena dvěma buněčnými vrstvami (Lloyd 1929), ale u jiných druhů je tvořena více než dvěma vrstvami (Lloyd 1942, Reifenrath et al. 2006). Stěny pastí, které se skládají ze dvou vrstev fotosyntetických buněk, jsou v mladých pastech turgescenční a pružné. Pro bublinatku jsou typické dimorfní pasti různých velikostí v rozmezí méně než 1 mm a více než 5 mm (Friday 1991), které mají na svém vnitřním i vnějším povrchu žlázy a trichomy (Juniper et al. 1989).



Obr. 2 Detail pasti, stereolupa Nikon SMZ25, foto: R. Prausová, 2017

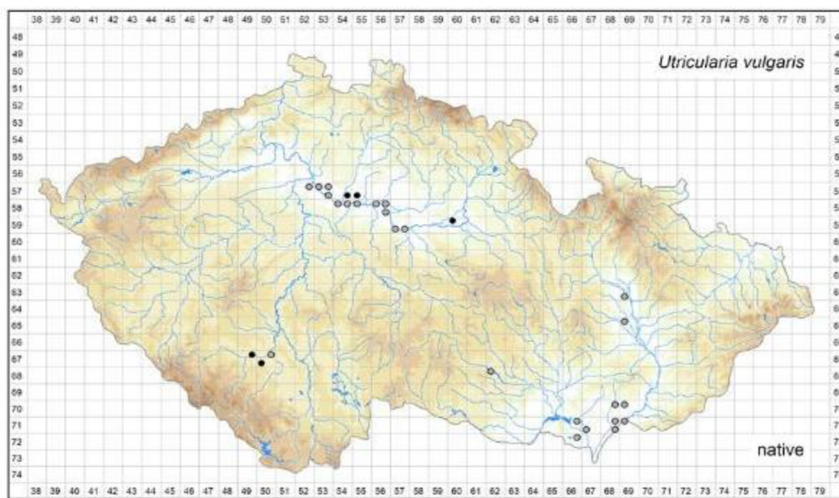
Květy jsou 5četné s nápadně zlatožlutou barvou (Husák 2000, Kubát 2002), která vytváří volná hroznovitá květenství vyrůstající nad vodní hladinou (Husák 2000, Frank 2009). Nejmenší druhy bublinátek mají květy jednotlivé, které obvykle tvoří několikakvěté hrozny, nesené nad vodní hladinou plovoucím rozvětveným prýtem. Květy *U. vulgaris* se od *U. australis* odlišují v době kvetení, kdy *U. vulgaris* má nápadně sedlovitě prohnutý dolní pysk koruny, naopak *U. australis* má zmíněnou část lehce prohnutou (Adamec 2008).

1.6.3 Výskyt druhu

Výskyt v České republice

U. vulgaris byla v ČR ještě před 100 lety docela hojná v teplých oblastech s tvrdší vodou (Adamec 2008), bohužel negativním dopadem je eutrofizace vod, chovem ryb a vypouštění splašků do povrchových vod, patří dnes ke skoro vymizelým druhům (Frank 2009). Podle Červeného seznamu se řadí *U. vulgaris* mezi (C1t) kriticky ohrožené druhy s klesajícím trendem (Grulich et Chobot 2017). V současné době existuje pouze pět potvrzených existujících populací (Gálová et Hájková 2014, Prausová et al. 2015, Kaplan 2017). *U. vulgaris* s vyšší pokryvností v současné době vyskytuje v několika aluviálních tůň v Polabí (Rydlo 2005) a slatinných tůňích u Hrabanova. Izolované výskyty byly zřídka zaznamenány v jižních Čechách v jihozápadní, jižní a střední Moravě (Grulich et Chobot 2017). Bublinátka se po

dvaceti letech začala vyskytovat v Hodonínské Dúbravě (Gálová et Hájková 2014). V roce 2014 byl znovu druh nalezen Faltysovou (rev. L. Adamec) v NPR Bohdanečský rybník ve východních Čechách (Prausová et al. 2015). Z dlouhodobého hlediska jsou považovány dvě populace za stabilní. *U. vulgaris* je často zaměňována s podobnými *U. australis*. Pouze 29 % z 339 zkoumaných herbářových položek původně identifikovaných jako *U. vulgaris* zatímco 70 % je *U. australis*. Distribuční mapa tohoto druhu (Obr. 3) je založena pouze na revidovaném herbáři (Kaplan 2017).



Obr. 3 Rozšíření *U. vulgaris* v České republice, záznamy z období 2000–2016 (převzato z Kaplan 2017)

Výskyt ve světě

Rod *Utricularia* je kosmopolitní, ale na pólech a obecně v suchých oblastech neroste (Obr. 4). Bohatost druhů je vyšší na jižní polokouli (Taylor 1989). I přesto některé pronikly do vod horských tropů a subtropů. Například bublinatka menší (*U. minor*) byla zaznamenána až v Nepálu a horách Barmy a Nové Guiney. Bublinatka obecná (*U. vulgaris*) je udávána z tropů jižně od Sahary do Konga, ze Súdánu, Ugandy (Studnička 1990).

U. vulgaris se vyskytuje po celé Evropě, chybí pouze v nejsevernější části. Ve světě se vyskytuje v severní Africe, Asii, severně na západní Sibiř a na jih do Turecka, Sýrie, Kavkazu, Afghánistánu, Pákistánu a Tibetu (Taylor 1989). V Evropě se hojněji vyskytuje v jižní, severní a východní Evropě (Adamec 2008).



Obr. 4 Oblast rozšíření bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*) na Zemi (Linnaeus, 2017)

1.6.4 Ekologie

Okolo 50 druhů *Utricularia* jsou vodní nebo obojživelné rostliny, které rostou ve stojatých mokřadech s chudými živinami, ve vodách s velkou koncentrací huminových kyselin (Juniper et al. 1989). *U. vulgaris* roste v tůňích, odvodňovacích kanálech, mrtvých říčních ramenech a na okrajích rybníků (Kubát 2002). Z hlediska vody vyžaduje mezotrofní až eutrofní vody s bahnitým dnem (Husák 2000). V těchto vodách jsou nízké koncentrace rozpuštěného kyslíku a pomalý rozklad sedimentu (Studnička 1990). Mixotrofní rostliny se vyskytují v prostředí chudém na živiny. Organický dusík a fosfor získávají trávením své kořisti (Ellison et Gotelli 2009). *U. vulgaris* potřebuje pro své přežití dostatek kyslíku, který je klíčový pro fungování pastí a množství CO_2 pro fotosyntézu (Studnička 1990).

Nepříznivým ekologickým podmínkám druh čelí pomocí turionů (zimní pupeny), které jsou produkovány mnoha vodními rostlinami (Sculthorpe 1967, Bartley et Spence 1987). Jsou to kulovité až elipsoidní pupeny na koncích prýtů (Slavík 2000), které za přijatelných podmínek vyplavou na hladinu a začnou klíčit (Studnička 1990).

U. vulgaris kvete v období červen až září (Kubát 2002). Plodem je tobolka se dvěmi chloupěmi (Slavík 2000) o velikosti 3–5 mm (Husák 2000). Z bublinek mezi hojně kvetoucí patří *U. vulgaris*, *U. australis*. Pouze *U. vulgaris* vytváří malá, klíčivá a četná semena v kulovitých tobolkách, zatímco *U. australis* je vždy sterilní (Adamec 2008). Semena jsou matného vzhledu, mají barevnou škálu od tmavě šedé po tmavě zelenočernou (Obr. 5) (Holzbauerová 2015). Semena bublinek jsou se 4 až 6 hranami prismatická až kubická, šikmá, mnohoúhelníkovitá, hnědočerné barvy (Taylor, 1989, Cross et al., 2018b).

U. vulgaris patří do asociace *Lemno-Utricularietum vulgaris* (Rydlo 2005), ve které dominují diagnostické druhy *U. vulgaris* a *Lemna minor* s vyšší pokryvností. V současnosti se toto společenstvo vyskytuje v několika aluviálních tůň v Polabí a slatinných tůňích u Hrabanova (Šumberová 2011).

1.6.5 Generativní reprodukce a klíčivost semen

Masožravé rostliny se převážně rozmnožují vegetativně za pomoci fragmentace výhonů a turionů. Převážná část rostlin je schopná se rozmnožovat i generativně vytvořením semen (Taylor 1989, Cross 2012, Cross et al. 2016, 2018b). Rozmnožování semenem může sloužit jako bezpečnostní opatření pro překonání nepříznivého období (Adamec 2018).

Generativní rozmnožování masožravé vodní rostliny *Utricularia vulgaris* (*Lentibulariaceae*) může vést k obnově přirozených populací po dočasném vyschnutí stanovišť. Další možnou variantou je šíření semen za pomoci vodního ptactva, která vede k založení nových lokalit (Prausová et al. 2022).

Semena bublinatky byla podrobena různým variantám testů, které by mohly zlepšit a přispět k lepší klíčivosti tohoto druhu. Nejlepší klíčivost byla zaznamenána u semen, která podléhala stratifikaci teplem a byla vystavena působení ethylenu (Holzbauerová 2015). Z úspěšného klíčení semen můžeme usoudit, že klíčivost je ovlivněna dostupností světla, polohou semene ve vodním sloupci a chemickým složením vody. Tyto významné faktory mohou pomoci ke klíčivosti semen v předešlých stanovištích (Prausová et al 2022). Kromě toho bylo zjištěno, že klíčení semen vodních rostlin včetně *Utricularia vulgaris* stimuluje působení ethylenu (Cross 2012, Cross et al. 2016). Stimulační účinek ethylenu na klíčení semen byl zaznamenán

i u jiných masožravých rostlin např. u druhů rodu *Byblis* (Cross et al. 2018 a,b). Pozitivní účinek ethephonu byl odhalen u vodního druhu *Potamogeton praelongus* (Prausová et al. 2014). Požadavek na světlo se může snížit účinkem etylenu na klíčící semena (Prausová et al. 2022). V přírodních podmínkách se může z vhodného vlhkého sedimentu uvolňovat přírodní etylen (Cross et al. 2014).

Bylo objeveno, že několik druhů rostlin produkuje fotofilní semena, která ke svému klíčení potřebují světlo (Baskin a Baskin 2014). To představuje vynoření semen na vodní hladinu, kde jsou semena vystavována světlu. Toto může být důležitý faktor, který pomáhá k lepší klíčivosti semen (Prausová et al. 2022). Pro klíčení semen u rodu *Aldrovanda* a také druhu *Utricularia vulgaris* se ukázalo, že oba tyto druhy potřebují světlené podmínky a vyšší teplotu 25 °C, aby došlo k narušení dormance po několika týdnech studené stratifikace (Holzbauerová 2015).



Obr. 5 Semena bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*), stereolupa Nikon SMZ25, foto: R. Prausová, 2017

1.7 Rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*)

1.7.1 Taxonomické zařazení

Rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*) patří do čeledi rdestovité (*Potamogetonaceae*), která zahrnuje rody: rdest (*Potamogeton*), rdestice (*Groenlandia*), rdestík (*Stuckenia*), šejdračka (*Zannichellia*), *Lepilaena* a *Althenia*. Největší počet taxonů má rod *Potamogeton* (E-monocot 2018). Navíc je známo, že rod vytváří četné vnitrodruhové hybridy, které způsobují potíže při taxonomické klasifikaci (Kaplan et al. 2013).

Čeleď *Potamogetonaceae* podle morfologických metod a molekulárních studií prokazuje existenci 22 taxonů, z nichž 18 rodů náleží do rodu *Potamogeton* (včetně 4 mezidruhových hybridů), 3 do rodu *Stuckenia*, a 1 do monotypického rodu *Groenlandia* (Aykurt et al. 2020). Všechny druhy v čeledi *Potamogetonaceae* se vyznačují velkou morfologickou variabilitou, což představuje celkový vzhled, délka, šířka a tvar listů, nakonec také podmínky prostředí (Kaplan 2002, 2008).

1.7.2 Morfologie

Rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*) je vytrvalá vodní rostlina s dlouhým plazivým oddenkem (Kaplan 2010). Délka lodyhy může nabývat rozměrů od desítky centimetrů po několik metrů. Mezi faktory, které ovlivňují délku lodyhy, je průhlednost vody, přísun slunečního záření. Délka lodyhy rdestu v ČR se pohybuje o 30–150 cm (Prausová 2016a). Lodyha je obvykle v uzlinách lomená cik-cak. Vzplývavé listy zpravidla vždy chybí. Ponořené listy jsou kopinaté, přisedlé, barvy svěže zelené, průsvitné a na bázi objímavé a na vrcholu kápoité. Listy jsou 11–23 žilné a mohou dosahovat délky 5–180 mm (Prausová et Adamec 2010). Barva palistů je od bělavé po zelenavě bílou, na straně přivrácené k listu po celé délce vzájemně srostlé (Kaplan 2010).

Květy jsou drobné, oboupohlavné, přisedlé (Kaplan 2010). Kvete v období květen až červen, kdy klasy krátkodobě vyčnívají na vodní hladinu. Staré lodyhy odumírají. Zralé klasy s nažkami uhnívají a klesají ke dnu (Prausová 2016a). Nažky *Potamogeton praelongus* jsou tmavě zelené, eliptické nebo obvejčité s ostrým hřbetním kýlem a jejich délka je následující 4,5–5,8 mm. Pevné oplodí stárnutím

tmavne. Semena jsou malá, bez endospermu, embryo je zatočené (Kaplan 2010, Prausová 2016a).

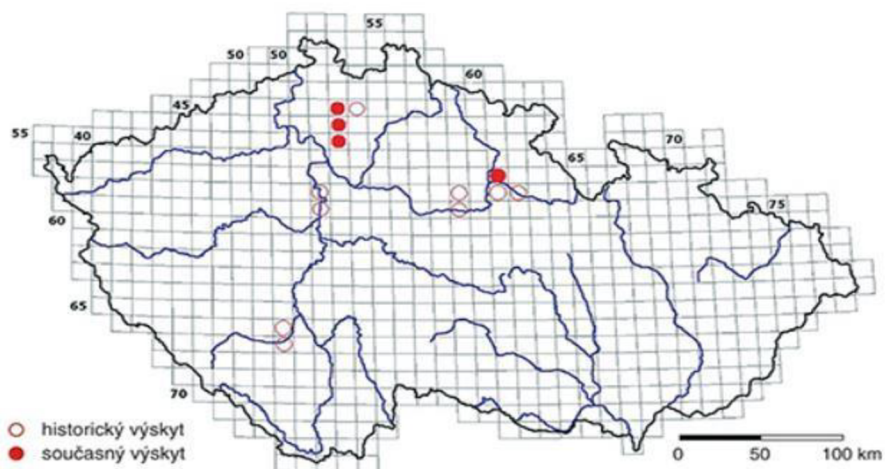
1.7.3 Výskyt druhu

Výskyt v České republice

V minulosti se druh nacházel od nížin po pahorkatiny. Kromě těchto zmíněných vegetačních stupňů byl jeho výskyt zaznamenán v roce 1983 v Praze v řece Vltavě (Rydlo 1986 a, b). Další výskyty v minulosti byly známy z Českolipska (řeka Ploučnice), okolí Písku (řeka Otava a rybníky), Chlumce nad Cidlinou (rybníky) a mezi Týništěm nad Orlicí a Hradcem Králové – z řeky Orlice, mrtvých ramen a tůní (Rydlo 1986 a, b, 1995), (Obr. 6).

Na předposlední české lokalitě rdestu dlouholistého v Jezuitském jezeře (tůň Orlice) v Malšovicích u Hradce Králové byla v roce 1987 velikost populace odhadována na 100 000 lodyh rdestu dlouholistého, bohužel v dalších dvou letech populace vyhynula z důvodu eutrofizace tůně (Husák et Kaplan 1997). Dnes se druh vyskytuje na jediné původní lokalitě u ramene řeky Orlice u Hradce Králové, Rameno u Stříbrného rybníka. Na řece Orlici a na rameni řeky Ploučnice byly populace rdestu úspěšně reintrodukovány (Prausová et al. 2017a). V tůních na Kokořínsku se vyskytuje dočasná záložní populace. Cílem záchranného programu bylo posílení nebo založení několika (3–6) nových populací *P. praelongus* v oblastech jeho původního výskytu (Poořičí, povodí Ploučnice, případně Polabí) popřípadě posílení populace u ramena Orlice u Stříbrného rybníku. Další vybrané lokality byly Kašparovo jezero v nivě Orlice, u Slezského Předměstí v Hradci Králové a v rameni Ploučnice u Heřmaniček na Českolipsku (Prausová et al. 2017a).

Potamogeton praelongus byl vysázen do revitalizovaných tůní v CHKO Kokořínsko (tůň nad rybníkem Harasov, tůň v nivě Liběchovky, tůň pod Plešivcem, tůň u Štampachu, tůň u Medonos, tůň u Tupadel). Nejvíce se založené populaci dařilo v tůni Harasov, která v roce 2007 čítala skoro 1400 lodyh. Naopak došlo k zániku dvou tůní v nivě Liběchovky, což bylo způsobeno nízkým sloupcem vody, následným prohřátím vodního sloupce a zarůstáním tůně konkurenčně zdatnějšími druhy *Potamogeton natans* a *Calliergonella cuspidata* (Prausová et al. 2017a).



Obr. 6 Historické a současné rozšíření rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*), (převzato z: Prausová 2016a)

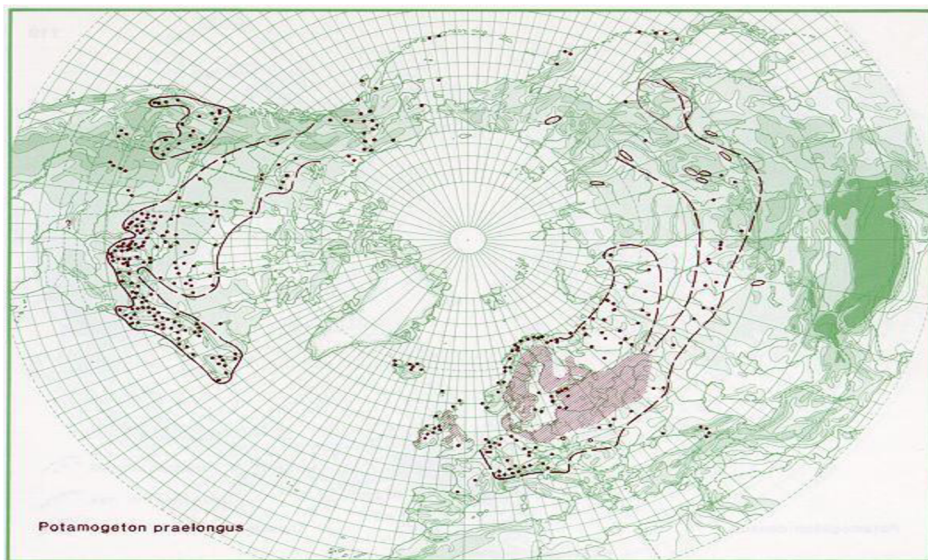
Výskyt ve světě

Rozšíření *P. praelongus* je označováno jako cirkumboreální a subocenánické (Obr. 7). Na Evropském kontinentu se vyskytuje především v severní části a v oblasti Středomoří úplně chybí. Vyskytuje se s rostoucím gradientem zeměpisné šířky, od střední po severní Evropu a koreluje se zlepšujícími se podmínkami (průhlednost vody a obsah živin ve vodě) (Kozelková et al. 2021).

V Evropě můžeme *P. praelongus* nalézt od Islandu, Skandinávie po severní Itálii, Slovinsko, Francii. Velmi četný výskyt je v severských zemích jako jsou Norsko, Finsko, Švédsko, Dánsko. Nový výskyt byl také zaznamenán v jihozápadním Grónsku (Vöge 2002).

V celé střední Evropě je považován za kriticky ohrožený druh (Pott 1995, Schubert et al. 1995). V ČR musí být druh aktivně chráněn pomocí záchranného programu. Ačkoli je *P. praelongus* rozšířen v celé boreální zóně, v několika evropských zemích je označován jako ohrožený druh. Na území Japonska je tento druh zařazován mezi kriticky ohrožené druhy. Kdysi byl hojně rozšířen na celém ostrově Hokkaidó (Kadono 2020), ale na známých lokalitách vymizel, nebo se jeho početnost snížila (Kadono 2016).

Jak již bylo uvedeno dříve, *P. praelongus* má široký areál rozšíření po celé severní polokouli. V několika zemích, ale jeho populace klesají (Bayindir et Ikcinci 2020). *P. praelongus* se vzácně vyskytuje i v Turecku. Druh byl zařazen do Turecké flóry (Uotila 1984) na základě ojedinělého nálezu výskytu (Grossheim 1928), v provincii Kars v severovýchodním Turecku. Od té doby se jej nepodařilo znovu najít, proto byl považována za vyhynulý druh. Až během terénních prací v roce 2016 *P. praelongus* byl nalezen v lokalitě jižního Turecka na středomořském horském stanovišti v oligotrofním alpském jezeře, v nadmořské výšce cca 2600 m. Jedná se o jedinou populaci v Turecku a jediný nález v oblasti Středoziemního moře. Rozsah rozšíření populace je zde menší než 500 m² (Bayindir et Ikcinci 2020).



Obr. 7 Oblast rozšíření rdestu dlouholistého (*P. praelongus*) na Zemi (Linnaeus, 2018)

1.7.4 Ekologie

Důležitými vlastnostmi vody pro růst tohoto druhu jsou pH, elektrická vodivost a tvrdost vody (Prausová 2016a). Rostlina využívá hydrogenuhlíčitanové ionty jako zdroj uhlíku pro fotosyntézu (Husák et Adamec 1998). Na polských lokalitách (vojvodství Mazowieckie a Lubilskie) byl pozorován vysoký obsah vápníku ve formě uhličitanu vápenatého, který způsobil silnou inkrustaci listů (Prausová et al. 2017a). Kombinace všech ekologických podmínek je klíčová pro růst rdestu. Optimální jsou především hlubší, chladnější, nížinné tvrdé vody, které jsou u nás v současnosti vzácné (Husák et Adamec 1998, Prausová 2016a).

Makrofyta jsou celosvětově ovlivňována mnoha přírodními a lidskými faktory (Xia et al. 2022). Ponořená makrofyta mohou indikovat změny v kvalitě vody a hydromorfologii (Alahuhta et al. 2013). Většina lidských zásahů vede ke snížení kvality vod, zvýšené množství živin, které vedou k eutrofizaci (Sand-Jensen et al. 2000, Brett et Benjamin 2008).

Na dně vodních ekosystémů může docházet k ukládání organického materiálu z odumřelých vodních rostlin. Může dojít k vytvoření anoxického prostředí a z bahnitého sedimentu se začnou uvolňovat jedovaté plyny jako jsou např. sirovodík a metan (Prausová et al. 2017). Při vyšší teplotě a vysoké koncentraci minerálních živin dochází k přemnožení vláknitých řas, které porůstající lodyhy a svým přemnožením přispívají ve vodním sloupci ke snížení průhlednosti vody (Prausová et Janová 2010, Prausová et al. 2017a). Kadono et al. (1992) a Kadono (2007) tvrdili, že potenciální příčinou ústupu druhu je znečištění vody prostřednictvím eutrofizace a (nebo) snížené průhlednosti. V Evropě a Severní Americe bylo zjištěno, že *P. praelongus* preferuje chladnější vodu (<27 °C) a jeho lodyhy mohou být poškozeny, pokud teplota přesáhne 25 °C (Kozelková et al. 2021).

1.7.5 Generativní reprodukce a klíčivost

U druhu *Potamogeton praelongus* převládá vegetativní rozmnožování nad generativním. Pro vytvoření nových populací tohoto druhu pomáhá transport na delší vzdálenost. Studium generativního rozmnožování *P. praelongus* v laboratorních podmínkách může pomoci k zachování kriticky ohroženého druhu v České republice a celé střední Evropě a ke zvýšení genetické diverzity populací (Prausová et al. 2015).

Klíčovým faktorem pro reprodukci ponořených rostlin jsou světelné podmínky pod vodou v období klíčení vegetativních výhonů rostlin (Lu et al. 2012), ale i u vzrostlých rostlin. Slabá intenzita podvodního světla brání klíčení, čímž se počet makrofytních druhů snižuje (Madsen et al. 2001). Když dochází k zaplavení, snižuje se průhlednost vody a zvýšení zákalu a tento nedostatek podvodního světla ovlivňuje růst a reprodukci ponořených rostlin (Wang et al. 2019). V laboratorních podmínkách bylo zjištěno, že přerušování dormance semen (Obr. 8.) lze dosáhnout přírodě blízkými metodami jako jsou stratifikace, působení mikrobiální aktivity ve vodě a skarifikace (Prausová et al. 2015).



Obr. 8 Vzhled nažky rdestu dlouholistého (*P. praelongus*), stereolupa Nikon SMZ25, foto: R. Prausová, 2018

1.8 Zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

1.8.1 Taxonomické zařazení

Zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*) patří do čeledi zvonkovité (*Campanulaceae*). Tato čeleď je zastoupena rody zvonek (*Campanula*), zvonečník (*Phyteuma*), zvoněnka (*Legousia*), pavinec (*Jasione*), zvonovec (*Adenophora*) (Kubát et al. 2002). *Campanula* L. (*Campanulaceae*, *Campanuloideae*) je velký rod s dlouhou a složitou taxonomickou historií (Liveri et al. 2019). Zahrnuje více než 2300 druhů (Crowl et al. 2016), které se vyznačují morfologickou a stanovištní rozmanitostí a přitom jsou rozšířeny na všech kontinentech, od tropických deštných lesů až po arktickou tundru (Lammers 2007).

1.8.2 Morfologie

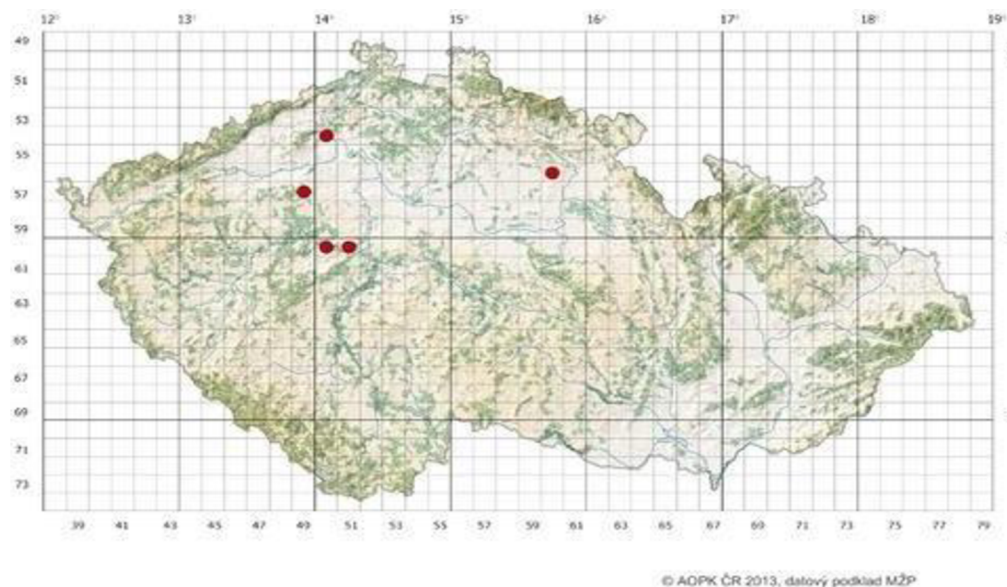
Zvonovec je vytrvalá bylina se ztlustlými kořeny. Lodyha je přímá, větvená nebo nevětvená (Kubát et al. 2002). Dosahuje výšky 40–90 cm a může být válcovitá, podélně rýhovaná, nevětvená. Přízemní listy jsou dlouhé, řapíkaté se srdčitou až okrouhlou čepelí. Lodyžní listy jsou v postavení střídavé, pilovité a mohou být až celokrajné (Kovanda 2000). Zvonovec kvete od konce června do srpna (Kubát et al. 2002). Květy mohou vytvářet květenství latu nebo hrozen. Jednotlivé květy jsou nící, mají světle modrou zvonkovitou, vzácně i bílou korunu (Rybka et al. 2004).

Na rozdíl od zvonků jsou květy zvonovce vonné a čnělka vyčnívá z koruny (Prausová et Marečková 2017). Plodem jsou tobolky hruškovitého tvaru. Semena dosahují velikosti 2,0–2,5 mm a jsou rezavohnědé barvy (Kovanda 2000).

1.8.3 Výskyt druhu

Výskyt v České republice

Kovanda (2000) uvádí, že se v České republice z původních cca 20 lokalit dochovalo 5 lokalit. Prausová et al. (2016b) uvádí, že zvonovec se nachází na lokalitách: PP Babinské louky, NPR Karlštejn, PR Karlické údolí, lesní komplex u Bílichova, lesní komplex Báňský les, PP Džbán a PP Vražba ve východních Čechách. Celkový počet rostlin na všech lokalitách se je malý. Srovnání historických dat se současnými průzkumy ukázalo rychlý pokles počtu populací *A. liliifolia* v místě jejich výskytu. (Prausová et al. 2016b).



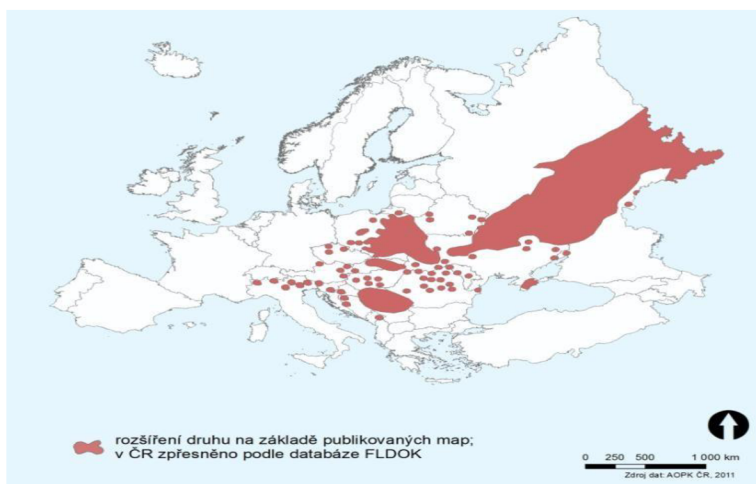
Obr. 9 Současné rozšíření zvonovce liliolitého v ČR (převzato z: AOPK ČR 2013)

Výskyt ve světě

Adenophora liliifolia je rostlina s omezenou schopností šíření na velké vzdálenosti. Roste v klimaticky neextrémních stanovištích (Roleček 2007, Prausová et al. 2016b, Kaplan 2017). Druh představuje evropsko-jihosibiřský floristický prvek, pro který optimální podmínky poskytují hemiboreální lesy jižního Uralu a jihozápadní Sibiře (Roleček 2007). V Polsku se druh vyskytoval přibližně na 100 lokalitách, ale dnes zůstalo jen 21–22 lokalit (Prausová et al. 2016b). Zvonovec eurosibiřský element

(Ciosek 2006), jeho areál se táhne z východní Asie až dostřední Evropy (Obr. 10). Česká republika leží na okraji jeho areálu (Prausová et al. 2018). Centrum, ze kterého se druh šíří, se nachází v západní Asii-jihní Sibiři a disjunktně zasahuje až do západní Evropy (Německo, Švýcarsko) (Tacik 1971, Fedorov 1978). V současné době se nejvhodnější stanoviště pro tento druh nachází ve střední Evropě. Těmito stanovišti jsou perialpidské bazifilní teplomilné doubravy – svaz *Quercion pubescenti-petraeae* (Chytrý et al. 2013), střídavě vlhké louky chudé na živiny – *Molinion caeruleae* (Chytrý 2007). Ve středním ruském lesním pásmu je *A. liliifolia* typický břehový druh preferující světlé dubové lesy a jejich okraje na hlavních říčních nivách (Seregin 2017). Zvonovec v Evropě byl zaznamenán na Slovensku v Rakousku, Maďarsku, dále se vyskytuje v severnější části Itálie a Balkánského poloostrova. V současné době je rozšíření v Evropě značně roztržštěné. Omezuje se především na malé a izolované populace ve střední a východní Evropě (Prausová et al. 2016b). Podobný trend úbytku populace je uváděn také z evropské části Ruska (Boronnikova 2009).

S ohledem na rozšíření ve střední Evropě je *A. liliifolia* považována za indikátorový druh pozdně glaciálního raně holocénního refugia světlých a mezofilních biotopů. Tyto porosty později většinou ustoupily s rozšířením hustých lesů během středního holocénu (Dítě et al. 2018, Roleček 2007). V současné době jsou evropské populace ohroženy fragmentací a ztrátou biotopů, což vede ke zmenšování populací a jejich vymírání (Prausová et al. 2016b).



Obr. 10 Areál rozšíření zvonovce liliolistého (převzato z: převzato z: AOPK ČR 2011)

1.8.4 Ekologie

Půdním podkladem na lokalitách *A. liliifolia* mohou být mírně vlhké, nepodmáčené půdy s hojným obsahem živin (Rybka et al. 2004). Zvonovec liliolistý je mírně světlomilný druh, který preferuje zásadité podklady jako vápence, slíny, slínovce, andezity (Prausová et Marečková 2017). Rybka et al. (2004) uvádí, že recentní lokality zvonovce většinou mají lesní nebo luční charakter, kde preferují polostinná stanoviště nebo toulavý stín s několikahodinovým slunění. Je to vytrvalá rostlina dožívající se několika desítek let.

K přečkávání nepříznivého období využívá řepovitý kořen, na němž se za vhodných podmínek zakládá nadzemní lodyhy. Přečkává tak zimní období, po němž přibližně v polovině dubna raší první stonky. Stejným způsobem přežívá i nepříznivé období v průběhu vegetační sezóny, např. za sucha (pozorováno v roce 2015 na lokalitě Vražba). Může tvořit částečnou růžici nebo soustavu několika hustě olistěných lodyh, které za příznivých podmínek dorůstají výšky kolem jednoho metru. Květenství se začínají formovat koncem května a v průběhu června. Rozvíjení květů začíná zpravidla v červenci (hlavně ve druhé polovině), rostliny dokvétají v průběhu srpna, výjimečně ještě v září. Opylení probíhá hmyzem, větrem i autogamicky. Na nejčasněji kvetoucích větvích začínají zrát tobolky, které nedozrávají ve stejnou dobu, ale postupně (Prausová et al. 2018).

Nejvíce semen (Obr. 11) dozrává v září. Malé klíčící rostlinky dosahují rozměru 2–3 mm a mají dva zelené děložní lístky. Semenáčky, které jsou v následujícím roce v malém počtu nalézány v blízkém okolí mateřských rostlin, mají velikou mortalitu kvůli málo vyvinutému kořenovému systému a nízké konkurenceschopnosti. Mladé rostliny často hynou suchem, sešlapem, okusem, napadením houbovými organismy. S prvními mrazíky dochází k opadu listů a odumírání nadzemních lodyh. Některé suché lodyhy zůstávají holé a vzpřímené do následujícího roku (Prausová et al. 2018).



Obr. 11 Semeno zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*), stereolupa Nikon SMZ25, foto: R. Prausová, 2017

1.8.5 Generativní reprodukce a klíčivost semene

Adenophora liliifolia je vytrvalá bylina, která se řadí ke konkurenčně-stresově (C-S) tolerantní životní strategii s omezenou schopností disperze na velké vzdálenosti (Roleček 2007, Prausová et al. 2016b, Kaplan 2017). Čeleď *Campanulaceae* se vyznačuje malou hmotností semen (obvykle v rozmezí 10–200 µg) (Koutsovoulou et al. 2014). Semena jsou zbarvená rezavohnědě, lesklá, zploštělá (často s náznakem kýlu) a na povrchu podélně svraskalá (Prausová et Marečková 2017).

Proběhla studie vlivu světla na klíčení semen u čeledi *Campanulaceae* u rostlin vyskytujících se na různých typech stanovišť (písečné duny, mokřady, křoviny, lesy, skály, horské a vysokohorské louky), nacházejících se na všech pěti kontinentech. Požadavek na světlo pro klíčení semen byl zjištěn u všech zkoumaných taxonů (Koutsovoulou et al. 2014).

Adenophora liliifolia patří mezi ohrožené druhy nejenom v ČR, ale i v Polsku (Puchalski et al. 2014). Je považován za reliktní, evropsky ohrožený druh rostliny. Jeho výskyt v Rumunsku je omezen na několik málo lokalit. Možnou příčinou jsou požadavky na klíčení druhu, které jsou ztíženy změnou charakteru vegetace. Přežití a posílení populace je podmíněno opatřeními pro lesní hospodaření s cílem redukovat bylinnou či keřovou vegetaci a omezit kosení, pastvu. Navrhují se rovněž opatření na ochranu ex situ (Manole et al. 2015). Výzkum ukazuje, že evropské populace nejsou ohroženy sníženou genetickou rozmanitostí, ale spíše fragmentací

a ztrátou stanovišť, což vede ke zmenšování populací a jejich vymírání (Prausová et al. 2016b).

Cílem připraveného záchranného programu (Prausová et al. 2017c) je zaměřením se na vývoj vhodných technik konzervace ex situ, např. vytvoření sterilních tkáňových kultur, vhodné skladování semen v semenných bankách, experimentální zkoušky klíčivosti a pěstování zaměřené na identifikaci faktorů kritických pro růst semen (Vaculná et al. 2021).

Puchalski et al. (2014) uvádí, že kryokonzervace je spolehlivou metodou pro uchování semen a následné pěstování *A. liliifolia* ex situ, (semena byla vystavena vlivu nízké teploty kapalného dusíku, teplota -160 °C). Na území Polska tuto metodu používají pro záchranu ubývajících populací jedinců *A. liliifolia* v Podkarpatském a Lublinském vojvodství. Odborníci tvrdí, že k posílení zmenšujících se populací lze přispět materiálem (semeny) z populace geneticky a geograficky velmi blízké populace (Riccardi et Simberloff 2009). Genetická záchranná strategie je používána k ochraně populací, které jsou malé nebo mají nízkou genetickou rozmanitost (Ingvarsson 2001). Na sesbíraných semenech byly provedeny testy klíčivosti semen. Nejdříve byla extrahovaná semena vyčištěna a umístěna do komory, aby se stabilizovala při teplotě 15 °C a relativní vlhkosti 18 %. Po 30 dnech byla část semen vystavena 30denní chladové stratifikaci na médiu namočeném v destilované vodě, v chladničce při teplotě 4 °C. Během této doby zbytek semen zůstal v komoře, aby se udržely konstantní parametry vlhkosti. Po stratifikaci byly provedeny testy klíčivosti ve dvou variantách. První variantou byla semena bez stratifikace (kontrolní test). Druhá varianta byla semena po chladové stratifikaci. Semena byla naklíčena v Petriho miskách ø 9 mm v kultivačních komorách. Pro klíčení byly použity proměnlivé teploty 25/15 °C, fotoperioda (16 hod. světla/8 hod. tma) a 70% vlhkost vzduchu. Klíčivost byla poměrně vysoká – 42 % u kontrolního vzorku a 65 % u kontrolního vzorku u semen po studené stratifikaci (Puchalski et al. 2014).

2 Praktická část

2.1 Metodika

2.1.1 Testy klíčivosti

Testy klíčivosti byly realizovány se semeny rostlin bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*), rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*), zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*) v laboratoři botaniky Katedry biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Probíhaly od března 2017 do února 2018. Celkem bylo použito 4 400 semen a bylo provedeno 26 variant testů, které sloužily k zjištění, která varianta testu je účinná pro přerušení dormance a zda na množství vyklíčených semen má vliv uložení semen při pokojové teplotě nebo při velmi nízké teplotě (kryokonzervace). Testy klíčivosti probíhaly v termostatu za stabilních podmínek. V termostatu byla nastavená světelná perioda 16 hodin světlo a 8 hodin tma, teplotní perioda 21 °C ve dne a 15 °C v noci. Kontroly byly prováděny v laminárním boxu, vysterilizovaným pomocí UV lampy.

2.1.2 Původ, sběr, uložení semen

Semena rostlin byla sklízena za jejich dostatečné zralosti v kulturách. Původ semen jednotlivých rostlin je uveden níže.

bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*)

Ve všech variantách testu klíčivosti byla použita semena sbíraná v roce 2017 ve sbírce vodních rostlin v BÚ AV ČR v Třeboni.

rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*)

V testech klíčivosti byla použita semena z let 2015 a 2016 pocházející ze sbírky vodních a mokřadních rostlin v BÚ AV ČR v Třeboni.

zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

Ve variantách testu klíčivosti byla použita semena z roku 2016 získaná z kultury vypěstované ze semen z PP Vražba.

Pro polovinu testů klíčivosti byla sklizená semena uskladněna v papírových sáčcích při pokojové teplotě 21±1 °C. Pro druhou polovinu testů byla použita semena

uskladněná v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

2.1.3 Ošetření semen

bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*)

Před realizací testů byla semena ošetřena v roztoku Sava s destilovanou vodou v poměru 1:1. Semena byla v tomto roztoku ponořena 2 minuty. Poté byla dána do jemného sítko a promyta proudem destilované vody. Následně byla vkládána do živných roztoků I a III.

rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*)

Semena byla před založení testu ošetřena dezinfekčním roztokem Sava (1:1) po dobu 5 minut a následně kultivována.

zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

Semena byla před založení testu ošetřena přípravkem 0,3% roztokem přípravku Previcur. Semena byla ponořena v přípravku na dobu 30 minut. Po ošetření byla semena vkládána do květináčů se zeminou nebo do Petriho misek.

2.1.4 Postupy při zakládání testů

bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*)

Realizace testů byla prováděna ve sterilním prostředí laminárního boxu. Zde byla semena převedena pomocí vysterilizované pinzety do nádobek se živnými roztoky I a III. K testům bublinatky obecné bylo použito 2400 semen, z toho 1200 semen skladovaných při pokojové teplotě (suchá semena) a 1200 semen skladovaných v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C (zmražená semena). Na každou variantu testu bylo použito vždy 100 semen (5 nádob po 20 semenech) (Tab. 1).

Testy určené pro variantu ve tmě byly realizované v plastových uzavíratelných nádobkách. Pro varianty testu na světle byly použity uzavíratelné skleněné nádobky (Obr. 12). Do každé nádobky bylo umístěno 20 semen, tj. Jedna varianta testu probíhala v 5 nádobkách. Složení živných roztoků bylo následující: roztok I (0.5 mM KCl + 0.1 mM CaCl₂ + 0.1 mM MgSO₄), roztok III (0.5 mM KHCO₃ + 0.1 mM

CaCl₂ + 0.1 mM MgSO₄). Nádobky s variantami testu byly řádně označeny. Varianty se zmrazenými semeny po dobu 2 a 4 měsíců byly převedeny do termostatu a kultivovány při teplotě 21±1 °C. Semena ve variantách testu s tepelnou stratifikací byla nejdříve ponechána na týden v termostatu při teplotě 30 °C. Poté byla přenesena do termostatu.



Obr. 12 Způsob kultivace semen ve variantách světlo a tma, foto: autorka, 2017

Tab. 1 Varianty testu tma a světla: *Utricularia vulgaris*

	označení variant	termín	světelné poměry	suché		zmrazené	
Kontrola	ks1-ks5	1. 10. 2017 - 1. 12. 2017	světlo	100	100		
	kt1-kt5	1. 10. 2017 - 1. 12. 2017	tma	100	100		
Klíčení po zmrazení 2 měsíce	1a1-1a5 (suché) 1b -1b5 (zmrazené)	30. 10. 2017 - 28. 12. 2017	světlo	100	100	100	100
	1a1-1a5 (suché) 1b -1b5 (zmrazené)	25. 10. 2017 - 16. 1. 2018	tma	100	100	100	100
Klíčení po zmrazení 4 měsíce	2a1-2a5 (suché) 2b-2b5 (zmrazené 2)	30. 10. 2017 - 28. 12. 2017	světlo	100	100	100	100
	2a1-2a5 (suché) 2b -2b5 (zmrazené)	25. 10. 2017 - 16. 1. 2018	tma	100	100	100	100
Klíčení po teplé stratifikaci 30°C	3a1-3a5 (suché) 3a -3a5 (zmrazené)	31. 10. 2017 - 28. 12. 2017	světlo	100	100	100	100
	3a1-3a5 (suché) 3b - 3b5 (zmrazené)	25. 10. 2017 - 16. 1. 2018	tma	100	100	100	100

rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*)

Realizace testů byla prováděna ve sterilní prostředí laminárního boxu. Semena byla převedena pomocí vysterilizované pinzety do nádobek s vysterilizovanou vodou z řeky Orlice. Při testech bylo použito 800 semen rdestu dlouholistého (Tab. 2). Do jedné sklenice bylo vkládáno 50 semen (Obr. 13), tj. 1 varianta testu probíhala ve 2 sklenicích. Hrdlo sklenic bylo přelepeno vysterilizovanou parafilmovou páskou.

Sklenice byly řádně označeny. Varianty testu se studenou stratifikací byly ponechány 1 měsíc v lednici při teplotě 8 °C, poté byly přeneseny na 14 dní na okno laboratoře a následně byly přeneseny do termostatu.



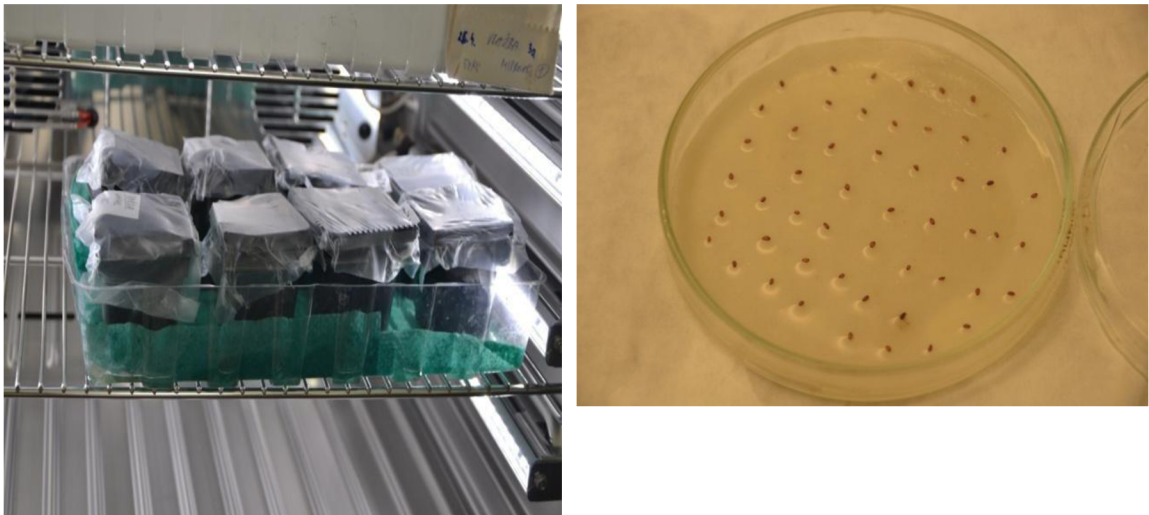
Obr. 13 Způsob uložení semen ke kultivaci *P. praelongus*, foto: autorka, 2017

Tab. 2 Varianty testu: *Potamogeton praelongus*

	označení testu		termín	suché		zmrazené	
				2015	2016	2015	2016
klíčení ve vodě z Orlice (kontrola)	1a1-1a5 (suché)	2a1-2a5 (suché)	21. 3. 2017	100	100	100	100
	1b1-1b5 (zmrazené) (2016)	2b1-2b5 (zmrazené) (2015)	- 5. 6. 2017				
studená stratifikace	3a1-3a5 (suché)	4a1-4a5 (suché)	23. 3. 2017	100	100	100	100
	3b1-3b5 (zmrazené) (2016)	4b1-4b5 (zmrazené) (2015)	- 5. 6. 2017				

zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

Testy byly prováděny ve sterilní prostředí laminárního boxu. K realizaci testů bylo použito 1 200 semen (Tab. 3). Vysterilizovanou pinzetou byla semena přenesena na filtrační papír do sterilních Petriho misek (Obr. 14), a to u variant testů: kontrola, klíčení po teplé a studené stratifikaci. K navlhčení filtračního papíru byla použita destilovaná voda. Do jedné Petriho misky bylo uloženo 50 semen, tj. 1 varianta testu klíčivosti probíhala ve dvou Petriho miskách (celkem 100 semen). Obvod Petriho misky byl zalepen sterilní parafilmovou páskou, aby nedocházelo k vysychání. Varianta testu č. 1. probíhala v termostatu při teplotě 21 °C. Varianta testu klíčení po teplé a studené stratifikaci byla nejdříve na týden ponechána v termostatu při teplotě 30 °C k teplé stratifikaci, pak byla přenesena do lednice ke studené stratifikaci při teplotě 8 °C po dobu 1 měsíce a následně přenesena do termostatu ke kultivaci při teplotě 21±1 °C. Varianta testů klíčivosti v substrátu byla zakládána do vysterilizovaných květináčů s vysterilizovanou zemínou pocházející z lokalita Vražba (Obr. 14). Do každého květináče bylo pomocí pinzety uloženo 50 semen a následně překryto zemínou. Jedna varianta testu klíčení v půdním substrátu byla pravidelně zalévána destilovanou vodou. Druhá varianta klíčení v půdním substrátu byla zalévána roztokem kyseliny gibberelové (10 mg/l).



Obr. 14 Způsob uložení semen *A. liliifolia* ke kultivaci, vlevo – půdní substrát, vpravo – P-misky, foto: autorka, 2017

Tab. 3 Varianty testu: *Adenophora liliifolia*

	označení testu	termín	suché	zmrazené
klíčení v půdním substrátu	2a1-2a2 (suché) 2b1- 2b2 (zmrazené)	4. 5. 2017 - 3. 7. 2017	100	100
klíčení v půdním substrátu za působení kyseliny gibberelové	3a1-3a2 (suché) 3b1-3b2 (zmrazené)	4. 5. 2017 - 3. 7. 2017	100	100
klíčení po teplé a studené stratifikaci	4a1-4a2 (suché) 4b1- 4b2 (zmrazené)	5. 12. 2017 - 5. 2. 2018	100	100

2.1.5 Kontrola klíčivosti semen

Testy byly kontrolovány jednou až dvakrát týdně. Aby nedošlo v Petriho miskách k vysušení filtračního papíru a semen, byla pravidelně zalévána sterilizovanou vodou, případně byl dodáván do květináčů roztok kyseliny gibberelové. Pravidelně byly sledovány známky kontaminace mikroorganismy. Kontaminovaná semena byla odstraňována. Vyklíčená semena byla po zaznamenání přesazována do jiných nádob k dopěstování.

2.1.6 Vyhodnocení testů

K vyhodnocení úspěšnosti testů klíčivosti byly použity kontingenční tabulky a log-lineární modely. Nejdříve byly provedeny samostatné analýzy, které prostřednictvím kontingenčních tabulek testovaly vliv jednotlivých faktorů ovlivňujících klíčení (způsob skladování, chemické složení kultivačního roztoku, světelné podmínky kultivace, ošetření semen před testem klíčivosti). Následně byl testován vliv kombinace faktorů. Použit byl jak parciální, tak marginální Chí kvadrát test. Poslední analýza byla zaměřena na celkový test průkaznosti modelu s využitím Chí kvadrát testu – Tests Section. Veškeré statistické analýzy byly provedeny v programu NCSS (Hintze 2001).

2.2 Výsledky

2.2.1 Bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*)

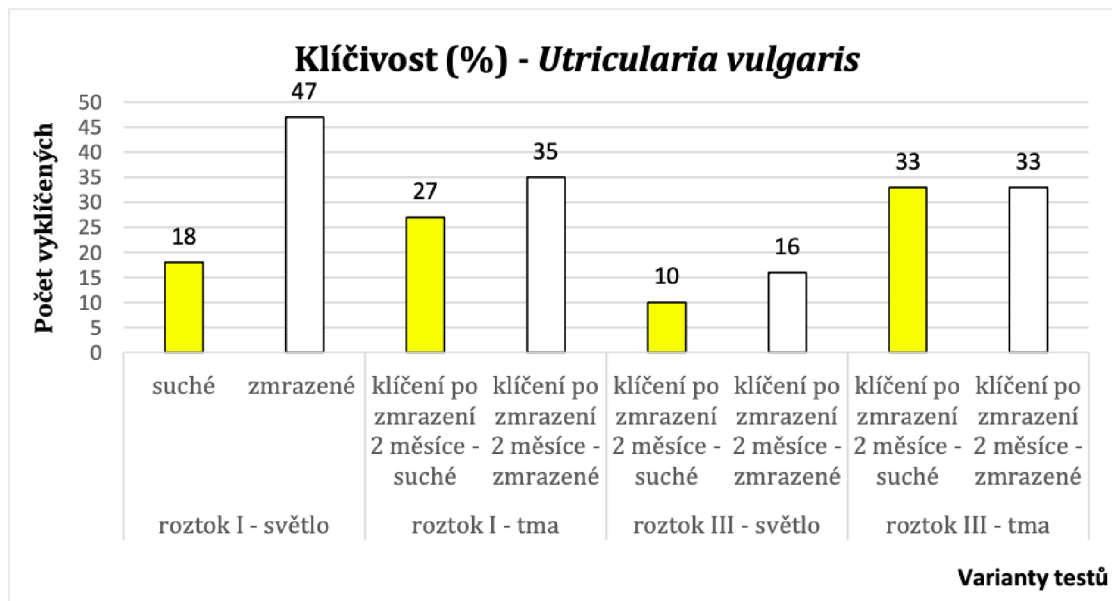
Vzhledem k rozsáhlosti testů klíčivosti a získaných výsledků (Tab. 4, Obr. 15), byla při statistickém testování použita vícecestná analýza, v níž byly testy průkazné až do 4. úrovně (Tab. 5). Při testování významnosti působení jednotlivých faktorů (tj. způsob uložení semen, složení kultivačního roztoku, světelné podmínky, způsob ošetření před testem) vyšly průkazně všechny faktory včetně jejich interakcí (Tab. 6). Nejlepšími testovanými modely ($P=0,0972$) byly: AE (roztok I nebo III), ABC (kombinace: roztok I nebo III, ošetření zásahu před testem), AD (světlo/tma). Z výsledků testů klíčivosti tedy vyplývá, že semena uložená v hlubokomrazicím boxu mají lepší klíčivost než semena uskladněná při pokojové teplotě. Nejlepší klíčivost se projevila ve variantě testů na světle. Semena testovaná v živném roztoku I klíčila lépe než v roztoku III.

Tab. 4 Výsledky testů klíčivosti bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*)

		1	2	3	4	5	klíčivost (ze 100 semen)
roztok I, světlo	kontrola - suché	0	0	0	0	1	1
roztok I, tma	kontrola - suché	0	0	0	0	2	2
roztok III, světlo	kontrola - suché	0	0	0	0	0	0
roztok III, tma	kontrola - suché	0	0	0	0	0	0
roztok I	klíčení po zmrazení 2 měsíce - suché	0	2	0	0	3	5
světlo	klíčení po zmrazení 2 měsíce - zmrazené	0	0	4	0	0	4
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - suché	0	0	0	0	1	1
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - zmrazené	0	0	8	0	8	16
	klíčení po teplé stratifikaci - suché	7	0	3	0	0	11
	klíčení po teplé stratifikaci - zmrazené	7	3	10	0	6	26
roztok I	klíčení po zmrazení 2 měsíce - suché	0	2	0	0	0	2
tma	klíčení po zmrazení 2 měsíce - zmrazené	10	0	6	0	1	17
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - suché	0	0	0	1	3	4
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - zmrazené	0	0	4	0	0	4
	klíčení po teplé stratifikaci - suché	7	6	3	5	5	25
	klíčení po teplé stratifikaci - zmrazené	6	2	2	1	0	11
roztok III	klíčení po zmrazení 2 měsíce - suché	0	0	0	0	0	0
světlo	klíčení po zmrazení 2 měsíce - zmrazené	2	0	0	0	0	2

Tab. 4 Výsledky testů klíčivosti bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*) (pokračování)

		1	2	3	4	5	klíčivost (ze 100 semen)
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - suché	0	0	0	0	0	0
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - zmrazené	0	0	0	0	2	2
	klíčení po teplé stratifikaci - suché	5	4	0	0	0	9
	klíčení po teplé stratifikaci - zmrazené	2	0	0	0	13	15
roztok III	klíčení po zmrazení 2 měsíce - suché	0	0	0	0	0	0
tma	klíčení po zmrazení 2 měsíce - zmrazené	8	1	2	1	0	12
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - suché	3	3	0	0	0	6
	klíčení po zmrazení 4 měsíce - zmrazené	0	0	3	1	3	7
	klíčení po teplé stratifikaci - suché	8	5	1	0	0	14
	klíčení po teplé stratifikaci - zmrazené	0	0	3	4	4	11



Obr. 15 Výsledky klíčivosti testů bublinatky obecné ve variantě světlo, tma

Tab. 5 Vícecestná analýza testů klíčivosti (Multiple-Term Test Section) bublinatky obecné, průkazné testy jsou zbarveny žlutě

K-Terms	DF	Like Ratio	Prob	Pearson	Prob
		Chi-Square	Level	Chi-Square	Level
1WAY & Higher	47	3179,76	0	3061,72	0
2WAY & Higher	41	836,47	0	693,7	0
3WAY & Higher	27	59,36	0,0003	54,94	0,0012
4WAY & Higher	11	21,07	0,0327	23,52	0,0149
5WAY & Higher	2	0,21	0,9021	0,22	0,8949

Tab. 6 Působení faktorů v testech klíčivosti (Single-Term Test Section) bublinatky obecné, průkazné testy jsou zbarveny žlutě, A – klíčení, B – způsob uložení před testem, C – ošetření před testem, D – světlo/tma, E – kultivační roztok I nebo III), průkazný test při testování jednotlivých faktorů – tučně, nejlepší testované modely červeně)

Effect	DF	Partial	Prob	Marginal	Prob
		Chi-Square	Level	Chi-Square	Level
<u>AB</u>	<u>1</u>	<u>9</u>	<u>0,0027</u>	<u>13,37</u>	<u>0,0003</u>
<u>AC</u>	<u>2</u>	<u>67,35</u>	<u>0</u>	<u>71,33</u>	<u>0</u>
AD	1	3,18	0,0743	3,06	0,0803
<u>AE</u>	<u>1</u>	<u>12,77</u>	<u>0,0004</u>	<u>12,31</u>	<u>0,0004</u>
<u>ABC</u>	<u>2</u>	<u>18,74</u>	<u>0,0001</u>	<u>14,93</u>	<u>0,0006</u>
<u>ABD</u>	<u>1</u>	<u>8,77</u>	<u>0,0031</u>	<u>7,17</u>	<u>0,0074</u>
<u>ACD</u>	<u>2</u>	<u>8,24</u>	<u>0,0162</u>	<u>7,37</u>	<u>0,0251</u>
<u>ADE</u>	<u>1</u>	<u>4,39</u>	<u>0,0362</u>	3,58	0,0583

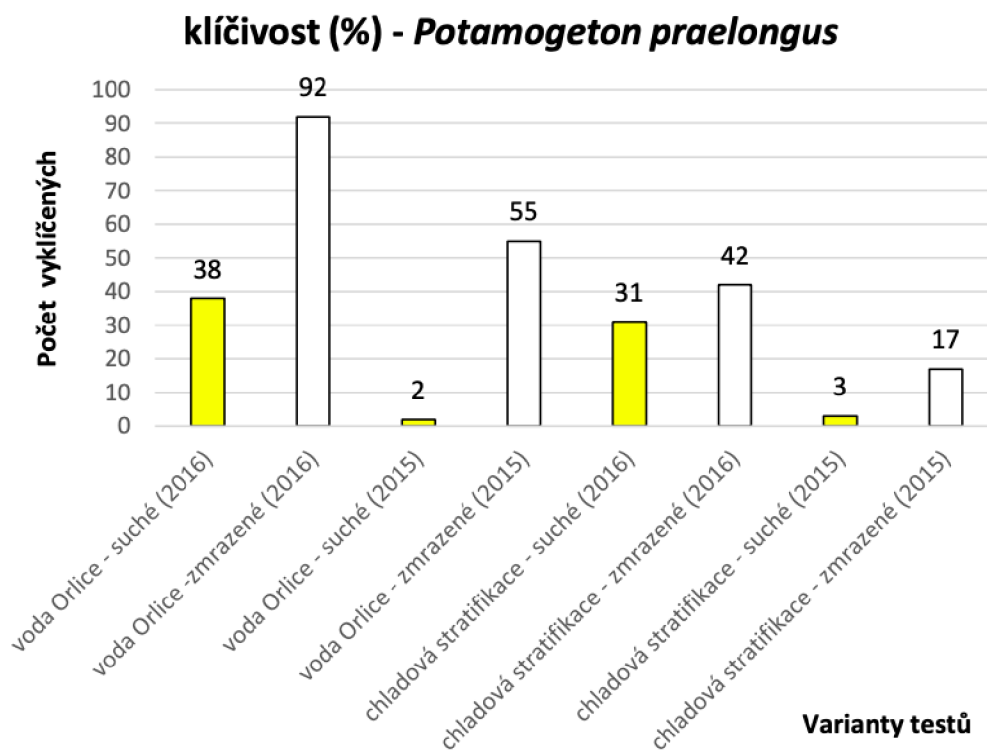
2.2.2 Rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*)

Ve 3 variantách (ze 4) testů klíčivosti rdestu dlouholistého (Tab. 7, Obr. 16) dosahovala semena lepších výsledků klíčivosti při uskladnění v hlubokomrazicím boxu než při pokojové teplotě. Lépe v testech klíčila semena kultivovaná ve vodě z řeky Orlice než semena, která navíc prošla studenou stratifikací. Při testování významnosti působení jednotlivých faktorů (tj. způsob uložení semen, způsob ošetření před testem) vyšly průkazně všechny faktory včetně jejich interakcí

(Tab. 8). Semena rdestu dlouholistého získaná z roku 2016 měla ve všech testech klíčivosti větší úspěšnost klíčení. Nejlepší variantou testu byla kultivace zmrazených semen z roku 2016 ve vodě z řeky Orlice. Nejméně klíčila v testech klíčivosti semena sklizená v roce 2015, a to zejména ta, která prošla studenou stratifikací.

Tab. 7 Výsledky testů klíčivosti rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*)

	1. sklenice	2. sklenice	Klíčivost (%)
kontrola - voda Orlice - suché (2016)	28	10	38
kontrola - voda Orlice - zmrazené (2016)	44	48	92
kontrola - voda Orlice - suché (2015)	1	1	2
kontrola - voda Orlice - zmrazené (2015)	44	11	55
studená stratifikace - suché (2016)	20	11	31
studená stratifikace - zmrazené (2016)	21	21	42
studená stratifikace - suché (2015)	1	2	3
studená stratifikace - zmrazené (2015)	0	0	0



Obr. 16 Testy klíčivosti rdestu dlouholistého různého staří semen

Tab. 8 Působení faktorů v testech klíčivosti (Single – Term Test Section) rdestu dlouholistého, průkazné testy jsou zbarveny žlutě, A – klíčení, B – způsob uložení před testem, C – ošetření před testem)

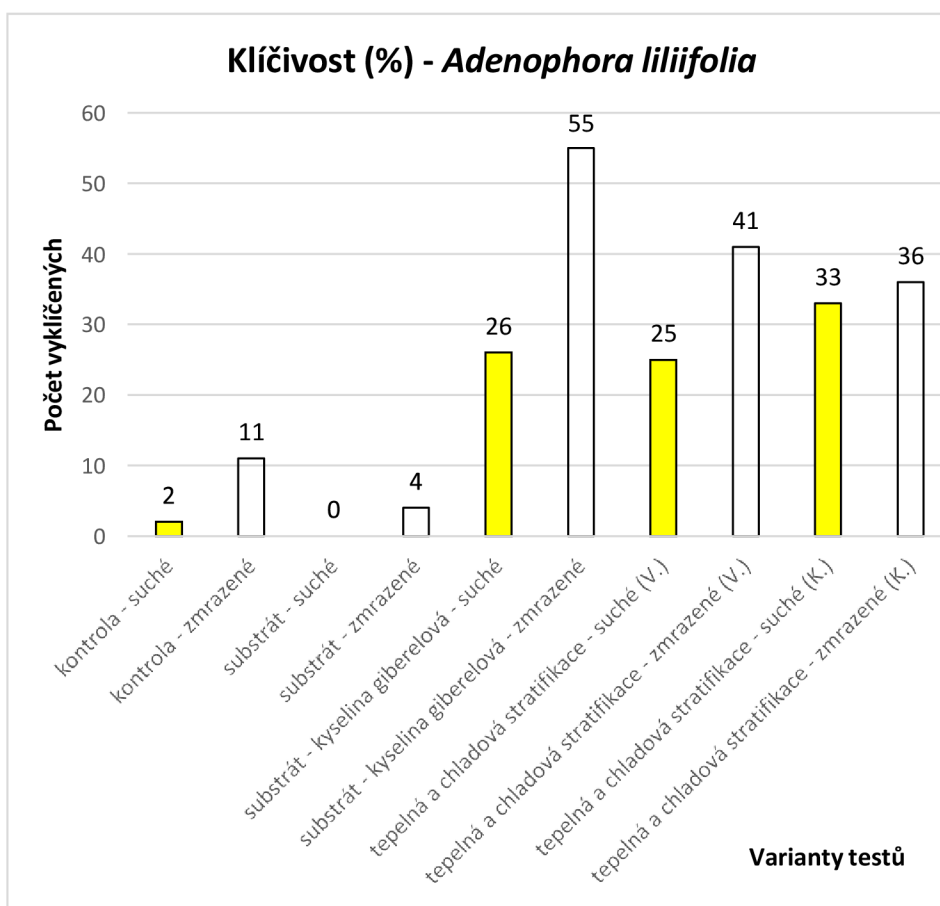
Effect	DF	Partial	Prob	Marginal	Prob
		Chi-Square	Level	Chi-Square	Level
A (pot_kliceni)	1	95,57	0	95,57	0
B (pot_ulozeni)	1	0	1	0	1
C (pot_zasah)	3	0	1	0	1
AB	1	101,77	0	76,64	0
AC	3	245,65	0	220,52	0
BC	3	25,13	0	0	1
ABC	3	56,02	0	56,02	0

2.2.3 Zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

V testech klíčivosti (Tab. 9, Obr. 17) nejlépe klíčila semena zvonovce uložená v hlobokomrazicím boxu a následně přenesená do půdního substrátu, v němž byla pravidelně zalévána kyselinou giberelovou. Naopak semena zvonovce liliolistého skladovaná nasucho při pokojové teplotě a následně přenesená do půdního substrátu, v němž byla pravidelně zalévána destilovanou vodou, neklíčila vůbec. Při testování významnosti působení jednotlivých faktorů (tj. způsob uložení semen, způsob ošetření před testem) vyšly průkazně všechny faktory včetně jejich interakcí (Tab. 10).

Tab. 9 Výsledky testů klíčivosti zvonovce liliolistého (*Adenophora liliifolia*)

	1.miska	2. miska	celkem
kontrola - suché	1	1	2
kontrola - zmrazené	2	7	9
substrát - suché	0	0	0
substrát - zmrazené	2	2	4
substrát - kyselina giberelová - suché	8	18	26
substrát - kyselina giberelová - zmrazené	21	34	55
teplá a studená stratifikace - suché (Vražba)	12	5	17
teplá a studená stratifikace - zmrazené (Vražba)	32	15	47
teplá a studená stratifikace - suché (Karlštejn)	15	22	37
teplá a studená stratifikace - zmrazené (Karlštejn)	21	12	33



Obr. 17 Varianty testů klíčivosti zvonovce liliolistého v půdním substrátu a Petriho miskách

Tab. 10 Působení faktorů v testech klíčivosti (Single – Term Test Section) zvonovce liliolistého, průkazné testy jsou zbarveny žlutě, A – klíčení, B – způsob uložení před testem, C – ošetření před testem)

Effect	DF	Partial	Prob	Marginal	Prob
		Chi-Square	Level	Chi-Square	Level
A (aden_kliceni)	1	307,05	0	307,05	0
B (aden_ulozeni)	1	0	1	0	1
C (aden_zasah)	4	0	1	0	1
AB	1	28,95	0	24,78	0
AC	4	177,54	0	173,37	0
BC	4	4,17	0,383	0	1
ABC	4	20,29	0,0004	20,29	0,0004

3 Diskuze

Testy klíčivosti všech druhů (*Utricularia vulgaris*, *Potamogeton prealongus*, *Adenophora liliifolia*) ukázaly na pozitivní význam uložení semen vodních i terestrických rostlin při nízkých teplotách (hlubokomrazicí box – teplota -80 °C) pro jejich následnou klíčivost. U všech druhů vyšly průkazně též způsoby ošetření semen před zásahem, v čemž se pozitivně projevil výběr variant ošetření podle výsledků předchozích studií (Janová 2010, Sikorová 2013, Prausová et al. 2013 Bajerová 2015, Holzbauerová 2015).

bublinatka obecná (*Utricularia vulgaris*)

Holzbauerová (2015) udává, že při testech klíčivosti semen bublinatky obecné, která byla skladována jako suchá, se neprojevila snížená klíčivost. Z výsledků aktuálních testů vyplývá, že suchá semena skladovaná při pokojové teplotě mají menší klíčivost než semena skladovaná v hlubokomrazicím boxu.

Semena vodních rostlin pro klíčení potřebují vhodné světelné podmínky (Baskin et Baskin 1998). V testech Holzbauerové (2015) i v aktuálních testech se prováděly testy klíčivosti semen bublinatky obecné ve dvou různých světelných variantách, tj. světlo a tma. Holzbauerová (2015) uvádí, že semena ke klíčení vyžadují vhodné světelné podmínky, což se ve všech variantách jejich testů potvrdilo, naopak semena ve variantě tma vykazovala minimální klíčivost. V aktuálních testech byl prokázán význam světla pro klíčení semen bublinatky obecné. Mnoho druhů rostlin produkuje malá semena, která potřebují pro klíčení světlo, tedy jsou fotofilní (Baskin et Baskin, 2014). Je pravděpodobné, že semena *Utricularia vulgaris* vyžadují světlo, protože vystupují na vodní povrch před vyklíčením (Adamec, nepublikováno). Jestliže ve tmě semena vyklíčila, klíčící rostlinky byly bělavé a průsvitné barvy. Semena bublinatky klíčila ve tmě po ošetření teplou stratifikací, méně též po převedení semen z krátkodobého zamrazení do vyšších teplot při kultivaci (Holzbauerová 2015). Prausová et al. (2022) uvádí, že nejvyšší úspěšnost klíčení byla zaznamenána u semen stratifikovaných teplem a semen vystavených působení etylenu. Úspěšnější klíčivost byla zaznamenána při teplotě 21 °C než při 25 °C. Dalším důležitým faktorem pozitivně ovlivňujícím klíčivost, bylo mírně zásadité prostředí (pH 8).

Pro přerušení dormance při studené stratifikaci semen v období zimy potřebuje bublinatka obecná teplotní optima v době jara při přijatelných světelných podmínkách (Baskin et Baskin 1998). Studnička (1990) uvádí, že semena a turiony bublinatky obecné potřebují ke svému přezimování chladnější období. Za přijatelných podmínek turiony vyplavou na vodní hladinu. Holzbauerová (2015) uvádí, že semena dosáhla dobré klíčivosti, pokud byla vystavená mrazu po dobu 14 dní. U kontrolních variant testů, ve kterých semena nebyla vystavena studené stratifikaci nebo mrazu, měla semena malou klíčivost.

Studená stratifikace nebyla vysoce účinná pro přerušení dormance semen *U. vulgaris*. Ukázalo se, že jednoduchá nehluboká morfofyziologická dormance byla výrazněji zmírněna teplou stratifikací. Reakce semen na teplou stratifikaci může usnadnit klíčení v mělkých mokřadních tůňích, kde se vodní sloupec po nástupu jarních podmínek rychleji prohřívá (Prausová et al. 2022).

Podle Holzbauerové (2015) byly též úspěšné varianty klíčivosti: 1) vystavení semen 14 dní mrazu a poté ponechání v lednici po dobu 14 dní, 2) stratifikace mrazem (1měsíc), následná kultivace při teplotě ± 25 °C při světelné periodě. Z aktuálních testů vyplývá, že semena bublinatky uložená v hlubokomrazicím boxu mají lepší klíčivost než semena skladovaná na sucho při pokojové teplotě. Úspěšná klíčivost semen se projevila také u variant testů s teplou stratifikací semen.

Etylen aplikovaný v testech klíčivosti semen *U. vulgaris* prokázal pozitivní účinek na klíčení (Prausová et al. 2022). Působením Ethefonu dochází k postupnému uvolnění plynného etylenu v roztoku. Etylen je známý jako stimulant klíčení pro mnoho vodních a mokřadních druhů rostlin (např. Baskin et Baskin 2014; Cross et al., 2014, 2015, 2018b, Prausová et al. 2014). Přítomnost etylenu kompenzuje nedostatek světla při klíčení semen (Prausová et al. 2022).

Holzbauerová (2015) uvádí, že nejvíce vyklíčených semen bublinatky obecné bylo zjištěno v živném roztoku II o složení $0.5 \text{ mM KHCO}_3 + 0.1 \text{ mM CaCl}_2 + 0.1 \text{ mM MgSO}_4$ (pH cca 8.0). V testech klíčivosti v této práci byly použity roztoky I a III s modifikovaným složením včetně mírně odlišné pH reakce (viz metodika). Lepší klíčivosti dosahovala semena v živném roztoku I než v roztoku III. K nejúspěšnějším variantám testů klíčivosti patřilo klíčení v roztoku I za světla, při teplé stratifikaci i

zatmy. Úspěšná klíčivost byla zjištěna i u některých variant v živném roztoku III, a to v případě teplé stratifikace i ve variantě tma. Holzbauerová (2015) uvádí, že komplexní statistické testy nepotvrdily vliv chemického složení kultivačních živných roztoků na klíčivost semen. Příčinou byly podle ní odlišné teploty kultivace ± 21 °C, ± 25 °C ve variantách testů. V aktuálních testech vliv složení roztoku na klíčivost semen vyšel signifikantní. Prausová et al. (2022) uvádí, že živný roztok obsahující KHCO_3 , CaCl_2 a MgSO_4 napodobuje mezotrofní huminové vody, ve kterých se druh přirozeně vyskytuje. Úspěch klíčení souvisí s dostupností světla, chemickým složením vody a pozicí semen ve vodním sloupci. Největší klíčivost semen u *Utricularia vulgaris* byla v klíčícím roztoku s pH 8, které se nejvíce podobalo přirozenému biotopu na Hrabanovské černavě, kde se pH vody během vegetačního období pohybuje v rozmezí pH 7–8. *Utricularia vulgaris* se nejčastěji vyskytuje ve slatiništích s neutrálním pH (Kaplan et al. 2017). Podmínky potřebné pro klíčení semen ve vodním prostředí *Utricularia vulgaris* se mohou lišit od suchozemských druhů stejného rodu.

rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*)

Způsob uchování semen před realizací testů klíčivosti má vliv na klíčivost semen. Sikorová (2013) ve svých testech klíčivosti udává, že záleží na způsobu uchování semen po jejich sběru. Podle ní mají lepší klíčivost taková semena, která jsou skladovaná ve vodě. Lépe klíčí i semena zavodněná, kdy jsou semena po sběru vysušená a skladovaná při pokojové teplotě 21 ± 1 °C, před zakládáním testů jsou po dobu jednoho měsíce zavodněna vodou. Podle Teltschrové a Hejného (1973) mohou mít nízké teploty negativní vliv na klíčivost semen rdestů. Janová (2010) došla k podobnému závěru poté, kdy nechala semena na 36 hodin v mrazicím boxu. Sikorová (2013) se domnívá, že postupné vysychání semen může vést k oslabení obalů semene (Sikorová 2013) a vysušená semena pak po nabobtnání mohou lépe klíčit. Guppy (1984–1897) ze svých testů klíčivosti na rdestu vyvodil, že semena jsou schopna klíčit po několikaměsíčním vysušení.

Testy klíčivosti v rámci této práce byly realizovány s vysušenými semeny, která se lišila způsobem uložení. Jeden způsob uložení semen byl při pokojové teplotě 21 ± 1 °C, druhý způsob uložení suchých semen spočíval v uložení v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C. Z aktuálních výsledků vyplývá, že vysušená a následně

kryokonzervací skladovaná semena jsou schopna klíčit. Semena uložená v hlubokomrazicím boxu mají lepší úspěšnost klíčení než semena uložená při pokojové teplotě. Vliv způsobu skladování na klíčivost semen vyšel statisticky průkazný. Zajímavé je, že lépe klíčila semena sklizená v předchozí vegetační sezóně 2016, nežstarší semena (rok 2015). Použitá semena rdestu dlouholistého z roku 2016 při skladování na sucho při pokojové teplotě měla klíčivost 34,5 % a zmrazená semena 67 %. Použitá semena rdestu dlouholistého z roku 2015 uskladněná na sucho při pokojové teplotě vyklíčila na 2,5 % a zmrazená semena vyklíčila na 36 %. Kincl et Krpeš (2000) uvádějí, že se klíčivost semen se stářím snižuje. Sikorová (2013) při porovnávání klíčivosti čerstvých a jeden rok skladovaných semen zjistila, že starší semena klíčila lépe. Po tříměsíční kultivaci čerstvých semen jí vyklíčilo 0,67 %, zatímco ze semen skladovaných jeden rok vyklíčilo za stejnou dobu 4,17 %. Sikorová (2013) dospěla k závěru, že roční skladování semen má pozitivní vliv na jejich klíčivost, zatímco u čerstvých semen se teprve dokončuje zrání zárodku a uplatňuje se fyziologická dormance. Z aktuálních výsledků testů v této rigorózní práci vyplývá, že semena skladovaná déle než 1 rok pravděpodobně snižují svoji klíčivost. Tento faktor nebyl statisticky hodnocen.

Janová (2010) uvádí, že nejlepší metoda pro přerušení dormance semen rdestu dlouholistého je studená stratifikace. Semena měla uložena na dva a půl měsíce před testem v lednici a poté 14 dní v pokojové teplotě. Sikorová (2011) zjistila vysokou klíčivost u semen uskladněných v uzavíratelných láhvích v lednici za nedostatku světla a následně přenesených do pokojové teploty. Usoudila, že je to nejlepší a v přírodě nejpravděpodobnější způsob přerušení dormance, jelikož semena v průběhu zimního období projdou nižší teplotou (za menšího přísunu kyslíku a za nedostatku světla). Z aktuálních testů klíčivosti rdestu dlouholistého vychází, že semena kultivovaná ve vodě z Orlice klíčí lépe než semena ovlivněná studenou stratifikací. Faktor způsobu ošetření semen vyšel statisticky průkazný.

Sikorová (2011) uvádí, že vyšší klíčivosti semen rdestu dlouholistého při laboratorních testech lze docílit nejen studenou stratifikací, ale i narušením obalů plodu a semene, např. přípravkem Savo (5% roztok chlornanu sodného). Janová (2010) uvádí, že u semen, která byla krátkodobě (2 hodiny) ošetřena roztokem Sava, nedošlo k narušení vnitřních vrstev semen, tudíž nedošlo ke stimulaci klíčení.

Naopak, při delším působení Sava (36 hodin) se pozitivní účinek na klíčení semen projevil. Autorka přistoupila ke snížení koncentrace Sava ze 100 % na 50 % a nakonec až na 25 %, protože účinek 100% Sava vedl k zastavení růstu klíčku. Prausová et al. (2013) uvádí, že Savo nejprve naruší povrchové struktury semene, proto dochází ke klíčení semen. Při delším působení však Savo může negativně ovlivnit klíčení, protože kromě vnějších vrstev proniká i do vnitřních vrstev semene a embrya. Proto klíčení ani růst klíčících rostlin následně nepokračuje. V tomto aktuálním testu klíčivosti bylo Savo použito pouze ke sterilizaci semen před založení testů klíčivosti.

Janová (2010) a Sikorová (2013) využily aplikaci roztoku Sava k dezinfekci semen, to znamená, že ošetřovaly semena ve všech variantách testů osvědčeným slabým roztokem Sava za účelem snížení kontaminace testů mikroorganismy. V aktuálních testech klíčivosti byla semena také ošetřována před založením testu klíčivosti roztokem Sava (1:1) po dobu 5 minut za účelem sterilizace, následně byla kultivována.

zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*)

Bajerová (2015) ve své bakalářské práci o zvonovci liliolistém zmiňuje velký problém kontaminace semen i po ošetření přípravkem Savo. Proto v aktuálních testech klíčivosti byla semena zvonovce ošetřena fungicidním přípravkem Previcur (viz metodika).

Klíčivost semen ovlivňuje několik faktorů: doba sběru semen, stav zralosti semen a uskladnění semen (Bajerová 2015). V aktuálních testech klíčivosti byl posuzován vliv uskladnění a způsob ošetření semen před testy klíčivosti. Oba tyto faktory i jejich kombinace vyšly statisticky průkazné.

Bajerová (2015) uvádí, že uložení semen po dobu 7 dní do hlubokomrazicího boxu není pro klíčivost semen pozitivní, protože při inkubaci 21 °C v jejích testech nevyklíčilo žádné semeno. Naopak z testů klíčivosti v této práci vyplynulo, že lépe klíčila semena uskladněná v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C. Vliv faktoru skladování semen před testy klíčivosti byl statisticky průkazný. Ke stejnému závěru dospěl i Puchalski et al. (2014), který uchovával semena po dobu 30 dnů při ultra nízké teplotě -160 °C. Lepší klíčivost se projevila u semen, která byla uchována

okamžitým zmrazením při ultra nízké teplotě (klíčivost 52 %) než usemen u kterých byla při zamrazování teplota postupně snižována o 0,5 °C za minutu (43 %). Bajerová (2015) udává, že semena v jejích testech nebyla pravděpodobně vystavena dostatečně nízkým teplotám, aby došlo k úplnému zničení mikroorganismů přítomných na semenech.

Bajerová (2015) i Truhlářová (2008) se shodují, že semena, která jsou vystavena vyšším kultivačním teplotám, mají lepší klíčivost. Bajerová (2015) zaznamenala lepší klíčivost semen zvonovce liliolistého u variant kultivace při teplotě ± 25 °C (27 %), než u varianty při teplotě ± 21 °C (17 %). V aktuálních testech klíčivosti zvonovce liliolistého byla semena vystavena kombinaci teplé a studené stratifikace. Nejdříve byla semena na týden ponechána v termostatu při teplotě 30 °C k teplé stratifikaci, pak byla přenesena do lednice ke studené stratifikaci při teplotě 8 °C po dobu 1 měsíce a následně přenesena do termostatu ke kultivaci při teplotě 21 ± 1 °C. Semena, která byla vystavena teplotním změnám (semena s teplou a studenou stratifikací), mají lepší klíčivost, než semena kultivovaná pouze v termostatu při teplotě 21 ± 1 °C.

V aktuálních testech klíčivosti semen zvonovce liliolistého bylo kromě kultivace na vlhkém filtračním papíře v Petriho miskách použito též klíčení semen ve vysterilizovaném půdním substrátu v květináčcích. Jedna varianta byla pravidelně zalévána destilovanou vodou. Druhá varianta byla pravidelně zalévána roztokem kyseliny gibberelové. Dobrá klíčivost semen byla zjištěna u semen uskladněných v hlubokomrazicím boxu než při pokojové teplotě. Nejlepší výsledky klíčivosti semen byly zaznamenány ve variantě testu se semeny, která byla uskladněna v hlubokomrazicím boxu, poté přenesena do půdního substrátu s pravidelnou zálivkou (roztokem kyseliny gibberelové). Naopak ve variantě testu se semeny skladovanými v hlubokomrazicím boxu, následně přenesenými do půdního substrátu a pravidelně zalévanými destilovanou vodou žádná semena nevyklíčila. Dobrá klíčivost semen ošetřených kyselinou gibberelovou potvrzuje závěry Hopkinse (1995) o pozitivním působení exogenní aplikace gibberelinů na klíčení semen a mobilizaci rezerv endospermu.

Truhlářová (2008) uvádí, že semena zvonovce liliolistého začínají klíčit do 1 týdne od založení testů. V testech Bajerové (2015) klíčení semen probíhalo od prvního do

čtvrtého týdne od založení testů. Aktuální testy klíčivosti potvrzují závěry Bajerové (2015), protože největší klíčivost byla zaznamenána mezi druhým až čtvrtým týdnem od založení testu.

4 Závěr

Rigorózní práce se zabývá studiem významu zamrazení semen terestrických a vodních rostlin pro uchování schopnosti klíčivosti semen v laboratorních podmínkách. Práce obsahuje popis jednotlivých testovaných rostlin, jejich celosvětové rozšíření a výskyt v ČR, dále jejich ekologické nároky a podmínky, které potřebují pro klíčení semen.

Výsledky vlastních testů byly porovnávány s výsledky jiných autorů, kteří se zabývali stejnou problematikou. Obecně z aktuálních testů klíčivosti semen terestrických a vodních rostlin vyplývá, že uložení semen v hlubokomrazicím boxu je dobrá metoda, která zvyšuje úspěšnost klíčivosti semen ve srovnání se semeny uchovávanými při pokojové teplotě.

Z výsledků testů klíčivosti bublinatky obecné je patrné, že pro vyšší klíčivost semen za vyšší teploty, je zapotřebí teplé stratifikace. Před začátkem testů se nepředpokládalo, že by semena bublinatky klíčila i za tmy. I když vyšla vyšší klíčivost semen ve variantě světlo, v případě teplé stratifikace byla zjištěna schopnost semen klíčit i za tmy. Můžeme říci, že úspěch klíčení souvisí s dostupností světla, chemickým složením vody a pozicí semen ve vodním sloupci. Největší klíčivost semen u *Utricularia vulgaris* byla zaznamenána v testech klíčivosti v klíčícím roztoku s pH 8. Tento roztok se nejvíce podobá pH vody z místa jejich přirozeného výskytu jako je např. Hrabanovská černava. Zde se ve vegetačním období pohybuje chemismus vody v toleranci pH 7–8.

V testech klíčivosti rdestu dlouholistého byla semena podrobena různým variantám ošetření. Nejlepší klíčivost dosahovala zmrazená semena z roku 2016 ve vodě z Orlice kultivovaná při teplotě $21 \pm 1^\circ\text{C}$, jejich klíčivost byla 92 %. Dalo se předpokládat, že semena sbíraná a uskladněná z roku 2015 nebudou mít takovou klíčivost jako semena z roku 2016 (skladovaná 8 měsíců). Tyto testy klíčivosti se semeny z roku 2015 potvrdily, že stářím se schopnosti klíčení semen snižuje.

V testech klíčivosti zvonovce liliolistého byla ověřena úspěšná klíčivost semen v půdním substrátu, která byla pravidelně zalévána roztokem kyseliny gibberelové, podporující klíčení. Vůbec neklíčila semena skladovaná na sucho ve variantě v půdním substrátu, kde byla zalévána destilovanou vodou. Předpoklad, že tato

varianta bude mít aspoň malou klíčivost, se nepotvrdila. Pravděpodobně i v přírodních podmínkách semena klíčí až po teplé a studené stratifikaci, případně vlivem fytohormonů, např. kyseliny gibberelové. Přítomnost etylenu kompenzuje nedostatek světla při klíčení semen. Ukázalo se, že etylen působí jako stimulant klíčení pro mnoho vodních a mokřadních druhů rostlin. Pozitivní vliv Ethephonu na klíčení semen byl zjištěn jak *Utricularia vulgaris*, tak také u makrofytní rostliny jako je *Potamogeton praelongus*.

Rigorózní práce se věnuje druhům, které jsou na území ČR velmi vzácné a přežívají na několika posledních lokalitách. Poznání jejich schopnosti klíčit a uchovat si klíčivost je důležité pro účinnou ochranu těchto druhů. Je to důležité nejen pro ČR, tak i pro EU, v jejichž předpisech patří druhy taktéž k ohroženým.

5 Literatura

ADAMEC., L. Zvláštnosti výživy masožravých rostlin. 2. Vodní rostliny. *Živa*. 2006, 3, s. 105-107. ISSN 0044-4812

ADAMEC., L. Naše druhy masožravých rostlin bublinatek. *Živa*. 2008, 4, s. 156-159.

ADAMEC, L. Germination rate and longevity of seeds of *Aldrovanda vesiculosa* and *Utricularia vulgaris*. *Carnivorous Plants Newsletter*. 2018, 47(2), s. 64–69. ISSN 0190-9215.

ALAHUHTA, J., KANNINEN, A., HELLSTEN, S. *et al.* Variable response of functional macrophyte groups to lake characteristics, land use, and space: implications for bioassessment. *Hydrobiologia*. 2014, 737, s. 201–214
<https://doi.org/10.1007/s10750-013-1722-3>

ALONI, R., LANGHAMS, M., ALONI, E., DREIEICHER, E., ULLRICH C. Root-synthesised cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream. *Journal of Experimental Botany*. 2005, 56, s. 1535-1544.

YAN, A., CHEN, Z. The pivotal role of abscisic acid signaling during transition from seed maturation to germination. *Plant Cell Reports*. 2017, 36 (5), s. 698-703.

ASHMORE. S., HAMILTON, K., OFFORD, C. Conservation technologies for safeguarding and restoring threatened flora: case studies from Eastern Australia. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 2011, 47, s. 99-109.

ASKOCHENSKAYA, N. A., ed. Prokofev, A. In *Seed Water Mode*. Nauka, Moscow, 1982, s. 184-222.

ATKINS, S. M., JONES, A. M., GARWOOD, P. R. The ecology and reproductive cycle of a population of *Marenzelleria viridis* in the Tay Estuary. *Proceeding of the Royal Society of Edinburgh*. 1987, 92b, s. 311-322. ISSN 0370- 1646.

ATWATER, B. R., VIVRETTE, N. J. Natural protective block in the germination of seed. *Acta horticulturae*. Ransom seed Laboratory, Carpinteria, California, 1987, s. 202.

AYKURT, C., FEHRER, J., YOL, S., KAPLAN, Z., BAMBASOVÁ, V., DENIZ, G., AYDEMIR, E., IMIR, N. Taxonomic treatment and phylogenetic analysis of the family

Potamogetonaceae in Turkey. *Taxon*, 2020, 69 (6), s. 1172-1190. doi: 10.1002/TAX.12364

BAJEROVÁ, A. *Studium ekologických nároků zvonovce liliolistého (Adenophora liliopholia) v podmínkách střední Evropy*. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 58 s.

BARTLEY, M. R., SPENCE, D. H. N. Dormancy and propagation in helophytes and hydrophytes. *Archiv Hydrobiol. (Beih.)* 1987, 27, s. 199-201.

BARTHLOTT, W., POREMBSKI, S., THEISEN, I. *Karnivoren. Biologie und Kultur fleischfressender Pflanzen*. 2004, Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 2004. ISBN 3-8001-4144-2.

BARTON, L. V. Dormancy in *Tilia* seed. *Contrib. Boyce Thomp, Inst.* 1934, 6, s. 69-89.

BASKIN, J. M., BASKIN C. C. Germination ecophysiology of an eastern deciduous forest herb *Styphorum diphyllum*. *The American Midland Naturalist*. 1984, 111. s. 390-39

BASKIN, J. M., BASKIN C. C. Seed germination ecology of poison hemlock, *Conium maculatum*. *Canadian Journal of Botany*. 1990a, 68 (9), s. 2018-2024.

BASKIN, J. M., BASKIN C. C. Germination ecophysiology of seeds of the winter annual *Chaerophyllum tainturieri*: A new type of morphophysiological dormancy. *Journal of Ecology*. 1990b, 78 (4), s. 993-1004. ISSN 1365-2745.

BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego: CA: Academic Press, 1998. 666 s. ISBN 0-12-0802600.

BASKIN, J. M., BASKIN, C. C., Li. X.: Taxonomy and evolution of physical dormancy in seeds, *Plant Species Biology*, 2000. 15, s. 139-152.

BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 2004, 14, s. 1-16. ISSN 0960-2585

BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Second, edi., Academic Press, 2014.

BARGUES D. B. In pictures: Cryopreservation. [online] [2022]. [cit. 2019-04-11]. Dostupné z WWW :In pictures: Cryopreservation | Kew

BAYINDIR, N., IKINCI, N., Habitat Preferences, Distribution and Anatomy of the Clasping-leaved Pondweeds of the Turkey. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 2020, 21(2), s.95-106. DOI:10.23902/trkjnat.746096

BENVENUTI, S., MACCHIA, M. Effect of hypoxia on buried weed seed germination. *Weed Res.* 1995, 35, s. 343-351.

BERG, G., OPELT, K., ZACHOW, C., LOTTMANN, J., GÖTZ M., COSTA, R.; SMALLA, K., The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005, 56, s. 250-261.

BEWLEY, J. D., BLACK, M. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Berlin: Plenum Press, 1994. ISBN 978-0-306-44747-1

BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell.* 1997, 9 (7), s. 1055-1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>

BEWLEY, J. D. [ed.] *Seed: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition, © Springer+ Business Media LLC, 2013. ISBN 978-1-4614-4693-4-6.

BONNER, F. T. Storage of Seed: Potential and limitation for germplasm conservation. *For. Ecol. manag.*, 1990, 35 (1-2), s. 35-43.

BORONNIKOVA, S.V. Genetic variation in Ural populations of the rare plant species *Adenophora lilifolia* (L.) DC. on the basis of analysis of polymorphism of ISSR markers. *Russ J Genet.* 2009, 45, 571–574. <https://doi.org/10.1134/S1022795409050081>

BREMAN, E., BALLESTEROS, D., CASTILO-LORENZO, E., COCKEL, C.; DICKIE, J., FARUK, A., O'DONNELL, K., OFFORD, C. A., PIRONON, S., SHARROCK, S., ULIAN, T. Plant Diver Conservation Challenges and Prospects—The Perspective of Botanic Gardens and the Millennium Seed Bank. *Plants* 2021, 10 (11). 2371. <https://doi.org/10.3390/plants10112371>

- BRETT, M. T., BENJAMIN M. M. A review and reassessment of lake phosphorus retention and the nutrient loading concept. *Freshwater Biology*. 2008, 53 (1), s.194–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01862.x>
- BUSTAM, B.M., DIXON, K., BUNN, E. A cryopreservation protocol for *ex situ* conservation of terrestrial orchids using asymbiotic primary and secondary (adventitious) protocorms. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. 2016, 52, s. 185–195. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9732-7>
- CAMPBELL, N. A., REECE J. B. *Biologie*. Dotisk první vydání. Brno: Computers Press a.s. 2008. ISBN 80-251-1178-4.
- CAMPOY, J A., RUIZ D., EGEA, J. Dormancy in temperate fruits trees in a global warming context. *Scientia Hortivulturae*. 2011, 130(2), s. 357-372.
- CIOSEK, M. The ladybells *Adenophora liliifolia* (L.) Besser in forest Kisielany (Siedlce Upland, E Poland). *Biodiversity, Research Conservation*. 2006, 3-4, s. 324-328.
- CHAPMAN, T. MILES, S. TRIVEDI, C. Capturing, protecting and restoring plant diversity in the UK: RBG and the Millennium Seed Bank. *Plant Divers*. 2019, 41(2), s. 124–131. doi: 10.1016/j.pld.2018.06.001
- CHYTRÝ, M. (ed). *Vegetace České republiky 4. Lesní a křovinná vegetace*. Academia, Praha. 2013. ISBN: 978-80-200-2299-8
- CHYTRÝ, M. (ed). *Vegetace České republiky 1. Travinná a keříčková vegetace*. Academia, Praha. 2007. ISBN 987-80-200-1462-7.
- COME, D., CORBINEUAU, F., SOUDAIN, P. Beneficial effect of oxygen deprivation on germination and plant developmnet. In: JACKSON, M. B., DAVIES, D. D., LAMBERS, H., eds. *Plant life under oxygen deprivation*. Hague: SPB Academic Publishing. 1991, s. 69-83. ISBN 9051030517.
- COPELAND, L. O., McDONALD M. B. *Principles of seed science and technology*. 4th edn. Springer, Boston, MA. 2001. ISBN 978-1-4615-1619-4.

CORBINEAU, F., CÔME, D. Control of seed germination and dormancy by the gaseous environment. In: KIGEL, J., GALILI J [ed]: *Seed development and germination*. Dekker, New Yourk, 1995, s. 397-424.

CROSS A.T., *Aldrovanda: The Waterwheel Plant*. Redfern Natural History Productions. Dorset, UK, 2012. ISBN 978-1-908787-04-0

CROSS, A.T., CAWTHRAY, G.R., MERRITT, D.J., TURNERT, S.R., RENTON, M., DIXON, K.W. Biogenic ethylene promotes seedling emergence from the sediment seed bank in an ephemeral tropical rock pool habitat. *Plant Soil*. 2014, 380(1-2), 73–87. DOI:10.1007/s11104-014-2083-z

CROSS, A.T., TURNER, S.R., RENTON, M., BASKIN, J., DIXON, K.W., MERRITT, D.J. Seed dormancy and persistent sediment seed banks of ephemeral freshwater rock pools in the Australian Monsoon Tropics. *Ann. Bot.* 2015, 115(5), 847–859. doi: 10.1093/aob/mcv014

CROSS, A.T., A DAMEC, L., TURNER, S.R., DIXON, K.W., MERRITT, D.J. Seed reproductive biology of the rare aquatic carnivorous plant *Aldrovanda vesiculosa* L. (*Droseraceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016. 180. s 515–529.

CROSS, A.T., DAVIS, A., FLEISCHMANNF, A., HORNER, J.D., JÜRGENS, A., MERRITT, D.J., MURZA, G. L., TURNER, S.R. Reproductive biology and prey-pollinator conflicts. In: Ellison, A.M., Adamec, L. (Eds.), *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, Oxford, U.K., 2018a, s. 294–313. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198779841.003.0022>

CROSS, A.T., BARRETT, M.D., TURNER, S.R., DIXON, K.W., MERRITT, D.J. Seed-dormancy depth is partitioned more strongly among habitats than among species in tropical ephemerals. *Aust. J. Bot.* 2018b, 66 (3), 230–242. <https://doi.org/10.1071/BT17244>

CROWL, A. A., MILES, N.W., VISGER, C.J., HANSEN, K., AYERS, T., HABERLE, R., CELLINESE, N. A global perspective on *Campanulaceae*: Biogeographic, genomic, and floral evolution. *American Journal of Botany*, 2016, 103 (2), s. 233-245. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500450>

DÍTĚ, D., HÁJEK, M., SVITKOVÁ, I., KOŠUTHOVÁ A., ŠOLTES, R., Kliment J. Glacial-relict symptoms in the Western Carpathian flora. *Folia Geobot.* 2018, 53, s. 277–300. <https://doi.org/10.1007/s12224-018-9321-8>

DONOHUE, K. Seed and seasons: Interpreting germination timing in the field. *Seed Science Research.* 2005, 15(3), s. 175-187. DOI:10.1079/SSR2005208

DURRANT, M. J., MASH, S. Y. Sugar-beet seed steep treatments to improve germination under cold, wet conditions. *Plant Growth Regulation.* 1991, 10, s. 45-55.

ELLINSON, A. M., GOTELLI, N. J. Energetic and the evolution of carnivorous plants. Darwin's most wonderful plants in the world's. *Journal of Experimental Botany.* 2009, 60 (1), s. 19-42. ISSN 0022-0957.

ENGELMANN, F., " Plant cryopreservation: Progres and Prospect", *In Vitro Cellular and Development Biology.* 2004, 40(5), s. 427.

ENGELMANN, F., Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* 2011, 4, s. 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>

ENSCONET, Curation protocols. progress and prospects. *In Vitro Cellular and Development Biology.* 2009, Royal Botanic Garden. Kew.

E-MONOCOT, Potamogetonaceae. [online] [2018]. [cit. 2018-20-06]. Dostupné z WWW: <http://potamogetonaceae.e-monocot.org/>

FALLON, M. D., KELLER, A. H. *Auxins Structure, Biosynthesis and Functions.* New York: Nova Science Publishers, 2012. ISBN 978-1621005049.

FEDOROV, A. Flora SSSR. Flora partis Europaeae URSS. Vol. III: Magnoliopsida (Dicotyledones). Izd. "Nauka", Leningrad. 1978. (in Russian, Latin summary)

FENNER, M. *Seed ecology.* Chapman and Hall. London, 1985. ISBN 978-0-412-25930-2.

FENNER, M., TOMPSON K. *The Ecology of Seeds.* Cambridge University Press, 2005. ISBN 0-521-65311-8.

- FINCH-SAVAGE, W. E., LEUBNER-METZGER G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 2006, 171(3), s. 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- FINKELSTEIN, R., REEVES, W., ARIZUMI, T. STEBER, C. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*. 2008, 59, s. 387-415.
- FISCHER, E., POREMBSKI, S., BARTHLOTT, W. Revision of the genus *Genlisea* (*Lentibulariaceae*) in Africa and Madagascar with notes on ecology and phytogeography. *Nordic Journal of Botany*. 2000, 20 (3), s. 291-318.
- FORBIS, T. A., FLOYD, S. K., DeQUEIROZ A. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: Implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution*. 2002, 56 (11), s. 2112-2125.
- FRANK, D. *Utricularia vulgaris* L. - bubliantka obecná. Botany.cz [online] [2009]. [cit. 2018-10-11]. Dostupné z WWW: <http://botany.cz/cs/utricularia-vulgaris/>
- FRIDAY, L. E. Rapid turnover of traps in *Utricularia vulgaris* L. *Functional Ecology*. 1989, 80, s. 272-277. ISBN 0029-8549.
- FRIDAY, L. E. The size and shape of traps of *Utricularia vulgaris* L. *Functional Ecology*. 1991, 5, s. 602-607.
- GADDA, S. Fiziologia vegetala. Editura *Academic Press*. Cluj-Napoca. 2003, s. 53-55.
- GÁLOVÁ, A., HÁJKOVÁ, P. *Utricularia vulgaris* v Hodonínské Dúbravě. *Zprávy České botanické společnosti*. 2014, 19, s. 216-271. ISSN 1211-5258.
- GARGIULO, R., SAUBIN, M, RIZZUTO, G., WEST, B., FAY, M.F., KALLOW, S., TRIVEDI, C. Genetic diversity in British populations of *Taxus baccata* L.: Is the seedbank collection representative of the genetic variation in the wild? *Biol Conserv*. 2019, 233, s. 289–297.
- GIMÉNEZ-BENAVIDES, L., ESCUREDO, A., PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination of high mountain Mediterranean species: altitudinal, interpopulation and interannual variability. *Ecological Research*. 2005, 20 (4), s. 433-444.

GLOSER, J. *Fyziologie rostlin*. První vydání. Brno: Masarykova univerzita. 1995. ISBN 80-201-1062-2.

GOMÉZ-CAMPO, C., Preservation of West Mediterranean members of the Cruciferous tribe *Brassicaceae*. *Biological Conservation*. 1972, 4 (5), s. 355-360.

GROSSHEIM, A. A. *Flora Kavkaza*. Vol 1. Narodnyi Komissariat Zemledeliya SSR Armenii, Tiflis, 1928. s. 295.

GRULICH, V., CHOBOT, K. [eds.] Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Cévnaté rostliny. *Příroda*, Praha. 2017, 35, s. 1-178. ISSN 1211-3603.

GUPPY, H. B. Germination of seed of aquatic plants. *Proceedings of the Royal Physical Society of Edinburgh*. 1894-1897, 13, s. 344-360.

HARPER, J. L. *Population biology of plants*. London: Academic Press, 1977. s. 892.

HAYAT, M. A. Morphology of seed germination and seedling in *Annona squamosa*. *Botanical Gazette*. 1963, 47, s. 873-887.

HESS, D. *Fyziologie rostlin*. První vydání. Praha: Academia, 1983. Nakladatelství ČSAV, s. 348.

HILHORST, H. W. Definition and hypotheses of seed dormancy. In: *Seed development, dormancy and germination*. [ed.] BRANDFORD, K, NONOGAKINO, H. *Annual Review of Plant Biology*. 2007, 27, s. 50-67.

HILHORST, W. M. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*, 1995. 5(2), s. 61-73.

HINTZE, J. NCSS. Number Cruncher Statistical System. 2011. NCSS, Kaysville, UT, USA, 2011.

HOLZBAUEROVÁ, H. *Testování klíčivosti masožravé vodní rostliny bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*)*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 77 s.

- HOPKINS, W. G. *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc. 1st edition. 1995, s. 452. ISBN 0-471-54547-3.
- HOUSNEDL, V. Biologické vlastnosti semen a sadby. In HOUBA, M. HOUSNEDL, V. *Osivo a sadba*. 2002, Praha. s. 186, ISBN 80-902413-6-0.
- HUNTER, J. R., ERICKSON A. E. Relation of seed germination to soil moisture tension. *Agronomy Journal*. 1952, 44, s. 107-109.
- HUSÁK, Š., KAPLAN, Z. Studium a záchrana vybraných ohrožených druhů rodu *Potamogeton*. Studium pro AOPK ČR. 1997, s. 22.
- HUSÁK, Š., ADAMEC, L. Záchranné kultivace ohrožených druhů vodních a mokřadních rostlin v Botanickém ústavu AV ČR v Třeboni. *Příroda*, Praha. 1998. 12, 7-26.
- HUSÁK, Š. *Utricularia* L. bublinatka. In: SLAVÍK, B, [ed]. *Květena ČR, díl 6*. Praha: Academia. 2000, ISBN 80-200-0306-1.
- INVARSSON, P., Restoration of genetic variation lost—the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*. 2001. 16 (2). s. 62-63.
- JANOVÁ, J. *Rdest dlouholistý (Potamogeton preaelongus Wulfen) v České republice*. Hradec Králové, 2010. Diplomová práce. Pedagogická fakulta Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 101 s.
- JOHNSTON. J., Freezing seeds for the future. [online] [2022]. [cit. 2022-04-11]. Dostupné z WWW: Freezing seeds for the future | Kew
- JUNIPER, B. E., ROBINS, R. J., JOE, D. M. *The Canivorous Plants*. Academic Press Limite, London, 1989, s. 353. ISBN 0-12-392170-8.
- KADONO, Y., NAMAKURA, T., WATANABE, K., KUNIHICO, U. Present state of aquatic macrophytes of three lakes in Kushiro Moor, Hokkaido. *The Journal of Phytogeography and Taxonomy*. Japan. 1992, 40, s. 41-46. (in Japanese with English abstract)

- KADONO, Y., Change in macrophytic flora of Lake Takkobu, Kushiro, Japan, in past 30 years. *Japanese Journal of Limnology*. 2007, 68, s. 105-108. <https://doi.org/10.3739/rikusui.68.105>
- KADONO, Y. Remarkable and rare aquatic macrophytes in Hokkaido („Hokkaido no chumoku subeki kishou mizukusa“) *Hoppousansou*. 2016, 33, s. 7-12.
- KADONO, Y. Potamogetonaceae. In: IWATSIKU, K., BOUFFORD, D. E., OHBA, H., editors. Flora of Japan volume Iva Angiospermae, Monocotyledoneae (a). Tokyo. Kondasha 2020. s. 9-14.
- KAPLAN, Z., DANIHELKA, J., ŠUMBEROVÁ, K., CHRTEK, J., ROTREKLOVÁ, O. [eds.]. Distributions of vascular plants in the Czech Republic. Part 5. 2017, *Preslia* 89, s. 333-439.
- KAPLAN, Z. 2002. Phenotypic plasticity in Potamogeton (Potamogetonaceae). *Folia Geobot.* 2002, 37, s. 141–170. <https://doi.org/10.1007/BF02804229>
- KAPLAN, Z. A taxonomic revision of *Stuckenia* (Potamogetonaceae) in Asia, with notes on the diversity and variation of the genus on a worldwide scale. *Folia Geobot.* 2008, 43, s. 159–234. <https://doi.org/10.1007/s12224-008-9010-0>
- KAPLAN, Z. Rdestovité (Potamogetonaceae). In HEJNÝ, S., SLAVÍK, B. [ed.]. *Květena České republiky* 8. Vyd. 1. Praha: Academia. 2010. ISBN 978-80-200-1824-
- KAPLAN, Z., JAROLÍMOVÁ, J., FEHRER, J. Revision of chromosome numbers of Potamogetonaceae: a new basis for taxonomic and evolutionary implications. *Preslia*. 2013, 85(4), s. 421-482.
- KAPLAN, Z. Flora and phytogeography of the Czech Republic. In: CHYTRÝ, M., DANIHELKA, J., KAPLAN, Z., PYŠEK, P. (eds) *Flora and vegetation of the Czech Republic*. Springer. 2017.
- KĘPCZYŃSKI, J., KĘPCZYŃSKA E. Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum*. 1997, 101 (4), s. 720-726.

KEPCZYŃSKI, J., SZNIGIR, P. Response of *Amaranthus retroflexus* L. seeds to gibberellic acid, ethylene and abscisic acid depending on duration of stratification and burial. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2012, 70 (1). ISSN 0167-6903.

KINCL, M., KRPEŠ V. *Základy fyziologie rostlin*. 2. doplněné vydání. Ostrava: MONTANEX a.s., 2000. 221 s. ISBN 80-7225-041-8.

KINCL, M., KOLKOVÁ In: KINCL, M., KRPEŠ V. *Základy fyziologie rostlin*. 1984. 2. doplněné vydání. Ostrava: MONTANEX a.s., 2000. 221 s. ISBN 80-7225-041-8.

KOVANDA, M. *Adenophora* Fisch-zvonovec. In: SLAVÍK, B. [ed.] *Květena České republiky* 6., Praha, Academia, 2000, 748 s. ISBN 80-200-0306-1.

KOUTSOVOULOU, K., DAWS, M.I., THANOS, CA. *Campanulaceae*: a family with small seeds that require light for germination. *Ann Bot*. 2014, 113(1), s. 135-43. doi: 10.1093/aob/mct250. Epub 2013 Nov 14. PMID: 24232382; PMCID: PMC3864721.

KOZELKOVÁ, Z., PRAUSOVÁ, R., TOMÁŠOVÁ, Z., ŠAFÁŘOVÁ, L. Differences in *Potamogeton praelongus* Morphology and Habitats in Europe. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2021, 90. DOI:10.5586/asbp.901

KROC, K. J. *Laboratorní kontrola v zemědělském provozu*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 1961, s. 330.

KUBÁT, K., HROUDA, L., CHRTEL, J. jun., KAPLAN, Z., KIRSCHNER, J., [eds.] *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia, 2002, s. 927, ISBN 80-200-0836-5.

LAMMERS, T. G. *Campanulaceae*. In K. Kubitzki, J. W. Kadereit, and C. Jeffrey [eds.], *The families and genera of vascular plants*, Springer-Verlag, Berlin, Germany. 2007 a, s. 26–56.

LEUBNER-METZGER, G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta*. 2001. 213 (6), s. 758-763.

LIU, U., BREMAN, E., COSSU, T. A., KENNEY, S. The conservation value of germplasm stored at the Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK. *Biodiversity Conserv* 2018, 27, 1347–1386. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1497-y>

- LLOYD, F. E. The mechanism of water tight door of the Utricularia trap. *Plant Physiology*. 1929, 4 (1), s. 87-102.
- LLOYD, F. E. *The Carnivorous Plants*. New Yourk: Chronica Botanica Company, 1942, s. 352.
- LU. J., WANG. H. B., PAN. M., XIA. J., XING. W., LIU. G. H. Using sediment seed banks and historical vegetation change data to develop restoration criteria for a eutrophic lake in China. *Ecol. Eng.* 2012, 39, s. 95-103. doi: 10.1016/j.ecoleng.2011.11.006
- MADSEN, J. D., CHAMBERS, P.A., JAMES, W. F., KOCH, E. W., WESTLAKE, D. F. The interaction between water movement, sediment dynamics and submersed macrophytes. *Hydrobiologia*. 2001. 444 (1), s. 71-84. <https://doi.org/10.1023/A:1017520800568>
- MANOLE, A., BANCIU, C., INDREICA, A., Genetic diversity within a newly identified population of *Adenophora liliifolia* (L.) A.D.C. in Romania: Implications for conservation. *Annals of Forest Research*. 2015, 58 (2), s. 47-355.
- MARTIN, A. C. The comperative internal morphology of seed. *American Midlant Naturalist*. 1946, 36, s. 513-660.
- MATILLA, A. J. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research*. 2000, 10(2), s. 111-126.
- McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Scienceand Technology*, 1999, 27, s. 17-237.
- MOK, D. W., MOK M. C. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2001. 89, s. 89–118.
- MÜLLER, J.V., BERG, C., DÉTRAZ-MÉROZ, J. et al. The Alpine Seed Conservation and Research Network – a new initiative to conserve valuable plant species in the European Alps. *Journal of Mountain Science*. 2017, 14 (4), s. 806-810, doi:10.1007/s11629-016-4313-8.
- NIKOLAEVA, M. G. *Physiology of deep dormancy in seeds*. Moscow: Alademija Nauk, 1969.

NIKOLAEVA, M. G. Factors controlling the seeds dormancy pattern. In: KAHN, A. A. ed. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1977, s. 51-74.

NIKOLAEVA, M. G. Research opinion. On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research*. 2004, 14(4), s. 315-320.

OBROUCHEVE, N. V., SIKEVICH, I. A., LITYAGINA, S. V., NOVIKOVA, G. V. Water Relations on Germinating Seed. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017, 64 (4), s. 625-633. ISSN 1021-4437.

O'DONNELL, K. a SHARROCK, S. The contribution of botanic gardens to ex situ conservation through seed banking. *Plant Diversity*. 2017, 39 (6), s. 373-378. doi: 10.1016/j.pld.2017.11.005.

PAGNUSSAT, G., ALANDETE-SAEZ, M., BOWMAN, J., SUNDARESAN, V. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*. 2009, 324. s. 1684-1689.

PALEG, L. Physiological effects of gibberellic acid: I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiology*, 1960a, 35 (3), s. 293-299. doi: 10.1104/pp.35.3.293.

PALEG, L. Physiological effects of gibberellic acid: II. On starch hydrolyzing enzymes of barley endosperm. *Plant Physiology*. 1960b, 35 (6), s. 902-906. doi: 10.1104/pp.35.6.902

PALEG, L. Physiological effects of gibberellic acid. III. Observations on its mode of action on barley endosperm. *Plant Physiology*. 1961, 36 (6), s. 829-837. DOI: 10.1104/pp.36.6.829

PENCE, V. C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. *Seed Science Technology*. 1991, 19, s. 235-251.

PERÉZ-GARCÍA, F., GONZÁLEZ-BENITO, M. E., GOMÉZ-CAMPO C. High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of *Brassicaceae* after 40 years of storage. *Seed Science and Technology*. 2007, 35 (1), s. 43-53. DOI:10.15258/sst.2007.35.1.13

PERÉZ-GARCÍA, F. Effect of cryopreservation, gibberellic acid and mechanical scarification on the seed germination of eight endemic species from the Canary Islands. *Seed Science and Technology*. 2008, 36 (1), s. 237-242. DOI:10.15258/sst.2008.36.1.29

POTT, R. Die Pflanzengesellschaften Deutschlands. 2nd edition. Eugen Ulmer, Stuttgart. 1995. s. 622.

PRAUSOVÁ, R., ADAMEC, L. *Záchranný program pro rdest dlouholistý Potamogeton praelongus*. Hradec Králové: Olga Čermáková, grafické reklamní studio, 2010, s. 24. ISBN 978-80-86703-37-4.

PRAUSOVÁ, R., ADAMEC, L., KITNER, M., PÁSEK, K., DVOŘÁK V. Záchrana rdestu dlouholistého v České republice. *Příroda*, Praha, 2014, 32, s. 17-37.

PRAUSOVÁ, R., ČEPELOVÁ, B., VACULNÁ L., RYBKA V. Záchranný program pro zvonovec liliolistý (*Adenophora liliifolia*). [online] [2017c]. [cit. 2023-16-01]. Dostupné z WWW: MGSII-17 Zvonovec liliolistý (nature.cz)

PRAUSOVÁ, R., JANOVÁ, J. Současný stav výskytu rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*) v České republice. *Příroda*, Praha, 2010, 27, s. 155-168.

PRAUSOVÁ, R., JANOVÁ, J., ŠAFÁŘOVÁ, L. Testing achene germination of *Potamogeton praelongus* Wulfen. *Central European Journal of Biology*. 2013, 8 (1), s. 78-86.

PRAUSOVÁ, R., SIKOROVÁ, P., ŠAFÁŘOVÁ, L., Generative reproduction of long stalked pondweed (*Potamogeton praelongus* Wulfen) in the laboratory. *Aquatic Botany*. 2014, 120(1), s. 268–274. DOI:10.1016/j.aquabot.2014.09.005

PRAUSOVÁ, R., ZLÁMALOVÁ, T., BÁLKOVÁ, L., ŠAFÁŘOVÁ, L.: Changes in biodiversity in the national nature reserve of the Bohdanečský pond from the explorations by the Hadač brothers in the 1950's to the present times. *Journal of Landscape Ecology*. 2015, 8(3), 6-22. DOI:10.1515/jlcol-2015-0011

PRAUSOVÁ, R. Máme v České republice místo pro rdest dlouholistý? *Živa*. 2016 a, 1, s. 18-22. ISSN 0044-4812.

PRAUSOVÁ, R., MAREČKOVÁ, KAPLER, A., MAJESKÝ, L., FARKAS, T., INDREICA, A., ŠAFÁŘOVÁ, L. *Adenophora liliofolia*: Condition of its populations in central Europe. *Acta Biologica Craciviensia. Series Botanica*. 2016b, 58 (2), s. 83-105.

PRAUSOVÁ, R., MAREČKOVÁ, L. Proč je zvonovec liliolistý chráněný soustavou Natura 2000? *Živa*. 2017b. 4, s. 159.

PRAUSOVÁ, R. [ed.]. *Rdest dlouholistý (Potamogeton praelongus Wulfen)*. Gaudeamus, Univerzita Hradec Králové, 2017a, s. 223. ISBN: 978-80-7435-669-8.

PRAUSOVÁ, R., RYBKA, V., ČEPELOVÁ, B., MAREČKOVÁ, L. *Záchranný program pro zvonovec liliolistý*. Depon. in AOPK ČR, Praha, 2018, 67 s.

PRAUSOVÁ, R., HOLZBAUEROVA H., ŠPRINGROVÁ, I., JARÁ, N., CROSS, A.T., ADAMEC, L. Seed germination ecology of common bladderwort (*Utricularia vulgaris* L.). *Aquatic Botany*. 2022, 182. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2022.103545>

PRAŠKOVÁ, L. *Mikrobiologické riziko vnitřní kontaminace semen určených ke konzumaci po naklíčení*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Lékařská fakulta Masarykova univerzita. Vedoucí bakalářské práce doc. MUDr. Jan Šimůnek, CSc. 100 s.

PRITCHARD, H., NADARAJAN, J. Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds, In: B. REED [ed.]. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer: New Yourk. 2008, ISBN 978-0-387-72276-4.

PROCHÁZKA, S. [eds.] *Fyziologie rostlin*. 1. vydání, dotisk. Praha: Academia, 2003. 484 s. ISBN 80-200-05862.

PSOTA, V., ŠEBÁNEK J. *Za tajemstvím růstu rostlin*. Návody k experimentů. Praha: Scientia, 1999, 176 s. ISBN 80-7183-093-3.

PUCHALSKI, J. International programmes for seed presevation of European native plants. *Bulletin of Botanical Gardens*. 2004, 13, s. 11-18.

PUCHALSKI, J., KAPLER, A., NIEMCZYK, M., WALEROWSKI, P., KRYŹEWSKI, A., NOWAK, P. Long-term seed cryopreservation of rare and endangered Polish Ponto-Panonian species. Opole Scientific Society, Nature Journal. 2014, 47, s. 1-8.

- RAO, N. K. Plant Genetic Resource: Advances in Conservation and Use through Biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. 2004, 3 (2), s. 136-145. DOI:10.5897/AJB2004.000-2025
- REIFENRATH, K., THEISEN, I., SCHNITZLER, J., POREMBSKI, S., BARTHLOTT, W. Trap architecture in carnivorous *Utricularia (Lentibulariaceae)*. *Flora*. 2006, 201(8), s. 597-605. DOI:10.1016/j.flora.2005.12.004
- RICCIARDI, A., SIMBERLOFF, D. Assisted colonization is not a viable conservation strategy. *Trends in Ecology and Evolution*. 2009, 24 (5), s.248-253. doi: 10.1016/j.tree.2008.12.006
- ROBERTS, T. R. *Metabolic Pathways of Agromechanicals: Herbicides and plant growth regulators*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1998, s. 851. ISBN 0-84504-4949.
- ROLEČEK, J. Vegetation of subcontinental oak forests in Central and Eastern Europe. Brno. Dizertační práce. Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita. Vedoucí práce doc. RNDr. Milan Chytrý, Ph.D. 2007. 192. s.
- ROOS, E. E. Long-Term Seed Storage, The National Plant Germplasm System of the United States. *Plant Breeding Rev.* 1989, 7, s. 129-158.
- RYBKA, V., RYBKOVÁ V., HRADILÍK, Z. Rostliny ve svitu evropských hvězd. *Sagittara*, Olomouc, Praha, 2004. s. 88. ISBN 80-239-4177-1.
- RYDLO, J. *Potamogeton prealongus* Wulfen. In KUBÁT, K.; (red.): *Floristický kurs ČSBN v Děčíně 1984*. Severočes. Přír., Suppl. 1986 a, 1, s. 70-73.
- RYDLO, J. Rdest dlouholistý. *Nika*. 1986 b, 7, s. 16-17.
- RYDLO, J. Vodní makrofyta Orlice v letech 1984 a 1994. *Muzeum a současnost, ser. Natur*. 1995, 9, s. 149-156.
- RYDLO, J. Vodní makrofyta ve stojatých vodách na Poděbradsku a Nymbursku. *Muz. Součas., ser. natur*. 2005, 21, s. 11-134.

- RYDLO, J. Vodní flóra v nivě Orlice. *Muzeum a součastnost, ser. Natur*. 2008, Roztoky, 23, s. 62-126.
- SAND-JENSEN, K., RIIS, T., VESTERGAARD, O., LARSEN, S. E. Macrophyte decline in Danish lakes and streams over the past 100 years. *Journal of Ecology*. 2000, 88 (6), s. 1030–1040. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00519.x>
- SARATH, G., BETHKE, P. C. JONES, R.; BAIRD L. M., HOU, G. C., MITCHELL, R. B. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta*. 2006, 6, s. 1154-1164. ISBN 0032-0935.
- SARWAR, M. R., KREMER, J. Determination of bacterially derived auxins using a micro plate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 1995. 147, s. 282-285.
- SASAKI, K., KIM M-H., KANO, Y., SEO M. KAMYIA, Y., IMAI, R. *Arabidopsis* cold shock domain protein 2 influences ABA acumulation in seed and negative regulates germination. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. 456, s. 380-384.
- SCHUBERT, R., HILBIG, W., KLOTZ, S., *Bestimmungsbuch der Pflanzengesellschaften Mittel-und Nordostdeutschlands*. Jena- Stuttgart. 1995. ISBN 3-8274-0915-2.
- SCHÜT, W. Ecology of seed dormancy and germination in sedges (*Carex*). Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. *Elsevier Science*. 2000, 3(1), s. 67-89. ISSN 1433-8319.
- SCHOPFER, P., PLACHÝ, C., Control of seed germination by abscisic acid II. Effect on embryo water uptake in *Brassica napus L.* *Plant Physiology*. 1984, 76 (1), s. 155- 160.
- SCULTHORPE, C. D. *Biology of aquatic vascular plants*. London: Edward Arnold, 1967, s. 610.
- SEO, M. HANADA, A., KUWAHARA, A. ENDO, A. OKAMOTO, M. YAMAUCHI, Y (eds) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant Journal*. 2006, 48(3), s. 354-366. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02881.x
- SEREGIN, A. P. A grid-based database on vascular plant distribution in Vladimir Oblast, Russia. Lomonosov Moscow State University. Occurrence dataset. 2017.

SHINOMURA, T., Phytochorme regulation of seed germination. *Journal of Plant Research*. 1997, 110 (1), s. 151-161. ISSN 0918-9440.

SILVA, S.R., GIBSON R., ADAMEC, L, DOMÍNGUEZ Y., MIRANDA, V. F.O. Molecular phylogeny of bladderworts: A wide approach of *Utricularia* (Lentibulariaceae) species relationships based on six plastidial and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*. 2018, 118, s. 244-264. doi: 10.1016/j.ympev.2017.10.010.

SIKOROVÁ, P. *Studium generativní reprodukce rdestu dlouholistého (Potamogeton preaelongus Wulfen)* Hradec Králové, 2011. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 70 s.

SIKOROVÁ, P. *Faktory ovlivňující klíčivost rdestu dlouholistého (Potamogeton preaelongus Wulfen)* Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Romana Prausová, Ph.D. 90 s.

SLAVÍK, B. [ed]. *Květena ČR, díl 6*. Praha: Academia. 2000, ISBN 80-200-0306-1.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic Conservation, In: KARTHA, K. K. *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, Boca Raton: CRC Press, 1985, s. 200-226.

STOKES, P. A physiological study of embryo development in *Heracleum sphondylium* L. I. The effect of temperature on embryo development. *Annals of Botany*. 1952a, 16 s. 441-447.

STOKES, P. A physiological study of embryo development in *Heracleum sphondylium* L. II. The effect of temperature on after-ripening. *Annals of Botany*. 1952b, 16. s. 571-576.

STOKES, P. A physiological study of embryo development in *Heracleum sphondylium* L. II. The effect of temperature on metabolism. *Annals of Botany*. 1953, 65. s. 157-169.

STUDNIČKA, M. *Masožravé rostliny*. Praha: Academia. 1984, s. 152.

- STUDNIČKA, M. Masožravé rostliny rodu *Utricularia* IV. vodní druhy. *Živa*. 1990, 4, s. 157-162. ISSN 0044-4812.
- SVOBODA, P., FALTUS, M. Nové poznatky z genetiky a šlechtění plno hospodářských rostlin. Vliv předkultivace na kryokonzervaci chmele. *Sborník ze 14. vědecké konference, Piešťany*: VÚRV, 2007. ISBN 80-86555-71-2.
- ŠEBÁNEK, J. *Klíčení semen*. In: Procházka, S. *Fyziologie rostlin*. 2. vydání. Praha: Academia. 1998. s. 348-357.
- ŠUMBEROVÁ, K. Vegetace volně plovoucích vodních rostlin. In CHYTRÝ, M. [eds.] *Vegetace České republiky 3, Vodní a mokřadní vegetace*. Praha: Academia, 2011, s. 43-99. ISSN 978-80-200-1918-9.
- TACIK, T., Rodzina: Campanulaceae, Dzwonkowate. *Flora polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych*, 1971. s. 50–99.
- TAYLOR, P. *The Genus Utricularia - A Taxonomic Monograph*. London: HMSO, 1989. s. 724. ISBN 0-11-250046-63.
- TEALE, W. D., PAPONOV, I. A., PALME, K. Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006, 7, s. 847–859.
- TELTSCHEROVÁ, L., HEJNÝ, S. The germination of some Potamogeton species from South-Bohemia fishponds. *Folia Geobot. Phytotax*. 1973, 8 (3), s. 231-239.
- THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. In: STACEY, G., KEEN, N. T. (eds). *Plant-Microbe Interactions*, Chapman and Hall, London, 1996, s. 187–235.
- TINVENDALE, N. D., COHEN, J. D. Analytical History of Auxin. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34 (4), s. 708-722.
- TRIVERDI, C., Banking the UK's Seeds. Royal Botanic Garden Kew. [online] [2017]. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z WWW Banking the UK's Seeds | Kew

TRUHLÁŘOVÁ, H. *Zvonovec liliolity (Adenophora liliopholia) na Jaroměřsku*. Hradec Králové, 2008. Bakalářská práce. Pedagogická fakulta Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Romana Prausová Ph.D. 58 s.

TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, s. 298-310. ISSN 0175-7598.

TŮMA, J., TŮMOVÁ, L. *Fyziologie rostlin*. První vydání. Hradec Králové: Gaudeamus, 1998. 266 s. ISBN 80-7041-542-8.

UOTILA, P. *Potamogeton* L. s.17-28. In: DAVIS, P.H, MILL, R. R, TANK, K. (eds). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 8. Edinburgh University Press, Edinburgh,1984, s. 632.

VACULNÁ, L., MAJESKÝ, L., ALI, T., SERIGIN, A. P., PRAUSOVÁ, R., KAPLER, A., IAKUSHENKO, D., THINES, M., KITNERO, M. Genetic structure of endangered species *Adenophora liliifolia* and footprints of postglacial recolonisation in Central Europe. *Conserv Genet*. 2021, 22, 1069–1084. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01396-5>

VALENTI, P., MASPOLI, G., MARAZZI, B. L'ultima *Adenophora* (Campanulaceae) svizzera: situazione attuale e prospettive. *Bollettino Della Societa Ticinese Di Scienze Naturali*. 2018, 106, s. 53–62. ISSN 0379-1254

VLEESHOUWERS, L. M., BOUWMEESTER, H. J., KARSSSEN, C. M. Redefining seed dormancy: An attempt to integrate physiology and acology. *Journal of Ecology*. 1995, 83, s. 1031-1037.

VÓGEL, M., Ecological studies on water plants of 14 sites around Kangerlussuaq, southern West Greenland, with special regard to *Potamogeton*. Hamburg. 2002, s. 42.

VORONKOVA, N., KHOLINA, A. Conservation of endemic species from the Russian Far East using seed cryopreservation. *Biology Bulletin*, 2010, 37(5), s. 496-501.

WALTERS, C., WHEELER, L., STANWOOD, P. C. Longevity of crygenically stored seeds. *Cryobiology*, 2004, 48 (3), s. 229-244. doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.01.007.

WANG. L., HAN. Y., Yu H, FAN. S., LIU. C. Submerged Vegetation and Water Quality Degeneration From Serious Flooding in Liangzi Lake, China. *Frontier Plant Science*. 2019. doi: 10.3389/fpls.2019.01504

WATKINS, J. T., CANTLIFFE, D. J., Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* et low temperatures. *Plant Physiology*. 1983, 72, s. 146-150.

WOODWARD, A. W., BARTEL B. Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany*. 2005, 95 (5), s. 707–735.

XIA, W., ZHU, B., ZHANG, S., LIU, H., QU, X., LIU, Y., RUDSTAN, L. G., ANDERSON, J. T., NI, L., CHEN, Y. Climate, hydrology, and human disturbance drive long-term (1988–2018) macrophyte patterns in water diversion lakes. *Journal of Environmental Management*. 2022, 319. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115726>

Zdroje obrázků

Obr. 3 Rozšíření *U. vulgaris* v České republice zaznamenané z roku 2000–2016 (převzato z Kaplan 2017)

obrázek dostupný z:

WWW. [cit. 2017-12-11] https://www.researchgate.net/figure/Distribution-of-Utricularia-vulgaris-in-the-Czech-Republic-P-at-least-one-record-in_fig83_321680041.

Obr. 4 Oblast rozšíření bublinatky obecné (*Utricularia vulgaris*) na Zemi (Linnaeus, 2017)

obrázek dostupný z: WWW. [cit. 2017-12-11] <http://linnaeus.nrm.se/flora/di/lentibularia/utric/utrivulv.jpg>.

Obr. 6 Historické a současné rozšíření rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*), (převzato z: Prausová 2016)

obrázek dostupný z: WWW. [cit. 2018-13-03] Obr. 7 Oblast rozšíření rdestu dlouholistého (*P. praelongus*) na Zemi (Linnaeus,2018)

obrázek dostupný z:

WWW. [cit. 2018-04- 04]

<http://linnaeus.nrm.se/flora/mono/potamogetona/potam/potaprav.jpg>.

Obr. 9 Součastné rozšíření zvonovce liliolitého v ČR (převzato z: AOPK ČR 2013)

obrázek dostupný z:

WWW. [cit. 2018-10-04]

<http://www.zachranneprogramy.cz/zvonovec-liliolisty/rozsireni/>.

Obr. 10 Areál rozšíření zvonovce liliolistého (převzato z: AOPK ČR 2011).<http://ziva.avcr.cz/2016-1/mame-v-ceske-republice-misto-pro-rdest-dlouholisty.html>

6 Seznam příloh

6.1 Seznam obrázků

Obr. 1 Schéma klíčení na semeni ječmene (<i>Hordeum vulgare</i>).....	22
Obr. 2 Detail pasti.....	30
Obr. 3 Rozšíření <i>U. vulgaris</i> v České republice.....	31
Obr. 4 Oblast rozšíření bublinatky obecné (<i>Utricularia vulgaris</i>) na Zemi.....	32
Obr. 5 Semena bublinatky obecné (<i>Utricularia vulgaris</i>).....	34
Obr. 6 Historické a současné rozšíření rdestu dlouholistého (<i>Potamogeton praelongus</i>).....	37
Obr. 7 Oblast rozšíření rdestu dlouholistého (<i>P. praelongus</i>) na Zemi	38
Obr. 8 Vzhled nažky rdestu dlouholistého (<i>P. praelongus</i>).....	40
Obr. 9 Současné rozšíření zvonovce liliolistého v ČR.....	41
Obr. 10 Areál rozšíření zvonovce liliolistého	42
Obr. 11 Semeno zvonovce liliolistého (<i>Adenophora liliifolia</i>).....	44
Obr. 12 Způsob kultivace semen ve variantách světlo a tma	48
Obr. 13 Způsob uložení semen ke kultivaci (<i>P. praelongus</i>).....	50
Obr. 14 Způsob uložení semen ke kultivaci (<i>Adenophora liliifolia</i>).....	51
Obr. 15 Výsledky klíčivosti testů bublinatky obecné ve variantě světlo, tma	54
Obr. 16 Testy klíčivosti rdestu dlouholistého různého staří semen	56
Obr. 17 Varianty testů klíčivosti zvonovce liliolistého v půdním substrátu a Petriho miskách	58

6.2 Seznam tabulek

Tab. 1 Varianty testu tma a světla: <i>Utricularia vulgaris</i>	49
Tab. 2 Varianty testu: <i>Potamogeton praelongus</i>	50
Tab. 3 Varianty testu: <i>Adenophora liliifolia</i>	52
Tab. 4 Výsledky testů klíčivosti bublinatka obecná (<i>Utricularia vulgaris</i>).....	53-54
Tab. 5 Vícecestná analýza testů klíčivosti (Multiple-Term Test Section) bublinatky obecné, průkazné testy jsou zbarveny žlutě.....	55
Tab. 6 Působení faktorů v testech klíčivosti (Single -Term Test Section) bublinatky obecné, průkazné testy jsou zbarveny žlutě, A – klíčení, B – způsob uložení před testem, C – ošetření před testem, D – světlo/tma, E – kultivační roztok I nebo III), průkazný test při testování jednotlivých faktorů – tučně, nejlepší testované modely – červeně).....	55
Tab. 7 Výsledky testů klíčivosti rdestu dlouholistého (<i>Potamogeton praelongus</i>)	56
Tab. 8 Působení faktorů v testech klíčivosti (Single -Term Test Section) rdestu dlouholistého, průkazné testy jsou zbarveny žlutě, A – klíčení, B – způsob uložení před testem, C – ošetření před testem)	57
Tab. 9 Výsledky testů klíčivosti zvonovce liliolistého (<i>Adenophora liliifolia</i>).....	57
Tab. 10 Působení faktorů v testech klíčivosti (Single -Term Test Section) zvonovce liliolistého, průkazné testy jsou zbarveny žlutě, A – klíčení, B – způsob uložení před testem, C – ošetření před testem).....	58



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquabotSeed germination ecology of common bladderwort (*Utricularia vulgaris* L.)Romana Prausová^a, Helena Holzbauerová^a, Ivona Špringrová^a, Nicol Jará^a, Lenka Šafářová^b, Adam T. Cross^{c,d,*}, Lubomír Adamec^e^a Department of Biology, Faculty of Science, University of Hradec Králové, CZ-500 02 Hradec Králové, Czech Republic^b East Bohemian Museum in Pardubice, Zámek 2, CZ-530 02 Pardubice, Czech Republic^c School of Molecular and Life Sciences, Curtin University, Kent Street, Bentley, WA 6102, Australia^d EcoHealth Network, 1330 Beacon St, Suite 355a, Brookline, MA 02446, United States^e Institute of Botany of the Czech Academy of Sciences, Dukelská 135, CZ-379 01 Třeboň, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Lentibulariaceae
Seed storage
Seed dormancy alleviation
Warm stratification
Ethylene
Morphophysiological dormancy

ABSTRACT

Generative reproduction of the carnivorous aquatic plant *Utricularia vulgaris* (Lentibulariaceae) from seeds may be a critical process in the recovery of natural populations following temporary drying of habitat, and in the colonisation of new potential sites through dispersal of seeds by water birds. However, little is presently known about the seed ecology and germination biology of this species. We tested the germination response of seeds under various temperature and seed storage regimes, to examine the processes required for seed dormancy alleviation and the effects of different germination solution and temperature on germination probability. Seeds likely possess non-deep simple morphophysiological dormancy alleviated by warm stratification. Highest germination success was recorded for warm-stratified seeds and seeds exposed to ethylene. Seeds were photophilous, with germination more successful at 21 °C than at 25 °C and greatest in slightly alkaline (pH 8) germination solution containing KHCO₃, CaCl₂ and MgSO₄ mimicking the mesotrophic humic waters in which the species naturally occurs. In the alkaline solution, 97 % of seeds rose to the surface prior to germination. In natural habitats, this effect may facilitate seedlings reaching the warmer and irradiated water surface. As seed germination success appears linked to light availability, water chemistry, and seed position in the water column, careful management and ecological restoration of remnant habitats harbouring this species may need to ensure positive conservation outcomes.

1. Introduction

Utricularia vulgaris L. (Lentibulariaceae) is a perennial, rootless, free-floating aquatic carnivorous plant producing linear, poorly-branched shoots ranging from 0.5 to 2.5 m long (Taylor, 1989). The species is widespread in Europe, North Africa and Asia (Taylor, 1989), where it occurs in shallow standing, mesotrophic to mildly eutrophic humic waters (e.g., lakes, backwater pools and oxbows, fishponds, dam reservoirs, fens) that are rich in carbonates and calcium and neutral to slightly alkaline (Koshiba, 1992a,b, 2004; Fleischmann and Schlauer, 2014). The filamentous, pinnately-divided leaves are arranged in leaf nodes and bear abundant bladder-shaped traps of foliar origin 1–5 mm long (Taylor, 1989; Fleischmann and Schlauer, 2014). Over the growing season, *U. vulgaris* rapidly reproduces vegetatively through frequent branching of shoots, and single shoots overwinter as turions (winter buds) similar to other closely-related *Utricularia* species (Adamec,

2018a).

Utricularia vulgaris forms an emergent racemose inflorescence with golden-yellow flowers on an erect flower scape 30–50 cm high under favourable conditions from June to September. Although flowers can be pollinated by dipterans (Plachno et al., 2018), *U. vulgaris* is one of three European *Utricularia* (with *U. intermedia* and *U. minor*) capable of self-pollination to form fertile fruit and viable seeds (Taylor, 1989; Fleischmann and Schlauer, 2014). Mature fruit are globose, 3–5 mm long, open by an upper lid and contain about 50–150 small (mean seed mass is 0.052 mg; L. Adamec, unpubl. data), cubic to prismatic, 4–6 angled, polygonal brown-black seeds (Figs. 1 and 2; Taylor, 1989; Cross et al., 2018a). Seeds usually ripen in fruit above the surface of the water, and upon dehiscence are released into the water column where they sink to bottom sediments (L. Adamec, unpublished) and form a persistent sediment seed bank (Gálová and Hájková, 2014).

At least some species of *Utricularia* produce seeds with an

* Corresponding author at: School of Molecular and Life Sciences, Curtin University, Kent Street, Bentley, WA 6102, Australia.
E-mail address: adam.cross@curtin.edu.au (A.T. Cross).

<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2022.103545>

Received 13 March 2022; Received in revised form 8 June 2022; Accepted 30 June 2022

Available online 5 July 2022

0304-3770/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

undifferentiated dwarf embryo occupying most of the seed volume, and the seeds of these species possess either morphological dormancy (MD) or morphophysiological dormancy (MPD; Cross et al., 2018a). Seeds with underdeveloped embryos require a period of embryo development prior to germination, and seeds with MPD also require a physiological cue following this period of embryo maturation (Baskin and Baskin, 2014; Kildisheva et al., 2020). Seeds of *Utricularia* spp. that germinate shortly after dehiscence (within several weeks) likely have MD (Swamy, Ram, H.Y., 1969), while those requiring additional environmental cues before germinating likely have MPD (Cross et al., 2018a).

Little is known about the seed germination ecology of *U. vulgaris* and other aquatic *Utricularia* species. Seed dormancy is apparently alleviated by cold stratification in *Utricularia* from temperate regions (Baskin and Baskin, 2014), and it has been reported that seed germination in *U. vulgaris* can be stimulated by exposure to ethylene (Cross et al., 2018a). The seeds of numerous aquatic plants exhibit a germination response to ethylene exposure, including the aquatic carnivorous plant *Aldrovanda vesiculosa* (Droseraceae) which commonly co-occurs, often sympatrically, with *U. vulgaris* throughout its European natural range and produces seeds with physiological dormancy (PD; Cross, 2012; Cross et al., 2016). Many species producing small seeds are photophilous (light-requiring for germination; Baskin and Baskin, 2014), and it appears likely that the seeds of *U. vulgaris* are light-requiring as they commonly rise to the surface prior to germinating (L. Adamec, unpublished). In a field experiment, 95–97 % of *U. vulgaris* seeds enclosed in nylon bags persisted through an 11-month period shallowly buried in or exposed on the surface of sediment in a shallow sand-pit pool, with ca. 41 % germinating in outdoor culture over the following 15 months (Adamec, 2018b). A similar germination response was reported for *U. vulgaris* seeds aged in wetland sediments for 70–100 years in South Moravia (Czech Republic) after exposure to light (Gálová and Hájková, 2014), indicating that the seeds of *U. vulgaris* are long-lived under suitable conditions and likely form large and long-lived sediment seed banks. However, the type of seed dormancy in *U. vulgaris*, as well as the specific environmental cues responsible for alleviating seed dormancy and stimulating seed germination, remain unresolved.

The aim of this study was to elucidate the seed germination ecology of *U. vulgaris*, by (i) examining the germination response of *U. vulgaris* seeds to different pH of germination media, to variable temperature and light regimes, to ethylene as a germination stimulus, and to dormancy alleviation treatments including cold and warm stratification; (ii) determining whether seeds displayed orthodox seed storage behaviour, by testing seed germination of freshly-collected and dry-stored seeds and following sub-zero temperature storage.

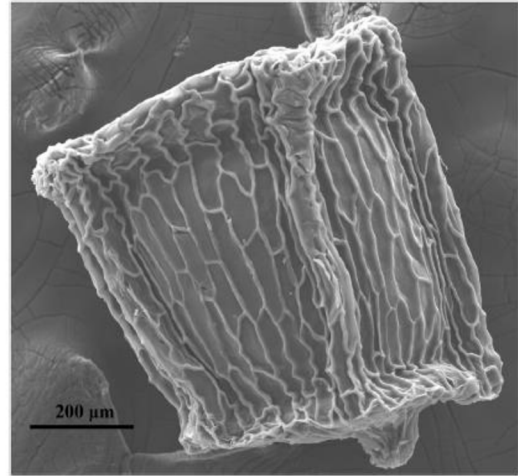


Fig. 2. Seed surface of *Utricularia vulgaris* in an electronic microscope. Photo by M. Vojta (HITACHI FlexSEM 1000).

2. Materials and methods

2.1. Seed collection and storage

Mature seeds (dark brown and dehiscent) of *U. vulgaris* L. were collected from plants in outdoor cultivation at the Institute of Botany of the Czech Academy of Sciences at Třeboň, Czech Republic (Sirová et al., 2003). Cultivated plants originate from South Moravia, Czech Republic (ca. 250 km far away; Gálová and Hájková, 2014). Experiments were undertaken using seeds collected in 2018 and 2020. Germination experiments were conducted on freshly collected seeds where possible, but where seed storage prior to experimental use was necessary seeds were stored depending upon treatment under either dry (at 22–24 °C and relative humidity of 55–60 %) or wet (in tap water at 4 ± 1 °C) conditions at the University of Hradec Králové, Czech Republic.

To provide representative temperature ranges experienced by seeds of *U. vulgaris* under natural conditions, temperature data loggers (Minikin Tie, EMS Brno, Czech Republic) were established at two natural *U. vulgaris* populations in Central and East Bohemia. The first, Hrabanovská černava fen (50° 12' 53.7"N, 14° 49' 41.2"E, 187 m above sea level), comprises a central pool harbouring numerous macrophytes surrounded by wetlands, fens and *Molinia caerulea* meadows. The second, Bohdanecský fishpond (50° 5' 48.6"N, 15° 40' 56.1"E, 212 m above

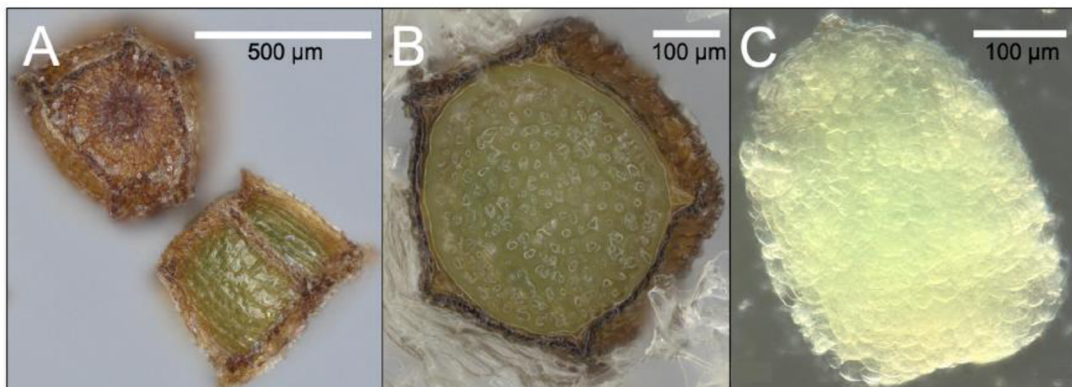


Fig. 1. Representative seeds of *Utricularia vulgaris* showing prismatic shape and multiple faces (A), longitudinally sectioned seed illustrating testa thickness and central position of the embryo within the endosperm (B), and extracted embryo (C). White bars indicate scale. Photos by R. Prausová.

sea level), comprises a complex of fens and *M. caerulea* meadows surrounding the Matka and Bohdanečský fishponds. Average water depth during the growing season where *U. vulgaris* occurs is 50–60 cm at Hrabanovská černava fen (electrical conductivity 440–1790 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and pH 7.1–8.8) and 50–70 cm at Bohdanečský fishpond (electrical conductivity 150–440 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and pH 6.5–9.7; Jará and Prausová, 2021). Data loggers were installed in the water column among *U. vulgaris* individuals at 30 cm depth at both sites, and measured water temperature at 1 h intervals from January to December 2019.

2.2. Seed morphometric measurements

Before undertaking germination tests, each seed collection was examined at 10 \times magnification using a stereomicroscope (SZP 1102–T ZOOM s, Arsenal, Doubravice, Czech Republic), and underdeveloped, damaged or immature seeds were removed. Seeds from each collection were photo-documented using a 3-D microscope (KEYENCE VHX-500, Keyence Corporation, Osaka, Japan; Fig. 1). To determine seed size, 100 seeds from each collection were randomly selected. Seed width and height of them were measured at 100 \times magnification. As the seeds of *U. vulgaris* are cubic to prismatic (Cross et al., 2018b), their width was measured on the upper and lower parts of seeds, and the number of surfaces on each seed was also counted. Additionally, a scanning electron microscope HITACHI FlexSEM 1000 (Hitachi, Japan) was used to show their shape and surface features (Fig. 2).

2.3. Germination biology

To determine the seed germination response of *U. vulgaris* to temperature, light, pH and germination stimulants, seeds were surface sterilised in a 2.5 % NaClO solution for two minutes before being rinsed thoroughly with sterile distilled water and placed in 20 mL sealed plastic tubes containing 15 mL of either acidic (Solution 1), neutral (Solution 2) or alkaline (Solution 3) germination media solution. Solution 1 comprised 0.5 mM KCl with 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgSO₄ adjusted to pH 5.5, Solution 2 comprised 0.5 mM KHCO₃ with 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgSO₄ adjusted to 6, and Solution 3 comprised 0.5 mM KHCO₃ with 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgSO₄ adjusted to pH 8, (all pH adjustments made using HCl). Five replicates of 20 seeds for each treatment were placed in incubators at a constant temperature of either 21 or 25 °C (± 1 °C), on a 15-h photoperiod (fluorescent light intensity 2–2.5 klx equal to 35–40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation) or in constant darkness (prepared in darkness and placed in light-exclusion boxes). Germination (protrusion of the first filamentous “cotyledonoids” from the seed, *sensu* Cross et al., 2016) was scored weekly for six weeks in light treatments, but only once after six weeks in dark treatments. Germinating seeds (Fig. S1) were transferred to a 4 L container containing water collected from natural sites of *U. vulgaris* with dry litter of *Carex* spp. for further cultivation.

To investigate the potential role of ethylene as a germination stimulus, additional replicates of 20 seeds were prepared as previously described but imbibed in distilled water for 24 h and exposed to an 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ethephon (Sigma Aldrich, Germany) for a further 24 h prior to being placed in 20 mL sealed plastic tubes containing 15 mL of either acidic, neutral or alkaline germination media solution. Ethephon is known to gradually release ethylene gas in solution, and ethylene is a known a germination stimulant for many aquatic and wetland plant species (e.g., Baskin and Baskin, 2014; Cross et al., 2014, 2015, 2018b; Prausová et al., 2014). Seeds were then incubated at 21 or 25 °C on a 15-h photoperiod or in constant darkness for six weeks as previously described. Germination was scored weekly for six weeks in light treatments, but only once after six weeks in dark treatments.

To investigate the impact of cold and warm stratification on the alleviation of seed dormancy in *U. vulgaris*, additional replicates of 20 seeds were prepared as described previously for acidic, neutral or alkaline germination media solution treatments. For stratification, seeds

were incubated in sealed plastic tubes at 4 ± 1 °C (cold stratification) or at 30 ± 1 °C (warm stratification) in constant darkness for four weeks, then incubated at 21 °C for a further two weeks on a 15-h photoperiod or in constant darkness. *Utricularia vulgaris* seeds regularly experience sub-zero temperatures in the sediment seed bank throughout the species natural range in winter. Additionally, to investigate the impact of sub-zero stratification temperatures on the alleviation of seed dormancy, additional replicates of dry seeds were incubated in sealed plastic tubes at -18 ± 1 °C (frost stratification) in constant darkness for four weeks, or at -18 ± 1 °C for two weeks and then at 4 ± 1 °C for two weeks (varying stratification), and then incubated at 21 °C for further two weeks on a 15-h photoperiod or in constant darkness. Germination at 21 °C and 25 °C was scored weekly for six weeks in light treatments, but only once after six weeks in dark treatments.

2.4. Deep-frost seed storage

To provide an assessment of seed response to deep-frost seed storage, the germination response of seeds after three or fifteen months of dry storage at 4 ± 1 °C, was tested after either eight or sixteen weeks of dry storage in liquid nitrogen at -80 °C. Following dry storage, seeds were placed in 20 mL sealed plastic tubes containing 15 mL of either acidic or neutral germination media solution and incubated at 21 °C on a 15-h photoperiod or in constant darkness for six weeks as previously described. Germination was scored weekly for six weeks in light treatments, but only once after six weeks in dark treatments.

2.5. Seed rising before germination

The relationship between seed rising (buoyancy) and seed germination was investigated for 600 seeds using Solution 3 in 20 mL test tubes. Three treatments each comprising five replicates of 20 seeds were established, including (1) controls; (2) light regime (15 h light/ 9 h dark) or continuous darkness; (3) temperature of seed germination of 21 ± 1 or 8 ± 1 °C. Germination was scored weekly for six weeks in all replicates, with seeds scored either as germinating without rising (e.g., remaining on the bottom), germinating after rising (i.e., germinated on the solution surface), rising without germinating, or neither germinating nor rising.

2.6. Statistical analysis

Binary logistic regression (SPSS Statistics 28; IBM, United States) was used to assess the main and interaction effects of light exposure, incubation temperature, treatment (ethylene exposure, stratification treatments and seed storage treatments) on seed germination success. Three-way ANOVA with Tukey post-hoc tests were used to determine the main and interaction effects of temperature, light exposure and seeds rising on the number of seeds from each replicate that germinated. All statistical tests were conducted using the 95 % confidence interval (CI), with significance determined by $P < 0.05$. Data are presented as mean \pm SE of the raw data, unless stated otherwise.

3. Results

3.1. Monitoring of temperatures from natural sites

Daily water temperature trends were similar for the two *U. vulgaris* populations over the January to December period monitored (Fig. 3), with daily water temperature at 30 cm depth ranging from 2.3 to 22.9 °C at Hrabanovská černava fen and -2.6 – 26.5 °C at Bohdanečský fishpond. Water remained cold (<10 °C) from October following seed production and dehiscence through to March–April, before warming markedly (18 – 28 °C) prior to observation of natural seed germination in June–July.

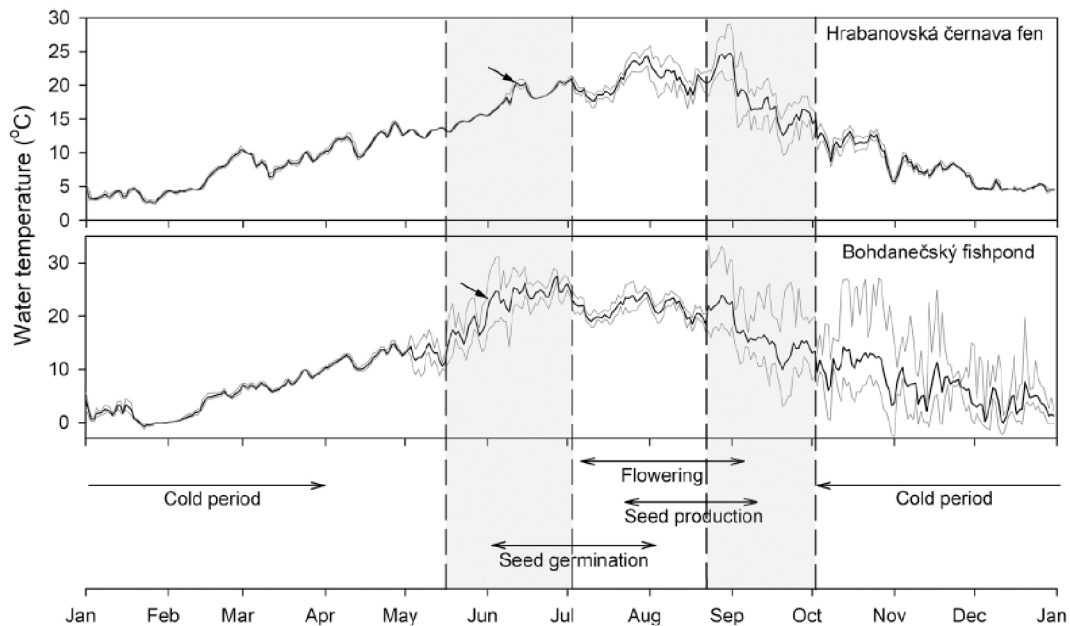


Fig. 3. Average daily temperature (bold lines) and daily minimum and maximum temperature (grey lines) at two *Utricularia vulgaris* populations in East Bohemia, Czech Republic, with key ecological periods relating to seed-based reproduction in *U. vulgaris* annotated (L. Adamec and R. Prausová, unpubl.). Grey columns indicate periods where temperatures may be conducive to warm stratification of seeds in certain areas of *U. vulgaris* habitat, while arrows indicate the point at which average daily water temperature reached 21°C for the first time over the seasonal monitoring period.

3.2. Seed morphometric characteristics

Measured *U. vulgaris* seeds were prismatic (Fig. 2), mostly pentagonal with seven faces (86 % of studied seeds), occasionally with eight (13 %) or, rarely, six faces (1 %) (Figs. 1 and 2). Mature, dehiscent seeds were dark grey to dark green-black in colour, the width of the upper part ranged from 0.4 to 1.9 mm (mean 0.9 ± 0.3 mm), of the bottom part from 0.6 to 2.0 mm (mean 1.2 ± 0.3 mm) and the height from 0.3 to 1.7 mm (mean 1.0 ± 0.22 mm). The embryo appears undifferentiated at seed maturity (Fig. 1).

3.3. Germination biology

Germination success for freshly-collected, untreated control seeds ranged from 0.21 to 0.39 at 21 °C and 0.07–0.31 at 25 °C on a 15-h photoperiod, and 0.09–0.29 at 21 °C and 0.04–0.27 at 25 °C in constant darkness (Table S1, Fig. 4). Numerous interaction effects on germination success were present among light exposure, incubation temperature, storage method and treatment, with strongest effects from the interaction of Light exposure \times Incubation temperature, Germination solution \times Incubation temperature, Germination solution \times Treatment, and Light exposure \times Treatment (Table 1).

Germination success across all treatments was greater for seeds incubated on a 15-h photoperiod than in constant darkness (Fig. 4), and this effect was more pronounced for seeds incubated at 25 °C (0.14 ± 0.005 in light and 0.05 ± 0.003 in darkness) than for seeds at 21 °C (0.19 ± 0.006 in light, 0.09 ± 0.004 in darkness). Similarly, the suppression of germination at 25 °C resulted in comparable germination success across all treatments among the three germination solutions (0.11 ± 0.005 at pH 5.5, 0.08 ± 0.005 at pH 6, 0.10 ± 0.005 at pH 8), while germination was notably more successful at pH 8 (0.17 ± 0.007) and pH 6 (0.16 ± 0.007) compared with pH 5.5 (0.10 ± 0.005) when seeds were incubated at 21 °C.

Compared with controls, germination success was markedly

increased following warm stratification and exposure to ethylene (up to 0.75–0.90; Fig. 4). This effect was most pronounced for wet-stored seeds in pH 8 and pH 6 solutions incubated on a 15-h photoperiod. Although the effects were partly suppressed at both temperatures in dry-stored seeds and markedly in seeds incubated in constant darkness, both warm stratification and ethylene exposure did still generally improve germination success under these conditions compared with controls. Cold stratification, varying stratification, and frost stratification had no consistent or pronounced effect on germination success except for the pH 6 solution (Fig. 4). The storage of *U. vulgaris* seeds in liquid nitrogen did not appear detrimental to germination success, and, indeed, seeds incubated at 21 °C and pH 8 following liquid nitrogen storage germinated much better than in control treatments in both light and constant darkness (0.6–0.7; Fig. 4).

3.4. Relationship between seed rising and germination

Of 461 seeds that germinated, 448 (97 %) rose to the surface of alkaline solution prior to germination while only 13 (3 %) germinated without rising. The effect of seeds rising on germination numbers was highly significant ($F(2108) = 275.1$, $P < 0.001$). Neither temperature ($F(1108) = 2.974$, $P = 0.087$), nor light exposure ($F(1108) = 275.05$, $P = 0.052$) significantly influenced germination in this trial (Fig. 5), and no significant interaction effects were evident.

4. Discussion

Utricularia vulgaris produces minute (<1 mm) endospermous seeds with a small, undifferentiated embryo (Fig. 1). Seed germination appears photophilous (or, at least, germination was markedly suppressed in seeds incubated under constant darkness), and was most successful in an alkaline (pH 8) germination solution reflective of the water chemistry of sites harbouring natural *U. vulgaris* populations (noting that the pH 6 solution may be more reflective of the pH of the sediment). The seeds of

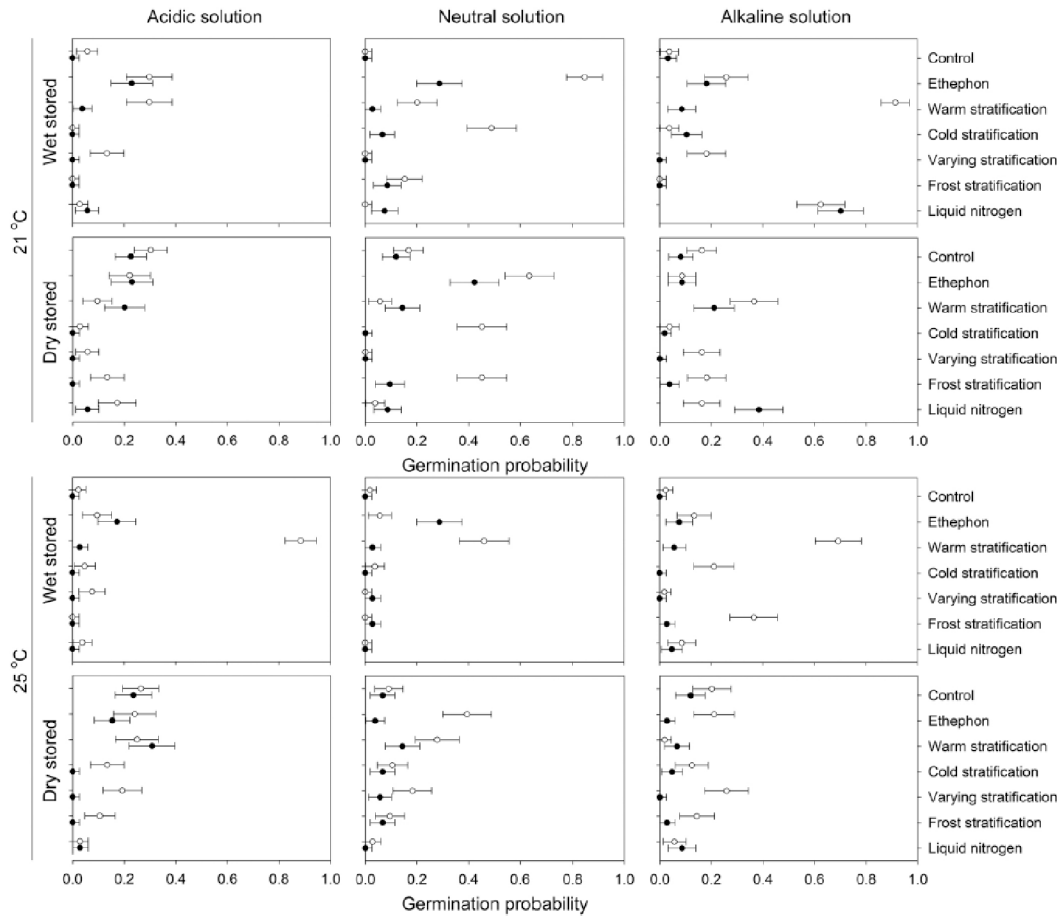


Fig. 4. Germination probability $\pm 95\%$ CI of *Utricularia vulgaris* seeds incubated in light (open symbols) or constant darkness (closed symbols) under different temperature conditions in acidic, neutral, or alkaline germination media following either wet or dry storage and in response to different stratification, germination stimulation and storage treatments.

Table 1
Statistical outputs (interaction effects) from testing the influence of experimental factors (light exposure, incubation temperature, germination solution, treatment, and storage method) on *Utricularia vulgaris* seed germination success. B indicates unstandardised regression weight (i.e., slope of the regression line).

Factor	B	χ^2	P
Light exposure \times Incubation temperature	0.129	157.5	<0.001
Germination solution \times Incubation temperature	-0.126	95.8	<0.001
Germination solution \times Treatment	-0.132	88.3	<0.001
Light exposure \times Treatment	-0.210	70.7	<0.001
Light exposure \times Storage method	-0.540	27.0	<0.001
Incubation temperature \times Storage method	0.066	20.1	<0.001
Incubation temperature \times Treatment	-0.014	11.1	0.001
Germination solution \times Storage method	0.199	10.5	0.001
Treatment \times Storage method	-0.077	10.0	0.002

U. vulgaris appear to possess non-deep simple morphophysiological dormancy (MPD) on the basis of an undifferentiated embryo at seed maturity and an apparent physiological component to dormancy as

indicated by a strong positive effect of warm stratification for light-exposed seeds. Exposure to ethylene appears to act as a germination stimulant in *U. vulgaris*, as has been reported for other, often co-occurring aquatic carnivorous plants including *Aldrovanda vesiculosa* (Cross et al., 2012, 2016). Indeed, a stimulatory effect of ethylene on seed germination has also been reported for other carnivorous plants from wet habitats, such as species of *Byblis* (Cross et al., 2018a).

Data from the present study suggests the free-floating aquatic *U. vulgaris* produces photophilous seeds, with light exposure a requirement for seed germination. Seeds of aquatic plants typically require light for seed germination to occur (Frankland et al., 1987; Baskin et Baskin, 1998). This prevents seeds from germinating underwater in conditions unsuitable for further growth of seedlings; for example, in anaerobic environments in muddy substrate or at low temperatures (Bibbey, 1948; Holm, 1972; Baskin et Baskin, 1998). In seed-rising experiments, the vast majority of seeds surfaced prior to germination, though a few also germinated without rising (Fig. 5). This same trend has also been commonly observed for *U. vulgaris* seeds germinating outdoors in containers under experimental culture (L. Adamec, unpublished). We

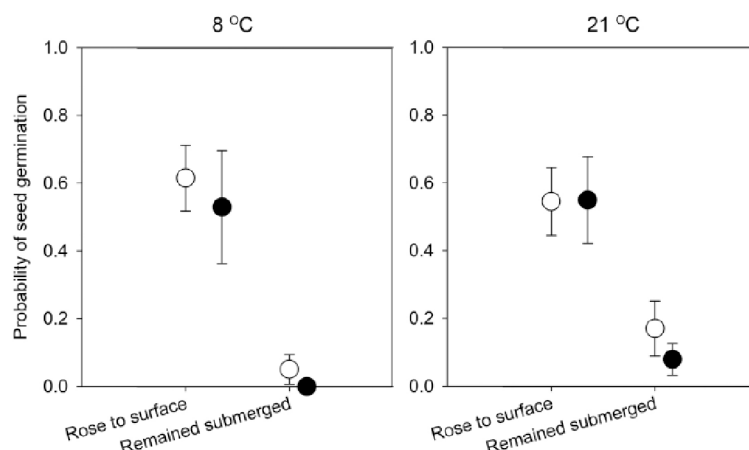


Fig. 5. Germination probability $\pm 95\%$ CI of *Utricularia vulgaris* seeds between those that rose to the surface of germination media and those that remained fully submerged, incubated in light (open symbols) or constant darkness (closed symbols) under different temperature conditions.

therefore suggest that the rising of seeds to the water surface is (broadly) a necessary precursor to seed germination, likely facilitating light exposure. The rising of *U. vulgaris* seeds in this manner is probably an important ecological process, as otherwise the tiny seedlings (Fig. S1) may become entangled at depth and at low temperatures, potentially in low-light conditions and under anoxia. To the best of our knowledge, this process has not been described and published so far. It seems likely that gas accumulation (possibly CO_2) inside or within the seed testa influencing seed buoyancy, in a similar fashion proposed for *A. vesiculosa* (Cross, 2012), may facilitate this process; future studies should examine this interesting and potentially important ecological process in greater detail.

During experiments, greatest seed germination in *U. vulgaris* occurred in a germination solution of pH 8. This treatment most closely replicated the pH conditions of the natural habitat at Hrabanovská černava fen, where water pH during the growing season ranges from pH 7–8. This may be expected given *U. vulgaris* most commonly occurs in pH-neutral water in fens (Kaplan et al., 2017), and suggests the conditions required for seed germination in the aquatic *U. vulgaris* may differ from those of terrestrial *Utricularia* species. For example, Kondo (1971) employed four different pH solutions (pH 4.5, 4.7, 5.1, 7.2) in germinating the seeds of terrestrial *U. juncea* and *U. cornuta*, and reported highest germination probability for both species at pH 4.5–5.1.

Seed dormancy with a physiological component must be alleviated by exposure to periods of suitable environmental conditions (Baskin and Baskin, 1998). Previous authors have proposed that seed dormancy in *U. vulgaris*, at least in temperate regions, is likely alleviated by a period of cold stratification over the cold winter months prior to germination in spring, as indicated by high germination success reported for seeds incubated under indicative spring temperatures following cold stratification (Baskin et Baskin, 1998). Similar germination responses following cold stratification have been reported for species co-occurring with *U. vulgaris*, including *Potamogeton praelongus* (Prausová et al., 2013, 2014). However, data from the present study suggests that cold stratification was poorly effective at alleviating seed dormancy in *U. vulgaris*, and that MPD was instead alleviated by a period of warm stratification (Fig. 4). Response to warm stratification in this manner may facilitate seed germination in shallow wetland pools where the water column warms in temperature more rapidly following the onset of spring conditions. However, such shallow wetland habitats may experience more pronounced drying during late spring and early summer without

consistent rainfall; for example, complete desiccation of *U. vulgaris* habitat was observed in 2018 at both study sites in the Czech Republic (Bohdanečský fishpond and Hrabanovská černava fen). As warm stratification occurs when seeds are exposed to periods of warm, moist storage (Kaplan et al., 2017), it is also possible that seed dormancy is alleviated in late summer as water levels begin rising but ambient temperatures remain warm. Further study is required to determine the seasonal timing of warm stratification in *U. vulgaris*.

It is plausible that the apparent stimulatory effect of ethylene on seed germination in *U. vulgaris* represents a bet hedging mechanism, with biogenic ethylene release from sediment signaling suitable sediment moisture levels for seed germination as has been reported for other shallow, highly ephemeral wetlands (Cross et al., 2014). The light requirement can be somewhat alleviated by ethylene exposure. According to our results, an impact of Ethephon releasing ethylene stimulates seed germination in both the light and dark conditions (the most successful variant of all tests in dark conditions, germination rate 17.3 %). The presence of ethylene probably compensates the lack of light during germination. Positive effect of Ethephon on germination was proved for other aquatic plants, for example up to 5 % *Potamogeton praelongus* seeds germinated with Ethephon (Prausová et al., 2014). Germination rate was high (>75 %) in ethylene-exposed seeds incubated at 21 °C, on a 15-h photoperiod in alkaline germination solution. This is almost an identical mechanism to what was found for *Aldrovanda vesiculosa* (Cross et al., 2016), and very similar to other carnivorous plants from wet habitats such as *Eyblis* (Cross et al., 2018a).

It appears that *U. vulgaris* produces a long-lived sediment seed bank, as seeds discovered in 70–100-year-old sediments in South Moravia have been subsequently germinated under laboratory experiments (Gálová and Hájková, 2014). This may imply that *U. vulgaris* seeds cycle in and out of dormancy in response to seasonal conditions, as has been shown for other species producing seeds with a physiological component to dormancy (e.g., Merritt et al., 2007). *Utricularia vulgaris* seeds were stored under both dry and wet conditions before seed germination experiments, and we observed no decline in germinability following even extended periods of dry storage prior to germination experiments. Baskin and Baskin (1998) report that the seeds of some aquatic plants both exit and re-enter dormancy in response to seasonal drought, and Arts and van der Heijden (1990) confirmed that drought or warm stratification for 28 days at about 20/8 °C temperature alleviated or broken seed dormancy in *Littorella uniflora* (Plantaginaceae). Muenschel (1936)

reported that air-dried *Potamogeton* seeds stored dry for 2–3 months did not germinate, while Hay et al. (2008) suggested that *Potamogeton* seeds survived drying and germinated upon subsequent rewetting. Seeds of *P. praelongus* survived drying and germinated after waterlogging (Prazusová et al., 2013, 2014). Warm stratification or dry storage broke seed dormancy of mediterranean species *P. schweinfurthii* (Spence et al., 1971). Seeds of *Aldrovanda vesiculosa* also appear tolerant of desiccation and may survive across seasons in a persistent sediment seed bank (Cross et al., 2015). Future studies should examine the persistence of the seed bank in *U. vulgaris* and other aquatic carnivorous plants, and the degree to which seeds are tolerant of extended periods of seasonal desiccation.

The storage of seeds at low temperature is a possible method to prevent physiological changes within seeds responsible for seed dormancy alleviation or the stimulation of germination (Baskin and Baskin, 1998). Cryopreservation at ultra-low temperatures (liquid nitrogen, -196°C) allows for the long-term storage of plant materials, including the seeds of at least some species of carnivorous plants (North et al., 2021). Standard cryopreservation techniques are based on dehydration caused by freezing (Engelmann, 2004), and data from the present study suggests that storage of *U. vulgaris* seeds in liquid nitrogen was not deleterious to seed germination success. Indeed, *U. vulgaris* seeds stored at -18°C or in liquid nitrogen at -80°C germinated more readily than seeds stored for a comparable period at room temperature (Fig. 4). Future studies should examine the efficacy and viability of cryopreservation as an *ex situ* conservation tool in *U. vulgaris* and other aquatic carnivorous plants in greater detail.

5. Conclusions

Apparent morphophysiological seed dormancy in *U. vulgaris* appears alleviated by warm stratification, with seed germination stimulated by exposure to ethylene gas under suitable temperature and moisture conditions. However, the success of seed germination appears linked to light availability, water chemistry, and, thus, seed position in the water column, which indicates careful management of remnant habitats harbouring this species may be needed to ensure positive conservation outcomes. As *U. vulgaris* has been assessed as Critically Endangered in the Czech Republic (Grulich, 2017), threatened primarily by successional degradation of sites, eutrophication, grounding of pools and ponds, and hydrological changes (Šumberová, 2011), management activities should focus on the maintenance of hydrological regimes, water quality and control of invasive macrophytes. Management measures should maintain the shallow, open, mesotrophic habitats enabling vigorous growth of *U. vulgaris* (Kaplan et al., 2017), ensuring that conditions are optimal for both asexual and seed-based reproduction.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgement

This study was financed by the Ministry of Education of the Czech Republic (Czech Republic) by a Specific research project No. 2115/2019, 2117/2020 and a Long-term research development project No. RVO 67905939 (both to LA). ATC was supported by the Research Fellowship in Restoration Ecology jointly funded by the EcoHealth Network and Curtin University.

References

- Adamec, L., 2018a. Ecophysiology of aquatic carnivorous plants. In: Ellison, A.M., Adamec, L. (Eds.), *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, Oxford, U.K., pp. 256–269.
- Adamec, L., 2018b. Germination rate and longevity of seeds of *Aldrovanda vesiculosa* and *Utricularia vulgaris*. *Carniv. Plant Newsl.* 47, 64–69.
- Arts, G.H.P., van der Heijden, R.A.J.M., 1990. Germination ecology of *Littorella uniflora* (L.) Aschers. *Aquat. Bot.* 37, 139–151.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, USA.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*, 2nd edition. Academic Press, San Diego, USA.
- Bibbey, R.O., 1948. Physiological studies of weed seed germination. *Plant Physiol.* 23, 467–484.
- Cross, A.T., 2012. *Aldrovanda: The Waterwheel Plant*. Redfern Natural History Productions. Dorset, UK.
- Cross, A.T., Cawthray, G.R., Merritt, D.J., Turner, S.R., Renton, M., Dixon, K.W., 2014. Biogenic ethylene promotes seedling emergence from the sediment seed bank in an ephemeral tropical rock pool habitat. *Plant Soil* 360, 73–87.
- Cross, A.T., Turner, S.R., Renton, M., Baskin, J., Dixon, K.W., Merritt, D.J., 2015. Seed dormancy and persistent sediment seed banks of ephemeral freshwater rock pools in the Australian Monsoon Tropics. *Ann. Bot.* 115, 847–859.
- Cross, A.T., Adamec, L., Turner, S.R., Dixon, K.W., Merritt, D.J., 2016. Seed reproductive biology of the rare aquatic carnivorous plant *Aldrovanda vesiculosa* L. (Droseraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 180, 515–529.
- Cross, A.T., Davis, A., Fleischmann, A., Horner, J.D., Jürgens, A., Merritt, D.J., Murza, G. L., Turner, S.R., 2018a. Reproductive biology and prey-pollinator conflicts. In: Ellison, A.M., Adamec, L. (Eds.), *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford University Press, Oxford, U.K., pp. 294–313.
- Cross, A.T., Barrett, M.D., Turner, S.R., Dixon, K.W., Merritt, D.J., 2018b. Seed-dormancy depth is partitioned more strongly among habitats than among species in tropical ephemerals. *Aust. J. Bot.* 66, 230–242.
- Engelmann, F., 2004. Plant cryopreservation: progress and prospect. *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 40, 427–433.
- Fleischmann, A., Schlauer, J., 2014. Die Gattung *Utricularia* in Bayern. *Ber. Bayer. Bot. Ges.* 94, 65–90.
- Frankland, B., Bartley, M.R., Spence, D.H., 1967. Germination under water. In: Crawford, R.M.M. (Ed.), *Plant Life in Aquatic and Amphibious Habitats*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., pp. 167–177.
- Gálová, A., Hájková, P., 2014. [*Utricularia vulgaris* in Hodonínská Důbrava.] In Czech. *Zprávy České Bot. Spol.* 49, 261–271.
- Grulich, V., 2017. [The Red List of vascular plants of the Czech Republic.] In Czech. In: Grulich, V., Chobot, K. (Eds.), *Červený seznam ohrožených druhů České republiky, 35. Cvatná rostliny, Fytroda (Prague)*, pp. 75–132.
- Hay, F., Probert, R., Dawson, M., 2008. Laboratory germination of seeds from 10 British species of *Potamogeton*. *Aquat. Bot.* 88, 353–357.
- Holm, R.E., 1972. Volatile metabolites controlling germination in buried weed seeds. *Plant Physiol.* 50, 293–297.
- Jará, N., Prazusová, R., 2021. [The comparison of two wetland sites in the Elbe region as regards to their suitability for survival of mixotrophic species of *Utricularia vulgaris* and *Utricularia australis*.] In Czech. *Vc. Sb. přír. – Práce a Stud.* 27, 49–75.
- Distributions of vascular plants in the Czech Republic. In: Kaplan, Z., Danhelka, J., Šumberová, K., Chrtěk, J., Rotreklová, O. (Eds.), 2017, Part 5. *Predlia*, 69, pp. 333–439.
- Kildisheva, O.A., Dixon, K.W., Silveira, F.A.O., Chapman, T., Di Sacco, A., Mondoni, A., Turner, S.R., Cross, A.T., 2020. Dormancy and germination: making every seed count in restoration. *Restor. Ecol.* 28, S256–S265.
- Kondo, K., 1971. Germination and developmental morphology of seeds in *Utricularia cornuta* Michx. and *Utricularia juncea* Vahl. *Rhodora* 73, 541–547.
- Kochiba, P., 1992a. Studies on the ecology of *Utricularia vulgaris* L. I: ecological differentiation of *Utricularia vulgaris* L. population affected by chemical factors of the habitat. *Ekol. Pol.* 40 (2), 147–192.
- Kochiba, P., 1992b. Studies on the ecology of *Utricularia vulgaris* L. II: physical, chemical, and biotic factors and the growth of *Utricularia vulgaris* L. in cultures in vitro. *Ekol. Pol.* 40 (2), 193–212.
- Kochiba, P., 2004. Chemical properties and similarity of habitats of *Utricularia* species in Lower Silesia, Poland. *Acta Soc. Bot. Pol.* 74 (4), 335–341.
- Merritt, D.J., Turner, S.R., Clarke, S., Dixon, K.W., 2007. Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Aust. J. Bot.* 55, 336–344.
- Muenschner, W.C., 1936. The germination of seeds of *Potamogeton*. *Ann. Bot.* 50, 805–821.
- North, T., Chong, C., Cross, A.T., van der Walt, K., Ballesteros, D., 2021. Special collections and under-represented taxa in Australasian *ex situ* conservation programs, 2021. In: Martyn Yenson, A.J., Oford, C.A., Meagher, P.F., Auld, T., Bush, D., Coates, D.J., Commander, L.E., Guja, L.K., Norton, S.L., Makinson, R.O., Stanley, R., Walsh, N., Wrigley, D., Broadhurst, L. (Eds.), *Plant Germplasm Conservation in Australia: Strategies and Guidelines for Developing, Managing and Utilising Ex Situ Collections*. Third edition. Australian Network for Plant Conservation, Canberra, pp. 403–439, 2021.
- Plachno, B.J., Stpiczynska, M., Adamec, L., Miranda, V.F.O., Świątek, P., 2016. Nectar trichome structure of aquatic bladderworts from the section *Utricularia* (Lentibulariaceae) with observation of flower visitors and pollinators. *Protoplasmata* 255, 1053–1064.
- Prazusová, R., Janová, J., Šafářová, L., 2013. Testing achene germination of *Potamogeton praelongus* Wulfen. *Cent. Eur. J. Biol.* 8, 78–86.