

studijní směr: *zemědělské inženýrství*

studijní obor: *všeobecné zemědělství*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**BIOLOGIE A EKOLOGIE OHROŽENÉHO DRUHU *LIPARIS
LOESELII* (L.) RICH. Z ČELEDI *ORCHIDACEAE* A
GENERATIVNÍ MNOŽENÍ METODOU *IN VITRO***

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Balounová, OH.D.

Konzultant:

RNDr. Hana Vejsadová, CSc.

RNDr. Štěpán Husák, CSc.

Autor:

Jana Pavlová

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, dne 15.9.2007

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Haně Vejsadové, CSc. za vedení a poskytnutí zázemí, k realizaci mé diplomové práce, neboť veškeré pokusy probíhaly na oddělení Biodiverzity krajiny VÚKOZ Průhonice. Poděkování za spolupráci patří také Ing. Zuzaně Balounové, Ph.D. a dále RNDr. Štěpánovi Husákovi, CSc., za poskytnutí studijních materiálů, ale i pro mě hodnotných připomínek a poznatků, týkajících se této práce.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Jana PAVLOVÁ**

Studijní program: 4101 T Zemědělské inženýrství

Studijní obor: VOZK

Název tématu: Biologie a ekologie ohroženého druhu *Liparis loeselii* (L.)Rich. z čeledi *Orchidaceae* a generativní množení metodou *in vitro*

Zásady pro vypracování:

(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

1. Fytcenologické snímkování vegetace na lokalitách s výskytem *Liparis loeselii*
2. Biometrické a fenologické sledování druhu na trvalých plochách
3. Měření základních parametrů prostředí na sledovaných lokalitách
4. Asymbiotický výsev na živná média, inokulace mykorrhizními symbionty *in vitro*
5. Ekologická a fytcenologická charakteristika populací, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků laboratorní kultivace

Rozsah grafických prací: 10

Rozsah průvodní zprávy: 40

Seznam odborné literatury:

NOVÁK F. J.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin.–Academia Praha, 1990.
PIERIK R. L. M.: *In Vitro* Culture of Higher Plants. –Martinus Nijhoff Publishers Boston, 1987.

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

VLAŠÍNOVÁ H., JEŽEK Z., PROCHÁZKA S.: Vliv huminových látek na rychlost růstu orchidejí v podmínkách *in vitro*. –Rostlinná výroba 40: 747–754, 1994.

VEJSADOVÁ H.: Cultivation of *Liparis loeselii* under *in vitro* conditions. –In: TAKÁCS, A. A. (ed.) Velencei-tavi úszólápok védelme. (Nature conservation of the floating marshes at Lake Velence). Kutatási jelentés, mscr. Budapest. p. 54-58., 1999

Vedoucí diplomové práce: Ing. Zuzana Balounová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Hana Vejsadová, CSc.

RNDr. Štěpán Husák, CSc.

Datum zadání diplomové práce: březen 2004

Termín odevzdání diplomové práce: Září 2007

doc. RNDr. Miroslav Tetter, Csc.
Vedoucí katedry

Doc. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc
Děkan

V Českých Budějovicích dne 5. 3. 2004

Obsah

Kapitola	strana
1. Úvod	8
2. Literární přehled	10
2.1 Charakteristika čeledi <i>Orchidaceae</i>	10
2.1.1 Morfologie.....	11
2.1.2 Životní cyklus orchidejí.....	12
2.1.3 Mykorrhiza.....	13
2.2 Charakteristika modelového druhu.....	15
2.2.1 Morfologie.....	15
2.2.2 Ontogeneze.....	15
2.2.3 Ekologie.....	16
2.2.4 Ohrožení a management.....	17
2.2.5 Ochrana druhů <i>Liparis loeselii</i> a <i>Dactylorhiza bohemica</i>	17
2.2.6 Rozšíření modelového druhu.....	19
2.2.6.1 Celkové rozšíření.....	19
2.2.6.2 Rozšíření v ČR.....	19
2.2.6.2.1 Ruda.....	20
2.2.6.2.2 Jestřebsko – Dokesko.....	22
2.2.6.2.3 Podtrosecká údolí.....	25
2.2.6.2.4 Byšičky.....	26
2.2.6.2.5 Březová - Kalábová	26
2.2.6.3 Management na jednotlivých lokalitách.....	28
2.3 Generativní množení.....	29
2.3.1 Metoda <i>in vitro</i>	29
2.3.1.1 Asymbiotický výsev semen.....	29
2.3.1.2 Výsevni a kultivační živná média.....	29
2.3.1.2.1 Anorganické látky.....	30
2.3.1.2.2 Organické látky.....	30
2.3.1.2.3 Aktivní uhlí.....	32
2.3.1.2.4 Ztužovací agens.....	32
2.3.1.3 Ošetření semen před výsevem.....	33
2.4.1.4 Skladování a životnost druhu <i>Liparis loeselii</i>	35
2.4.1.5 Podmínky kultivace.....	35
3. Materiál a metody	36
3.1 Metoda <i>in vitro</i>	36
3.1.1 Rostlinný materiál.....	36
3.1.2 Uchování semen.....	36
3.1.3 Příprava živného média.....	36
3.1.4 Metoda asymbiotického výsevu semen na agarové médium.....	37
3.1.5 Kultivace rostlin.....	38
3.1.6 Pokus č. 1 Povrchová sterilizace semen.....	38
3.1.7 Pokus č. 2 Vliv růstových regulátorů na růst nadzemní části a kořene.....	38
3.1.8 Pokus č. 3 Vliv dusíku na růst semenáčů.....	38
3.1.9 Statistické hodnocení.....	39

3.2	Metody pro fytoocenologické snímkování a analýzu vody NPR Ruda.....	40
3.2.1	Fytoocenologické snímkování vegetace NPR Ruda.....	40
3.2.2	Chemická analýza vody NPR Ruda.....	40
3.2.2.1	Stanovení N-NH ₄	40
3.2.2.2	Stanovení N-NO ₂ ⁻	40
3.2.2.3	Stanovení NO ₃ ⁻	41
3.2.2.4	Stanovení TPN (Total Nitrogen).....	41
3.2.2.5	Stanovení TKN (organic kjeldhal nitrogen).....	41
3.2.2.6	Stanovení PO ₄ ³⁻	41
3.2.2.7	Stanovení TPP (Total Phosphor).....	41
3.2.2.8	Stanovení TP (Total Phosphor).....	42
3.2.2.9	Stanovení Cl ⁻	42
4.	Výsledky	43
4.1	Výsledky – <i>in vitro</i> metody.....	43
4.1.1	Vliv sterilizačních látek na tvorbu protokormů u vybraných druhů.....	43
4.1.2	Vliv růstových regulátorů na růst nadzemních částí a kořene.....	44
4.1.2.1	Vliv auxinů.....	44
4.1.2.2	Vliv cytokininů.....	45
4.1.2.3	Vliv auxinů a cytokininů.....	45
4.1.3	Vliv dusíku na růst semenáčů.....	47
4.2	Výsledky - Fytoocenologické snímkování.....	49
4.3	Výsledky - Chemická analýza vody.....	49
5.	Diskuze.....	50
6.	Závěr.....	53
7.	Seznam literatury.....	55
8.	Přílohy.....	60
8.1	Mapy.....	61
8.2	Fotografie.....	67
8.3	Fytoocenologické snímky.....	76

1. ÚVOD

Nevšední tvary všech možných barev a velikostí, rouškou tajemství zahalené zákony vývoje, exotika vzácnosti i pomyslná či skutečná výsostnost orchidejí, to vše upoutávalo lidské vědomí od nepaměti.

Tropy s bujnou vegetací, s nimiž jsou v podvědomí většiny lidí orchideje spojovány, nejsou však výsostným domovem více než dvaceti tisíc druhů, jimiž se pyšní tato nejobsáhlejší čeleď světové flóry. I když největší množství rozmanitých zástupců vstavačovitých je vázáno skutečně na tropické a subtropické oblasti Země, rostou mnohé i v chladnějších pásmech, jak ve vysokých horách, tak dokonce na dalekém severu a jen Antarktida a některá rozsáhlá pouštní území nehostí ani jediný druh. Austrálie, Jižní i Severní Amerika, stejně tak jako Asie a Evropa, mají své orchideje.

Je zcela paradoxní, že tak rozsáhlý soubor rozmanitých rostlin, jakým jsou orchideje, neposkytuje prakticky žádný hospodářský užitek. Nijaká vzácná či krásná dřeva, důležitá léčiva, suroviny pro technické zpracování, prostě nic, jen mimořádnou krásu, půvab, neobvyklost, příjemnou vůni či odporné pachy, neuvěřitelně velké nebo i pro specialistu až příliš miniaturní květy, tedy jen zdroje potěšení pro milovníka a námět ke zkoumání pro vážnějšího zájemce. (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983).

Vstavačovité (*Orchidaceae*) jsou jednou z největších čeledí semenných rostlin. Jak již bylo řečeno, zahrnují asi 20 000 druhů, z toho 50 druhů se vyskytuje v České republice. Středoevropské druhy orchidejí patří vzhledem ke složité ekologii a biologii mezi nejohroženější. Navíc se v tomto období střetávají s populační explozí, což je doprovázeno úbytkem nebo dokonce ztrátou některých druhů. V současné době jsou stávající lokality degradovány vlivem kyselých depozic a eutrofizací. Některé druhy, např. *Dactylorhiza incarnata* nebo *Liparis loeselii*, jsou ohroženy rozrůstajícími se porosty rákosu, což je problém lokalit na Českolipsku. (HONCŮ ET JÓŽA, 1995). Do poloviny 20. století zmizelo nenávratně z květeny naší republiky 7 druhů. Několik dalších je na pokraji vyhynutí. (VEJSDOVÁ ET AL., 1998). V současné době stojí terestrické orchideje v popředí ochrannářských zájmů v souvislosti s druhovou ochranou a jejich citlivou reakcí na rušivé vlivy vnějších faktorů na původní prostředí.

Naštěstí se v posledních letech situace zlepšila v důsledku realizací tzv. „Záchranných programů“, řízených Správami CHKO a Agenturou ochrany přírody a krajiny (AOPK), které zahrnují také vhodný management stávajících lokalit.

Dalším prostředkem aktivní ochrany, směřujícím k obnově populací ohrožených taxonů, je metoda jejich kultivace technikou *in vitro* a zpětného vysazení (repatriace) na původní lokality v návaznosti na znalost ekologie a biologie ohroženého taxonu. Technika *in vitro* je často jedinou možnou metodou množení terestrických orchidejí. Kultivace se nejčastěji provádí generativní metodou v asymbiotických podmínkách, při které zdroj uhlíkatých látek v živném médiu nahrazuje přítomnost houbového endofyta.

Původně mělo být cílem této práce vypracování standardní metody generativního *in vitro* množení pro druh terestrické orchideje *Liparis loeselii* (L.), který je u nás kriticky ohrožený a navíc je ohrožený i z hlediska celoevropského (PROCHÁZKA ET AL., 2001). Tento cíl se nepodařilo zcela splnit, protože se ukázalo, že množení tohoto druhu je extrémně obtížné, ale podařilo se v tomto snažení postoupit alespoň o krůček, což považuji za úspěch.

Dále tato práce měla zahrnovat studium autekologických charakteristik a biotopu sledovaných populací. Na lokalitě Ruda byly zpracovány 3 fytocenologické snímky, ale pouze v jednom případě byl nalezen *Liparis loeselii*. Z tohoto důvodu nebylo možné tento druh na této lokalitě blíže sledovat. Právě proto se tato práce z větší části, zabývá generativním množením metodou *in vitro*.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Charakteristika čeledi *Orchidaceae*

Orchideje jsou co do četnosti rodů i druhů nejbohatší čeledí v říši rostlin, zahrnující asi 20 000 druhů. Nejpočetněji jsou zastoupeny v tropických pásmech všech světadílů, kde zejména v oblastech deštných pralesů a vysokohorských mlžných lesů je druhová pestrost orchidejí velmi vysoká (JATIOVÁ ET ŠMITÁK, 1996).

Orchideje jsou velmi mladou čeledí jednoděložných rostlin. Jejich vznik je datován do období středních druhohor, tj. přibližně před 100 až 150 milióny let. Výraznější vývoj tohoto řádu začal probíhat v posledních 30 miliónech let a probíhá intenzivně i v současnosti. Z biochemické stránky o tom svědčí nedostatek genetických izolačních bariér, díky nimž může docházet k snadnému křížení druhů, ale i příbuzných rodů (POTŮČEK ET ČAČKO, 1996).

Lidstvo zná orchideje již od středověku, přesto však první zmínky o jejich výskytu na našem území pocházejí až z konce 16. století. (PROCHÁZKA, 1980b).

Obecně můžeme orchideje rozdělit na druhy epifytické, které žijí na jiných rostlinách a využívají je pouze jako podkladu a terestrické (geofyty), rostoucí v zemi (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983).

Zatímco v tropech výrazně převažují epifytní druhy nad terestrickými, se vzrůstající zeměpisnou šířkou klesá počet druhů osidlujících stromy, přes subtropy, kde se jejich poměr vzájemně vyrovnává, až do mírného pásma, kde jsou domovem již výhradně jen zemní – terestrické druhy orchidejí (JATIOVÁ ET ŠMITÁK, 1996). K této skupině patří všechny evropské druhy včetně přibližně 50 druhů rostoucích v České republice (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983). Hospodářsky významné jsou především tropické druhy zahradnický využíváné pro své krásné květy a poměrně snadné množení (*Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cattleya* a další) (POTŮČEK ET ČAČKO, 1996). Širší praktické použití má pouze původně mexický druh vanilka plocholistá *Vanilla planifolia*. Její válcovité dlouhé tobolky v nedozrálém stavu obsahují vanilin, který je jedním z nejrozšířenějších vonidel (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983). Zahradnický využíváné jsou především tropické druhy, pěstované pro svou mimořádnou krásu, půvab, neobvyklost a poměrně snadné množení (POTŮČEK ET ČAČKO, 1996). V Evropě i jiných částech světa měl v minulosti rozsáhlé použití salep, dodnes velmi žádaný především v Malé Asii. Jedná se o sušené hlízy orchidejí sbírané během květu nebo těsně po odkvětu (PROCHÁZKA, 1980b).

2.1.1 Morfologie

Vstavačovité jsou vytrvalé, většinou lysé byliny s velmi rozdílnou morfologickou stavbou a to jak vegetativních orgánů, tak květů. Všechny naše druhy patří k terestrickým druhům a přetrvávají nepříznivé období roku buď hlízami, vesměs párovými (z loňské vyrůstá letošní rostlina a současně s tím se tvoří nová hlíza jako základ pro rostlinu v příštím roce), nebo velmi různotvárně utvářenými oddenky (někdy i zcela bezkořennými), výjimečně pahlízami (ztloustlými stonkovými články se zakrnělým vrcholem), častěji se vyskytujícími u tropických zástupců čeledi (PROCHÁZKA, 1980a).

U hlíznatých druhů je nutná každoroční rekolonizace jednoletých adventivních kořenů mykorrhizní houbou (DIJK ET AL., 1997). Kořeny rostlin na zimu odumírají a přezimující hlíza není houbou kolonizována. Adventivní kořeny a oddenky oddenkatých druhů zůstávají kolonizovány permanentně (RASMUSSEN, 1995).

Lodyhy jsou u všech našich orchidejí vzpřímené, buď listnaté, nebo porostlé jen zakrnělými šupinami (u druhů nezelených, obligátně mykotrofních). Listy jsou vždy nedělené, jednoduché, celokrajné, střídavé, postavené ve spirále nebo dvouřadě; u některých druhů se na lodyze směrem nahoru nápadně zmenšují a přecházejí v tzv. listenovité listy (podobné listenům). Lodyžní listy mohou být někdy sblížené, zdánlivě vstřícné. U všech našich druhů jsou listy tenké, jednoleté, přízemní mohou být v době květu již zcela nebo částečně odumřelé, žilnatina je obvykle souběžná, vzácně síťkovaná. Na okrajích listů se vzácně mohou tvořit adventivní pupeny, jež slouží vegetativnímu rozmnožování z našich druhů jen u měkkyně bažinné – *Hammarbya paludosa* (PROCHÁZKA, 1980a).

Orchideje mají oproti jiným cévnatým rostlinám řadu biologických zvláštností. Semena nemají zásobní látky uložené v endospermu a až na malé výjimky nejsou životaschopná bez symbiotických hub. Orchideje mohou velmi úsporně využívat živin a vody. A jako kvetoucí rostliny mají velmi komplikovaný a zajímavý vztah k opylovačům, jimž je přizpůsobena také morfologická stavba květů i mechanismus opylení. Květy orchidejí lákají hmyz barvou a vůní. Zbarvení květů je přizpůsobeno vidění hmyzu. Jak známo, hmyz má vidění posunuto ke kratším vlnovým délkám, a proto nevnímá dobře červené barvy z oblasti dlouhovlnného spektra. Z tohoto důvodu je u orchidejí vzácná pravá červená barva (DUŠEK ET KRŽÍSTEK, 1986).

Odlišnosti mezi orchidejemi jsou i ve formě výživy (dospělá individua mohou být buď autotrofní, mixotrofní nebo obligátně heterotrofní) nebo rozdílnými životními formami (na jedné straně geofyty, na druhé straně, většinou v tropech, epifyty) (PROCHÁZKA, 1980b).

2.1.2 Životní cyklus orchidejí

Za počátek životního cyklu lze považovat zralá semena orchidejí. Ta jsou charakteristická velmi malými rozměry a nízkou hmotností 0,3–14 µg (SMITH ET READ, 1997). Orchideje produkují velké množství semen. Skládají se pouze z nedokonale vyvinutého bezděložního embrya, které tvoří několik stovek až tisíc buněk, a pro vodu obtížně propustné testy. Embryo tvoří čtyři typy buněk, a to suspensor, epidermis, kortex a meristém (CLEMENTS, 1988). S výjimkou omezeného množství zásobních proteinů a lipidů v buňkách embrya neobsahují semena orchidejí žádné jiné zásobní látky (PETERSON ET AL., 1998). Díky malým rozměrům a hmotnostem mohou být tato semena rozšiřována anemochorně. Pokud by vyklíčila všechna semena a pokud by jim nekonkurovaly jiné organismy, osídlila by tato skupina rostlin do tří let celý povrch souše Země (PROCHÁZKA, 1980b).

Všechny orchideje žijí na začátku svého klíčení heterotrofně. Jejich semena totiž obsahují pouze kapičky oleje, které dostačují nanejvýš k tomu, aby umožnily rozmnožování buněk a vytvoření kořenových vlásků protokormu (MÖLLER, 1987). Těmto kořenovým vláskům, které se začínají tvořit na bazální části embrya, se říká rhizoidy (RASMUSSEN, 1995).

V prvních fázích vývoje tedy embryo přijímá vodu, zvětšuje svůj objem a postupně proráží testu. Již v této fázi mohou být embrya kolonizována mykorhizní houbou, která do nich proniká přes suspensor, který se nachází na bazálním konci embrya. Po krátké době jsou kolonizovány i ostatní části embrya s výjimkou apikálního konce, kde se nacházejí meristematická pletiva (UETAKE ET PETERSON, 1997; PETERSON ET AL., 1998). Tato vývojová stádia se označují jako protokorm, což je termín specifický pouze pro čeled' *Orchidaceae* (CLEMENTS, 1988).

Později se exogenně vyklene na hořejším konci kuželovitý hrbol, mění se posléze v duté ouško. V jeho dutině se počne tvořit druhý list a osa se značně prodlužuje. Tento nezelený útvar se pak mění v kořenovou hlízkou, jež je v mládí pokryta rhizoidy, které zanikají až po vyvinutí adventivních kořenů. Následuje tvorba zelených, asimilačních listů. Jejich počet se rok od roku zvyšuje s vývojem rostliny a jejich zásobních orgánů (PROCHÁZKA, 1980b).

Až do vytvoření prvních fotosynteticky aktivních listů jsou všechny druhy orchidejí plně závislé na mykotrofii. Se získáváním autotrofie se zeslabuje význam mykotrofie a některé

druhy se stávají mixotrofními, u jiných druhů tato životní závislost mizí (v dospělosti plně autotrofní druhy jsou např. *Cypripedium calceolus* a *Listera ovata*). U nezelených druhů (např. *Neottia nidus-avis*) přetrvává mykotrofie po celý život rostliny (BURKHARD, 1987).

Pokud rostlina ukončí svůj ontogenetický vývoj a má dobře vyvinuté zásobní orgány, přechází do generativní části vývoje. Všechny druhy orchidejí potřebují k uskutečnění svého ontogenetického vývoje několik let, v závislosti na druhu orchideje a přírodních podmínkách v nichž se vyskytují. Může to být tři, ale také pět a více let (PROCHÁZKA, 1980b; PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983).

Orchideje mírného pásma můžeme dělit z hlediska sezónního rytmu na několik skupin. Ty jsou charakteristické oblastí původu a také zásobními orgány orchidejí.

Vývoj nadzemních orgánů zelených oddenkatých druhů orchidejí probíhá v normálním vegetačním období roku. Jejich vegetační cyklus se neliší od většiny vytrvalých bylin. Výjimku tvoří druh *Goodyera repens*, který je naší jedinou stále zelenou orchidejí (PROCHÁZKA, 1980b; DIJK ET AL., 1997).

2.1.3 Mykorrhiza

Mykorrhiza je symbiotický vztah pŕdních hub a kořenů vyšších rostlin. Rozlišujeme několik typů mykorrhiz, přičemž tzv. orchideoidní mykorrhiza patří mezi tzv. endomykorrhizy. To znamená, že hyfy prorůstají jak mezibuněčnými prostory, tak do buněk primární kůry kořene (SMITH ET READ, 1997; BALÁŽ, 1999). Ektotrofní mykorrhizu, při které houbová vlákna vytvářejí plášť na povrchu kořenů, mají kupříkladu četné lesní dřeviny, ale i některé byliny (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983).

U orchidejí v kolonizovaném protokormu a adventivním kořeni se vytváří tři vrstvy buněk: vrstva s vyvíjejícím se myceliem (tvorba tzv. pelotonů – klubíček), vrstva s degradujícími a zanikajícími pelotony a vrstva zcela bez infekce, se zásobními látkami (HADLEY ET WILLIAMSON, 1971; RASMUSSEN, 1990; UETAKE ET PETERSON, 1997).

Podle názoru některých autorů, např. (HADLEY, 1975; PROCHÁZKA, 1980), orchideje parazitují na houbě tak, že v určité fázi začínají "stravovat" pelotony, které pak využívají ke své výživě. Jiní (SMITH ET READ, 1997; ANDERSEN ET RASMUSSEN, 1996) se přiklání k názoru, že v případě "stravování" endofyta se jedná o regulaci infekce pomocí rostlinami produkovánými fytoalexiny, tj. alkaloidy, z nichž jsou známy orchinol, lorroglossol a hircinol. Endofyti mohou patřit mezi silně patogenní taxony hub třídy

Basidiomycetes, které u jiných druhů rostlin mohou vyvolávat různé choroby, často vedoucí k úhynům. K těmto taxonům patří např. rody *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* a další (ANDERSEN ET RASMUSSEN, 1996; SMITH ET READ, 1997).

Jak již bylo řečeno výše, je orchideoidní mykorrhiza nezbytná pro klíčení a další vývoj orchidejí. Hyfy jsou přitahovány semenem dosud neznámým mechanismem "atraktance" symbiontů (CLEMENTS, 1988; POTŮČEK ET ČAČKO, 1996), vnikají do protokormu skrze kořenové vlášení nebo jinými epidermálními buňkami blízko suspensoru. Houba poskytuje protokormu energeticky bohaté sacharidy (SMITH, 1967; ALEXANDER ET HADLEY, 1985), růstové látky (HADLEY, 1970), aminokyseliny a další organické látky (ANDERSEN ET RASMUSSEN, 1996).

U dospělých autotrofních rostlin plní mykorrhiza funkci zásobování minerální výživou, především fosforem a dusíkem (ALEXANDER ET HADLEY, 1984). Orchideje mají nevětvený kořenový systém, tvořený jen několika dužnatými kořeny. Získávání fosforu by po jeho odčerpání z rhizosféry bylo obtížné z důvodu jeho malé pohyblivosti v půdě. Mímokořenové mycelium zde funguje analogicky rozvětvenému kořenovému systému a slouží jako účinná sorpční struktura nejen pro fosfáty, ale i pro jiné živiny a pro vodu.

Endofytické houby jsou stále nedostatečně známé a jejich přesné určení pomáhá budoucím generacím vyřešit složité otázky při pěstování našich orchidejí.

2.2 Charakteristika modelového druhu

Protože více druhů tohoto rodu má masně lesklé listy, bylo podle toho vytvořeno i jméno rodu (liparos značí v řečtině masně lesklý, mastný). Okolo 300 zástupců rodu, náležícího k druhově nejbohatším mezi orchidejemi vůbec, je rozšířeno s výjimkou Antarktidy a Arktidy téměř po celém povrchu Země (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983). Druhové pojmenování bylo vytvořeno na počest J. Losela, profesora lékařství a botanického spisovatele z Královce, žijícího v letech 1607-1657.

2.2.1 Morfologie

Liparis loeselii je světle žlutozelená, vytrvalá, lysá 6 – 20 (25) cm vysoká rostlina (viz Přílohy, fotografie 3). Pahlízy má téměř nadzemní (nová je vždy oddálená od staré), zelené, široce vejčité až obvejčité, poněkud zploštělé, 8-12 (-16) mm vysoké a 6-10 (-13) mm široké, obalené zbytky loňských listových pochev. Lodyha je přímá, štíhlá, na bázi se třemi pochvovitě svinutými šupinami, v dolní polovině se dvěma plně vyvinutými, podlouhlými, zašpičatělými, téměř vstřícnými, masně lesklými, více méně vzpřímenými, 4-13 cm dlouhými a 8-30 mm širokými listy. Drobné, zelenožluté, vzpřímené květy, vyrůstají z paždí kratičkých trojúhelníkovitých listenů, jež jsou maximálně stejně dlouhé jako stopkovitá část vřetenovitých, tříhranných semeníků, skládající řídký klas. Okvětní lístky jsou všechny širocerozestálé, vnější kopinatě čárkovité, třížilné, s poněkud podvinutými okraji, okolo 5 mm dlouhé, vnitřní párové poněkud kratší a užší. Bezostružný pysk je nedělený nebo jen mělce trojlaločný, podlouhlý nebo podlouhle vejčitý, tupý, na okraji slabě zvlněný, při bázi žlábkovitý, asi 4,5 mm dlouhý a 2,3 mm široký. Směřuje zpravidla rovnovážně do strany (květy se otáčejí obvykle o 270°, někdy o něco méně či více). Na vrcholu 2 – 2,5 mm vysokého, kupředu zahnutého sloupku je opadavý prašník se čtyřmi bryčkami bez stopeček. Druh kvete od června do července, vzácně ještě počátkem srpna. (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983).

2.2.2 Ontogeneze

Z velmi drobných semen (průměrná délka 0,34 mm a šířka jen 0,16 mm) vyvíjí se v přírodě za přítomnosti houbového endofyta ochlupený mykorhizom, zvětšující se až do třetí vegetační periody, kdy koncem léta dochází poprvé k vytvoření hlízy. Čtvrtý rok se

vyvíjí první zelený list a sedmým rokem je rostlina schopna kvést. Poté, co ontogeneze dospěje do stadia vývoje zelených listů, to znamená do období, kdy se již podílí na celkové výživě nejen mykotrofie, ale také fotosyntetická asimilace, jsou rostliny v umělých podmínkách schopny existovat i bez houbového endofyta, což svědčí o poměrně slabé mykotrofii vyšších ontogenetických stádií druhu. Nové pahlízy se vyvíjejí každoročně v paždí nejvyššího listu a mají na konci vegetační sezony již zcela diferencovaný vegetační vrchol uzavřený ve společném obalu s pahlízou. Protože pahlíza neobsahuje žádná houbová vlákna, dochází každoročně nové infekci tak, že nové adventivní kořeny prorůstají do míst obalů loňských hlíz, kde je houba přítomna a pronikne do nich. Květy jsou původně plně organizovány pro přenos brylek hmyzem. V našich podmínkách jsou však samosprašné. Krátce po otevření květů vypadávají brylky na bliznu, čemuž zakrnělé rostellum nemůže zabránit. Přestože u 70% jedinců v populacích se vyvíjejí plody z více než 50% květů, takže tvorba semen je obrovská, převládá asi rozmnožování vegetativní. Z adventivních pupenů, vytvořených na starých hlízách, vyvíjí se mladé rostliny jako dvouleté semenáče (PROCHÁZKA ET VELÍSEK, 1983).

2.2.3 Ekologie

Druh *Liparis loeselii* roste na slatinách, slatinných loukách, pánevních rašeliništích, prameništích a vlhkých písčích s neutrální nebo slabě zásaditou reakcí (pH 4,9-8,5), s vysoko položenou hladinou podzemní vody (online, 23.7.2007).

Autoři studující ekologii *L. loeselii* se shodují v názoru, že jedním ze základních předpokladů pro přežití tohoto konkurenčně slabého druhu je specifický vodní režim (NAVRÁTILOVÁ ET NAVRÁTIL, 2005).

SUCCOW (sec. PROCHÁZKA ET ČERNOHOUS, 1985) udává jako optimální hladinu spodní vody ve vegetačním období 4-15 cm pod povrchem půdy; vyšší i nižší je méně příznivá nebo vylučuje jeho existenci úplně.

Liparis loeselii se přechodně uplatňuje jako pionýrská rostlina při počátečním obsazování obnažených míst (např. po těžbě rašeliny), lokálně se může vyskytovat na přechodech slatinných a rašelinných společenstev do rákosovitých, vrbových a olšových porostů (ADAMEC, 2007).

Během vegetační sezóny 2004 byly na lokalitě Ruda odebrány vzorky vody a provedena jejich analýza (NAVRÁTILOVÁ ET NAVRÁTIL, 2005).

Tab. 1 Chemická analýza vody na sledované lokalitě Ruda podle NAVRÁTILOVÉ (2004)

Lokalita	pH			Vodivost ($\mu\text{S/cm}$)		
	průměr	minimum	maximum	průměr	minimum	maximum
Ruda	6,62	5,98	7,09	181	85	278

Lokalita	NH_4^+ (mg/l)			NO_3^- (mg/l)		
	průměr	minimum	maximum	průměr	minimum	maximum
Ruda	0,29	0,11	0,48	0,09	0,03	0,15

Lokalita	Ca^{2+} (mg/l)			Fe^{3+} (mg/l)		
	průměr	minimum	maximum	průměr	minimum	maximum
Ruda	8,2	6,43	9,56	1,09	0,52	1,47

NAVRÁTILOVÁ (2004) zjistila, že pH lokality Ruda během roku kolísá. Zjistila, že se pH od dubna do června zvyšuje a koncem léta opět klesá na původní hodnoty. Také vodivost se postupně zvyšuje od jara do podzimu, a to až na dvojnásobné hodnoty.

2.2.4 Ohrožení a management

Druh ustupuje při změnách vodního režimu, stoupajícím zastínění a okyselování stanoviště. Na slatinných loukách, kde se přestalo hospodařit je ohrožen konkurencí dalších bylin, zejména šířením rákosu, ostřic nebo sítin. Některé lokality zarůstají náletem dřevin a vyvinuly se na nich mokřadní olšiny nebo vrbiny. Na žádné lokalitě nehrozí v současné době při provádění potřebného managementu bezprostřední ohrožení druhu (ADAMEC, 2007).

2.2.5 Ochrana druhů *Liparis loeselii* a *Dactylorhiza bohemica*.

Liparis loeselii i *Dactylorhiza bohemica* patří k velmi vzácným druhům vstavačovitých rostlin květeny ČR. Zcela oprávněně byly oba druhy zařazeny mezi kriticky ohrožené a zvláště chráněné druhy květeny ČR (podle kategorií Černého a červeného seznamu cévnatých rostlin) a *Liparis loeselii* je jeden z nemnoha zástupců naší flóry, který je chráněn i celoevropsky (Natura 2000).

Tab.2 Stupně ohrožení u druhů *Liparis loeselii* a *Dactylorhiza bohemica*

Druh	Stupeň ohrožení dle Černého a červeného seznamu cévnatých rostlin	Stupeň ohrožení dle Černého a červeného seznamu květeny jižní části Čech	Dle vyhlášky MŽP ČR č. 395/1992 Sb	Dle Bernské úmluvy z roku 1998, část A, příloha 1.
<i>Liparis loeselii</i>	C1 - Kriticky ohrožený	C1 – Kriticky ohrožený	Kriticky ohrožený	Zařazen
<i>Dactylorhiza bohemica</i>	C1 - Kriticky ohrožený	C1 – Kriticky ohrožený	Kriticky ohrožený	-

Stupeň ohroženosti je uveden podle kategorií Černého a červeného seznamu cévnatých rostlin (PROCHÁZKA ET AL., 2001) a dále podle Černého a červeného seznamu květeny jižní části Čech (HOLUB ET AL., 1999).

Stanoviště druhu *Liparis loeselii* nelze ponechat samovolnému vývoji, je nutná extenzivní seč v pozdním létě a odstraňování náletu. Interval se stanovuje individuálně, podle potřeby a biomasu je nutné odstraňovat mimo sečenou plochu. Mezi specifická opatření patří obnažování travinného drnu a vytváření menších sníženin s vyšší hladinou podzemní vody. Tato opatření musí provádět specializované firmy. Pro udržení stálé hladiny spodní vody a vytvoření optimálního prostředí je třeba na některých lokalitách šetrně obnovovat odvodňovací kanály. Výjimečně je prováděno oplocení naleziště proti rytí divoké zvěře. Louky s výskytem hlízovce se nehnojí (REKTORIS, 2006).

Jedině realizací tzv. „Záchranných programů“, řízených Správami CHKO a Agenturou ochrany přírody a krajiny (AOPK), lze zajistit vhodný management na stávajících lokalitách.

Lokality soustavy Natura 2000 nemají být pouze rezervacemi s přísnou ochranou, kde je vyloučeno hospodaření či dokonce jakýkoliv lidský zásah. Často jsou to naopak území, kde se díky tradičnímu a citlivému hospodaření dochovala cenná společenstva nebo vzácný rostlinný či živočišný druh. Takový způsob hospodaření se stává důležitým nástrojem ochrany. V lokalitách soustavy Natura 2000 jsou tedy zakázány jen takové činnosti, které mají negativní vliv na výskyt předmětů ochrany. Proto také veškeré plány a projekty, které nějakým způsobem mohou významně ovlivnit evropsky významné lokality nebo ptáčí oblasti, podléhají samostatnému posuzování vlivů projektů z hlediska zachování předmětu ochrany (POKORNÝ ET AL., 2003).

2.2.6 Rozšíření modelového druhu

2.2.6.1 Celkové rozšíření

Cirkumpolární druh rozšířený v mírném pásmu severní polokoule, v severní Americe, (od Skotska na jih k Alabamě a Missouri) a Euroásii (od jihozápadní Anglie na sever přes Skandinávii až po Ob a střední Asii, na jihu po Rumunsko, severní Itálie až po Pyreneje) (online, 23.7.2007).

2.2.6.2 Rozšíření v ČR

Jeho rozšíření a přehled lokalit, zjištěných do roku 1985, publikoval KUBÁT (1986). Detailnímu výskytu na okrese Česká Lípa se věnoval HONCŮ (1995), který soustředil všechny do té doby známé údaje z Českolipska (KUBÁT, 2000)

V současné době je evidováno 13 lokalit (viz Přílohy, mapa 1), z nichž se většina nalézá na Českolipsku (Jestřebské slatiny, NPR Novozámecký rybník, Máchovo jezero), dále roste v Polabí (PP Byšičky), v Českém ráji (PR Podtrosecká údolí), na Třeboňsku (NPR Ruda) a u Opočna (PP Broumarské slatiny). Jediná moravská lokalita se nachází v Bílých Karpatech. Většina lokalit leží ve zvláště chráněných územích, výjimkou jsou českolipská naleziště na Jestřebských slatinách, jejichž vyhlášení se již delší dobu připravuje (online, 23.7.2007).

Tab. 3a Základní údaje o lokalitách modelového druhu (online, 23.7.2007)

Lokalita	Rozloha (ha)	Kraj	Katastrální území	Souřadnice středu	Nadmořská výška (m n. m.)
Ruda	77,7623	Jihočeský	Bošilec, Horusice, Ponědrážka	14°41'16" v.d., 49°8'54" s.š.	415 – 418
Jestřebsko - Dokesko	6950,371	Liberecký	Bezděz, Doksy u Máchova jezera, Heřmaničky u Dobřan, Hradčany nad Ploučnicí, Jestřebí u České Lípy, Kuřívody, Provodín, Srní u České Lípy, Veselí nad Ploučnicí, Zahrádky u České Lípy	14°39'22" v.d., 50°36'47" s.š.	252 - 470
Podtrosecká údolí	518,8954	Liberecký, Královéhradecký	Hrubá Skála, Kacanovy, Karlovice, Mašov u Turnova, Troskovice, Vyskeř (pro Liberecký kraj) Dobšice, Malechovice, Mladějov v Čechách, Roveň u Sobotky, Rytířova Lhota (pro Královéhradecký kraj)	15°13'9" v.d., 50°31'32" s.š.	250 – 416

Byšičky	17,2989	Královéhradecký	Brtev, Lukavec u Hořic	15°36'50" v.d., 50°24'55" s.š.	320 - 330
Březová - Kalábová	1,2221	Zlínský	Bánov, Březová u Uherského Brodu	17°44'39" v.d., 48°56'23" s.š.	515 - 535

Tab. 3b Základní údaje o lokalitách modelového druhu (online, 23.7.2007)

Lokalita	Navrhovaná kategorie zvláště chráněného území	Prioritní druhy
Ruda	CHKO	<i>Drepanocladus vernicosus</i> , <i>Liparis loeselii</i>
Jestřebsko - Dokesko	NPR, NPP, PR, PP	<i>Drepanocladus vernicosus</i> , <i>Leucorrhinia pectoralis</i> , <i>Ligularia sibirica</i> , <i>Liparis loeselii</i> , <i>Osmoderma eremita</i> , <i>Pulsatilla patens</i> , <i>Rosalia alpina</i> , <i>Trichomanes speciosum</i>
Podtrosecká údolí	CHKO	<i>Cobitis taenia</i> , <i>Drepanocladus vernicosus</i> , <i>Liparis loeselii</i> , <i>Maculinea nausithous</i> , <i>Rhinolophus hipposideros</i> , <i>Trichomanes speciosum</i>
Byšičky	PP	<i>Bombina bombina</i> , <i>Liparis loeselii</i>
Březová - Kalábová	CHKO	<i>Liparis loeselii</i> , <i>Vertigo angustior</i>

2.2.6.2.1 Ruda

Ruda je rašeliniště na jihovýchodním okraji Horusického rybníka mezi obcemi Ponědrážka a Bošilec, 4 km JJZ od Veselí nad Lužnicí (viz Přílohy, mapa 2).

Jedná se o komplex převážně přechodového a slatinného rašeliniště s četnými rašelinnými prameništi, mokřadními vrbinami, rašelinnými loukami a náletovými porosty (viz Příloha 2, fotografie 1). Na rašelinných prameništích se kontinuálně zachovala velmi cenná reliktní (časně postglaciální) rostlinná společenstva s řadou silně a kriticky ohrožených rostlinných druhů. Část lokality je tvořena NPR Ruda (REKTORIS, 2006). Z důvodů výskytu cenných rašeliništních společenstev a mnoha velmi vzácných a ohrožených rostlinných druhů se jedná o jednu z nejcenějších rašeliništních lokalit v celém jihočeském regionu.

Horninové podloží tvoří převážně různobarevné pískovce, slepence, jílovce a prachovce svrchnokřídového stáří o mocnosti 50-100 m náležející k svrchnímu oddílu klikovského souvrství (santon). V západní části lokality se nacházejí terciérní sedimenty mydlovarského souvrství (neogén). Svrchnokřídové a terciérní uloženiny jsou překryty kvartérem pokryvem slatinné rašeliny. Slatiniště je syceno především vývěry podzemní vody hlubinného oběhu na dislokacích křídových a terciérních sedimentů. Charakteristická je přítomnost rezavohnědých železitých sraženin (viz Přílohy, fotografie 2) v pomalu protékající i stagnující vodě (centrální příkop Červená stoka). S vysokým obsahem železa v pramenných vývěrech souvisí

zdejší sedimentární organogenní bahenní rudy železa, vytvářející v rašelině čočkovitá tělesa o průměru až 10-20 cm. Až do poloviny 20. století se v rašelině různě intenzivně těžil humolit (ALBRECHT, 1985).

Lokalita je součástí Třeboňské pánve (její části Lomnická pánev). Jedná se o plochou krajinu severní části Třeboňska s četnými velkými i menšími rybníky, málo zalesněná, s převažujícím poměrně intenzivním zemědělským využitím. Terén lokality je plochý, silně zvodnělý, s četnými tůňkami a jezírky vzniklými těžbou rašeliny a zavodněnými příkopy. Půdní pokryv zastupuje převážně organozem typická až glejová (převážně *Hypnum-fen* a *Carex-fen*) a glej organozemní (online, 23.7.2007).

Na obvodech rašeliníkových bultů tu skrytě kvete *Liparis loeselii* (ALBRECHT, 1985). Jde o jedinou lokalitu tohoto druhu v jižních Čechách.

Historie této lokality ukazuje, že zde byl v minulosti zřejmě mnohem větší počet rostlin hlízovce, než je tomu dnes. RYBENSKÝ (2007) nacházel v letech 1982 - 1984 u Horusického rybníka, na místech vymezených souřadnicemi 49st,8', 57,02''N , 14st 41',1,83''E (v tab. "u rybníka") a 49st9'1,25''N , 14st 41',6,89''E (v textu "u lesíka"), vždy několik (viz tab. 3) kvetoucích i sterilních rostlin.

V části u Zlaté stoky, na místě vymezeném souřadnicemi 49st,8',43''N,14st,41',6,89''E a 49st, 8',41,85''N,14st41',29,39''E, byla populace silnější, cca 79 rostlin nalezeno (viz tab. 4, počet 13.2.1994; viz Přílohy, mapa 3).

Problém ve sčítání spočívá v tom, že v létě se naleznou jen jedinci vyčnívající z vegetace, které obvykle do zimy zvěř spase (podle značek ověřováno několik let) a když omrzne *Menyanthes trifoliata*, vynoří se další, přičemž některé letní už chybí. V únoru, kdy je optimum pro sčítání, jsou vidět jen plodné, ale opět jiné rostliny. Možná místa výskytu lze také hledat podle *Carex diandra*, oba druhy jsou trochu náročnější na minerály. V zimě se naopak těžko hledají sterilní rostliny, které jsou v září téměř na povrchu mechu (RYBENSKÝ, 2007).

Tab.4 Nalezené počty rostlin na lokalitě Ruda (RYBENSKÝ, 2007)

Datum	Počet rostlin u lesíka (ks)	Počet rostlin u rybníka (ks)	Počet rostlin u Zlaté stoky (ks)
27.6.1982	1	-	-
23.6.1983	2	-	-
18.7.1983	5	-	-
15.11.1984	1	4	-
17.7.1985	6	-	-
5.10.1986	2	-	-
17.8.1987	2	-	-
16.8.1990	5	-	-
15.9.1990	-	-	43
10.10.1992	5	-	11
13.2.1994	2	4	79
Rok 2007	-	-	-

2.2.6.2.2 Jestřebsko – Dokesko (online, 23.7.2007)

Rozsáhlé území s dominantami Novozámeckého a Břežanského rybníku, Máchova jezera a Hradčanských stěn. V jižní části ohraničené (od západu na východ) obcemi Zahrádky, Jestřebí, Staré Splavy, Doksy a zasahující nejdále na východ k vrcholu Velké Bukové (474 m n. m.). Severní hranice (směrem opačným) tvoří Hradčanské rybníky a niva Ploučnice až k Brenskému mlýnu (ta k území jen přiléhá, ale náleží do lokality Horní Ploučnice) a zahrnut je i Heřmanický rybník (viz Přílohy, mapa 4).

Charakteristickými geomorfologickými prvky Jestřebsko-Dokeska jsou ploché pánve s četnými rybníky a rašeliništi, kvádrové pískovce rozčleněné do bizarních skalních útvarů a kaňonovitých soutěsek a dále neovulkanické vrchy, které jsou výraznými krajinnými dominantami. Krajinný reliéf utvářený těmito prvky je v České republice ojedinělý. Díky velké různorodosti biotopů a jejich zachovalosti se zde vyskytuje i pestrá flóra a fauna.

Území leží v mírně teplé klimatické oblasti, průměrné roční teploty se pohybují od 5, do 8° C a průměrné roční úhrny srážek jsou 650-900 mm. Dokesko je nejteplejší a nejsušší oblastí Českolipska. Velké rozpětí klimatických údajů je dáno členitostí reliéfu.

Jistou podobu lze nalézt s rybníční krajinou Třeboňské pánve, avšak zde je navíc doplněna přitažlivým pahorkatinným reliéfem s dominantami čedičových vrchů (Bezděz).

Převážná část území spadá do fytochorionu Ralsko-Bezděžská tabule charakterizovaného přítomností (sub-)atlantického geoelementu. Významný je reliktní ráz květeny, která na několika místech přežívá zřejmě již od dob postglaciálu a vysoká biodiverzita daná místy značnou terénní členitostí, ale rovněž střídáním vodních a suchozemských ploch. Z Českolipska je uváděno asi 1600 taxonů vyšších rostlin, z nichž k největším vzácnostem

zdejších vlhkých luk řadíme např. endemické taxony *Dactylorhiza bohemica*, *Pinguicula bohemica*, *Dactylorhiza maculata subsp. maculata*, *D. incarnata subsp. serotina*, *Ligularia sibirica*, *Tofieldia calyculata*, *Liparis loeselii* mnohé další.

Důležitou součástí Jestřebka – Dokeska jsou Jestřebské slatiny. Jedná se o zhruba 200 ha komplex převážně odvodněných slatinišť a lučních ekosystémů přiléhajících k Mlýnskému potoku mezi Jestřebím a Starými Splavy. Na lokalitě se vyvinuly střídavě vlhké louky ze svazu *Molinion* (s druhy jako *Carex flacca*, *Galium boreale*, *Iris sibirica*) a ostřicovomechové porosty na organogenních minerálně bohatých půdách ze svazu *Caricion davallianae* (s vzácnými ostřicemi *Carex davalliana*, *C. hostiana*, *C. lepidocarpa*). Díky pravidelné údržbě, monitoringu a záchrannému programu AOPK ČR se zde dochovaly ještě mnohé mokřadní orchideje (např. *Liparis loeselii*, *Epipactis palustris*). Výsostnou pozornost si zaslouží nedávno popsáný druh *Dactylorhiza bohemica*, *Pinguicula bohemica* nebo *Ligularia sibirica*, o jejíž původnosti jsou ovšem stále vedeny spory. Převážná část luk je opuštěna a zarůstá náletem dřevin a rákosem.

Liparis loeselii byl známý z okolí Jestřebí, Starých Splavů a Doks již od začátku intenzivnějšího botanického průzkumu v této oblasti, tj. z 1. poloviny minulého století. Tento druh sebral u Jestřebí pro svou exsikátovou sbírku již před rokem 1850 Tausch. Později zde byl pozorován nebo sbírán mnohokrát, ale zhruba o 100 let později byl *L. loeselii* známý pouze ze slatinných luk a rákosin podél železnice pod Konvalinkovým vrchem. V roce 1985 se ho však podařilo zjistit také na břehu rybníčku sotva 200 m od sz. okraje „Shnilých luk“ v místě, které bezpochyby s těžbou humolitu nesouviselo (KUBÁT, 2000).

Obzvláště v této části Českolipska je tedy možné oprávněně předpokládat objevení se *L. loeselii* na kterékoliv lokalitě, která bude splňovat ekologické nároky tohoto stenotopního druhu. Nepřímým důkazem bylo zjištění početné populace *L. loeselii* v roce 1996 i na pásech „Shnilých luk“ nedaleko od silnice, kde byla těžba ukončena až kolem roku 1987. Ještě několik před tím zde s jistotou nerostl (KUBÁT, 2000).

Dnes se zde *Liparis loeselii* vyskytuje na Shnilých loukách a Baronském rybníku, dále velmi maloplošně v zarostlých odvodňovacích kanálech a malých depresích vzniklých i rytím zvěře. Na většině ploch je kromě slatinných druhů pravidelně přítomna *Molinia caerulea*, která má různou pokryvnost v závislosti na výšce hladiny spodní vody a dalších faktorech. Většina ploch je ohrožena sukcesí.

Slatinná vegetace se vyskytuje v místech, které jsou dobře zásobeny vodou, a voda navíc obsahuje vápnité kationty. Nejcennější vegetace se nachází na slatiništi nazvaném Shnilé

louky, které bylo vytěženo v sedmdesátých letech. Na obnažené slatině s vysokou hladinou podzemní vody, která místy vystupovala na povrch, se vyvinula otevřená společenstva sv. *Caricion davallianae* a asociace *Molinietum caeruleae*, ta však nyní začínají zarůstat rákosem a náletem dřevin. Nachází se zde nejpočetnější populace hlízovce Loeselova (*Liparis loeselii*) v České republice. Dalším velmi cennou slatinnou lokalitou je Baronský rybník, který je již dlouhou dobu zcela zazemněný.

Celé území Jestřebských slatin patří k nejvýznamnějším botanickým lokalitám v České republice a je již dlouhodobě navrženo na vyhlášení zvláště chráněným územím v kategorii národní přírodní rezervace.

Louky na Jestřebsku trpí nedostatečným obhospodařováním sečí a expanzí rákosu. Masivně zarůstají dřevinami a třtinou křovištní (*Calamagrostis epigejos*). Rákosiny na místech lučních porostů jsou nežádoucím prvkem a měly by být koseny. Louky jsou často značně vzdáleny od udržovaných cest a lidských sídlišť a jejich obhospodařování se nevyplácí. Jejich vznik někdy souvisí s meliorací původních slatin systémem odvodňovacích kanálků. Část luk byla zorněna a záhy opuštěna, jiné byly v minulosti zmeliorovány a jen velmi zvolna se do takto přeměněných luk vracejí původní druhy rostlin.

Nejcennější plochy bezkolencových luk se začaly v rámci managementu ochrany přírody v nedávných letech kosit, ale tyto plochy jsou však naprosto nedostatečné. Část luk kosí také myslivecká sdružení a soukromníci. Většina ploch s vápnitými slatiništi je ohrožena sukcesí, avšak např. na Baronském rybníku jsou již prováděny managementové zásahy zajišťované AOPK ČR.

Postupující rekreační činnost s sebou nese i sílící urbanizaci a rozvoj cestní sítě. Značný dopad na společenstva má také přemnožení zvěře. Tu je nutné udržovat na nízkých stavech vzhledem k intenzivnímu okusu přirozeného zmlazení ve zdejších lesích. Místy se ve vodní vegetaci rozvíjí invazní druh *Elodea canadensis* a ve skalních městech postupuje invaze *Pinus strobus*.

Na lokalitě byly v roce 1986 zapsané následující snímky (KUBÁT, 2000).
Plocha 2x2 m; E1=30%, vod. hladina 50%, neporostlá půda 20%
Liparis loeselii +, *Carex acutiformis* 2, *Carex lepidocarpa* 2, *Equisetum palustre* +, *Juncus alpino-articulatus* +, *Triglochin palustris* +, *Utricularia minor* +, *Alisma plantago-aquatica* r.

Plocha 1x3 m, E1= 90%, bez otevřené vodní hladiny.

Liparis loeselii +1, *Carex lepidocarpa* 4, *Mentha* sp. 1, *Betula pendula* juv. +, *Carex appropinquata* +, *Carex flacca* +, *Carex nigra* +, *Cirsium palustre* +, *Equisetum arvense* +, *Galium uliginosum* +, *Juncus inflexus* +, *Molinia caerulea* +, *Potentilla erecta* r, *Sanguisorba officinalis* r, *Tussilago farfara* r.

Plocha 2x2 m; E1= 60%, otevřená vod. hladina 40%

Liparis loeselii +, *Carex lepidocarpa* 2, *Carex rostrata* 2, *Eleocharis quinqueflora* 1, *Carex panicea* r, *Phragmites australis* r, *Typha latifolia* r, *Utricularia minor* r.

Plocha 2x3 m; E1= 90%, bez otevřené vodní hladiny

Liparis loeselii 1, *Carex lepidocarpa* 3, *Equisetum palustre* 2, *Phragmites australis* 1, *Betula pendula* juv. +, *Frangula alnus* juv. +, *Galium uliginosum* +, *Mentha* sp. +, *Scirpus sylvaticus* +, *Eupatorium cannabinum* r, *Juncus acutiflorus* r, *Lythrum salicaria* r, *Salix repens* r, *Triglochin palustris* r.

Ze snímků je na první pohled patrné jen nepatrné až žádné zastoupení rákosu, který na lokalitu ještě nestačil expandovat (KUBÁT, 2000).

2.2.6.2.3 Podtrosecká údolí (online, 23.7.2007)

Oblast CHKO Český ráj. Soustava kaňonovitých údolí pod vrcholem Trosek, podél říčky Žehrovky a Želejovského potoka (viz Přílohy, mapa 5).

Z geologického hlediska se jedná o Českou křídovou tabuli a kvádrové pískovce telického souvrství. Jedná se o Vyskéřskou vrchovinu, část Turnovské pahorkatiny.

Z hlediska pedologie se jedná o kambizemě arenické a luvické, podzol arenický.

Populace druhu *Liparis loeselii* je stabilní s progresivním vývojem v posledních letech, se zabezpečeným managementem. Pokud by došlo k přerušení kosení, je biotop ohrožen přirozenou sukcesí - zarůstáním rákosem a náletem olše. Vážným ohrožením by mohla být i jakákoliv změna hydrologických poměrů na lokalitě, protože se jedná o rozvodí. Negativně by se projevilo jak odvodnění, tak např. i zásadní dlouhodobá změna výšky vodního sloupce v rybníku Vidlák, na který rašelinná louka bezprostředně navazuje. Nevhodné je také jakékoliv hnojení na okolních výše položených loukách, protože za deště

by mohlo docházet ke splachům živin do rašeliniště a k jeho následné eutrofizaci. Na lokalitě byla pozorována i expanze rákosu.

2.2.6.2.4 Byšičky (online, 23.7.2007)

Přírodní rezervace tvořená lesním komplexem Bulice, rybníky Hlubokým, Bahníkem a Zákopským s přílehlými vlhkými loukami se nachází severozápadně od Hořic (cca 8 km) a východně od Lázní Běláhoř (cca 4 km) (viz Přílohy, mapa 6).

Lokalita je ohrožena absencí obhospodařování (kosení a odstraňování náletu), zalesňováním a budováním odvodňovacích stružek. minulosti došlo k převodu nekosené louky na lesní pozemek (70.léta 20.stol.), bylo provedeno jeho zalesnění a částečné odvodnění. Nejvyšší část tohoto pozemku (výskyt ohrožených druhů rostlin) byla převedena zpět na louku (r. 1993), výsadby olše byly odstraněny, bylo provedeno kosení (r. 1994). V současné době však neprobíhá kosení každoročně, v louce se šíří rákos, třtina křovištní, bezkolonec. Negativním jevem je také rybníkářské využívání rybníků (jsou vedeny jako intenzifikační, jsou hnojené kejdou, otruby) a následná eutrofizace rybníků.

2.2.6.2.5 Březová – Kalábová (online, 23.7.2007)

Lokalita se nachází v části Bílých Karpat. Jedná se o luční prameniště ležící 1 km východně od kóty Studený vrch (646 m.n.m.), 1,4 km severně od obce Březová (viz Přílohy, mapa 7).

Podklad tvoří vrstvy pískovců, jílovců a slínovců svodnického souvrství bělokarpatské jednotky magurského flyše. Důležitým faktorem je recentní tvorba vápnatého pěnovce, jenž místy tvoří pod povrchem značné hmoty, a slatiny v mokřadech.

Lokalita spadá do celku Bílé Karpaty, podcelku Lopenická hornatina, okrsku Komeňská vrchovina.

Jedná se o členitou vrchovinu s erozně denudačním reliéfem. Lokalita je tvořena mohutnou travertinovou kupou i s vrcholovým jezírkiem, v nadmořské výšce 520 m n. m.

Půdy jsou zde organozemě.

Liparis loeselii roste v mokřadu ve střední části lokality, v biotopu přechodném mezi vápnatým slatiništěm a lučním pěnovcovým prameništěm. Zde je jediná lokalita hlízovce v Bílých Karpatech. Populace tohoto druhu je poměrně slabá. Nejcennější slatinový biotop je

potenciálně ohrožen změnami vodního režimu - v minulosti k tomu došlo a jsou potvrzeny negativní důsledky.

Okolní plochy je nutno pravidelně kosit, jinak nastoupí nežádoucí sukcesní procesy. Těžko ovlivnitelné nebezpečí představuje možnost nadměrného rozrytí travního drnu černou zvěří; nejcennější část lokality s výskytem hlízovce je zaplocena dřevěnou ohradou. V minulosti došlo k rozsáhlému zalesnění okolních ploch s podobnými přírodními podmínkami smrkem, což má dosud negativní dopad na populaci zájmového druhu - ve smyslu likvidace již tak velmi vzácných stanovišť příhodných pro jeho šíření.

Do začátku 90. let byl mokřad bez zásahů, v roce 1996 zde byl na ploše 0,2 ha likvidován nálet a bohužel i vyhloubena "tůň pro obojživelníky", čímž došlo k narušení vodního režimu. Ve stejném roce byla lokalita vážně poškozena černou zvěří. Aby se zamezilo podobným negativním vlivům, byla nejcennější část s jezírkem zaplocena dřevěnou ohradou (online, 23.7.2007).

2.2.6.3 Management na jednotlivých lokalitách

Tab.5 Management na jednotlivých lokalitách (online, 23.7.2007)

Lokalita	Management
Ruda	Biotop s hlízovcem (<i>Liparis loeselii</i>) je značně ohrožen invazí náletových druhů dřevin - <i>Frangula alnus</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Salix sp.</i> div, které rovněž přispívají k vysušování stanoviště. V případě ručního kosení lokality je třeba zachovat původní charakter biotopu - střídavě plošky bultů a jezírek se stagnující vodou. Celé rašeliniště je v důsledku suchých let koncem 20. století pod silným tlakem sukcese dřevin. Tomuto tlaku odolávají jen prameniště a jámy po těžbě, které jsou dnes zality vodou, nebo pokryty nebezpečnou vrstvou rašeliníků. Část území byla v minulosti využívána jako kosené louky, dnes dochází k jeho postupnému zarůstání náletovými dřevinami. V rámci řízené péče je část luk udržována kosením. Je nutné monitorovat případný nálet dřevin. V případě ručního kosení lokality je třeba zachovat původní charakter biotopu - střídavě plošky bultů a jezírek se stagnující vodou. Náletové dřeviny je třeba pravidelně vyřezávat.
Jestřebsko - Dokesko	Vybrané lokality hlízovce (<i>Liparis loeselii</i>) se pravidelně sečou v pozdně letním období, slatinné biotopy na Shnilých loukách se sečou nepravidelně, neboť jsou zatím ještě dostatečně otevřené. Je třeba pokračovat ve stejné péči. Některé lokality jsou zatím ponechány samovolnému vývoji. Účelem managementu je zachování hydrologických poměrů na rašeliništi, pravidelné kosení, odstraňování náletu a rákosu a také nehnojit.
Podtrosecká údolí	Pro <i>Liparis loeselii</i> zachovat hydrologické poměry na rašeliništi, pravidelně kosit, odstraňovat nálet a rákos, nehnojit .
Byšičky	Pro zachování mozaiky slatinných a bezkolencových luk, porostů nízkých a vysokých ostřic je nezbytné pravidelné kosení každým rokem po dozrání semen a vysemenění vstavačovitých. V partiích s dominantním bezkolencem je vhodné kosení až v době jeho kvetení (srpen), v partiích s dominantním rákosem a třtinou křovištní na začátku metání (červen, červenec). Musí být zachován stávající vodní režim a pravidelně odstraňován nálet dřevin. Důležité je zachování litorálního pásma. U rybníků je důležité zachovat litorální pásmo, chov ryb pouze extenzivní.
Březová - Kolábová	Dobré by bylo ponechat listnaté lesní porosty včetně zastíněného prameniště bez zásahu. Vlastní slatinný mokřad taktéž ponechat bez zásahu, pouze v případě vysychání, invaze bezkolence apod., začít s kosením - po odborné konzultaci s vědci. Pravidelné kosení porostů bezkolence 2x ročně (červen, září). Pravidelné kosení ostatních ploch 1(-2) x ročně. Pravidelné odstraňování případných náletových dřevin v nekoseném.

2.3. Generativní množení

Semena orchidejí jsou velmi malá a neobsahují žádné zásobní látky. Klíčení v přirozených podmínkách závisí na kolonizaci houbami rodu *Rhizoctonia*, které dodávají zárodku potřebnou výživu. Jedinec, který se s hyfami příslušné houby nestřetne, je odsouzený k zániku. Proto příroda poskytla orchidejím velký počet semen, dosahující u některých druhů až miliónových počtů. Existují však také bakterie a parazitické houby, které klíčivost semen inhibují. Semeno má proto ve volné přírodě velice malou šanci na přežití. Byly vyvinuty laboratorní postupy množení, které se snaží zvýšit procento přeživších rostlin (ZÁKREJS, 1980).

2.3.1 Metoda *in vitro*

2.3.1.1 Asymbiotický výsev semen

Symbiotické výsevy využívají stimulačních účinků mykorrhizních druhů hub. Proto jsou semena kultivována na uměle připravených půdách společně s vhodným houbovým izolátem. Vývoj takto kultivovaných semenáčů je rychlý (HADLEY, 1970; PURVES ET HADLEY, 1976; PETERSON ET AL., 1998) a i přenos do podmínek *ex vitro* je snazší (MALMGREN, 1996). Nevýhodou je snadné porušení křehké rovnováhy mezi těmito dvěma organismy, vedoucí v parazitismus houby, končící smrtí orchideje (PURVES ET HADLEY, 1976; MICHL, 1981; RASMUSSEN, 1995).

Klíčení semen, které je nutričně závislé na přítomnosti houbového symbionta v prostředí, se dá v podmínkách *in vitro* obejít tzv. asymbiotickou metodou, ve které je houba nahrazena zdrojem uhlíkatých látek, např. směsí 1% koncentrace sacharózy a 0,5 % glukózy v živném médiu (VEJSADOVÁ, 2004).

2.3.1.2 Výsevní a kultivační živná média

Základní složku všech médií a zdrojem vodíku a kyslíku je voda. Používá se vždy destilovaná. Dalšími složkami médií jsou anorganické látky, organické látky a ztužovací agens (VEJSADOVÁ, 2004).

2.3.1.2.1 Anorganické látky

Anorganické látky jsou nezbytnou složkou médií, patří sem mikro a makroelementy. Mezi makroelementy patří N, P, K, Ca, Mg a S. Dusík se do živných médií dodává ve formě NO_3^{-1} a NH_4^{+1} i vázaný v aminokyselinách. Při nízké teplotě je preferován příjem NH_4^{+1} , což vede k okyselení média a k následnému zvýšení příjmu NO_3^{-1} . Okyselení může způsobit řidnutí médií ztužených agarem (NOVÁK, 1990).

Fosfor je v médiu obsažen v dihydrogenfosforečnanu a má význam pro celkovou látkovou výměnu a je součástí nukleových kyselin. Draslík je nepostradatelný pro fotosyntézu a dýchání rostlin. Vápník ovlivňuje prodlužovací růst buněk a podílí se na jejich zpevnování. Síra má, společně s vápníkem, vliv na hospodaření s vodou. Je obsažena ve vitamínech B₁ a H (TROST, 1985).

Jako zdroj makro- a mikroelementů slouží také roztoky anorganických solí. Uplatnění nachází při stavbě rostlinného těla a ovlivňují organogenezi i enzymatické reakce (RASMUSSEN, 1995). Cílem u médií používaných pro výsevy a kultivace orchidejí je snižování koncentrace solí a zvyšování organických komponentů typu vitaminů, aminokyselin či růstových látek (regulátorů).

2.3.1.2.2 Organické látky

Organické látky jsou třetí základní složkou médií. Jsou dodávány jako přesně definované chemické látky (aminokyseliny, vitaminy, cukry, růstové látky) nebo jako nedefinovatelné organické dodatky (kokosová voda či mléko, extrakty).

Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou velmi pohodovým zdrojem dusíku a současně jsou stavebními kameny bílkovin. Bez jejich přítomnosti se nemůže vytvářet ani chlorofyl, ani buněčná plazma (TROST, 1985). Organický dusík je do média dodáván např. jako kvasničný extrakt, kaseinhydrolyzát, peptony nebo kombinací jednotlivých aminokyselin. Média, obsahující aminokyseliny vykazují při dlouhodobém používání nízkou toxicitu (MALMGREN, 1996).

Vitaminy

Vitaminy mají u rostlin katalytickou úlohu. V médiu MS jsou obsaženy vitamin B₁ (thiamin) a B₆ (pyriodoxin), které příznivě ovlivňují růst a látkovou výměnu orchidejí. Přidává se také myo – inositol a kyselina nikotinová (TROST, 1985). Také jiné vitaminy,

jako je riboflavin, dále biotin, kyselina listová nebo niacinamid působí stimulačně na klíčení a růst orchidejí (HARVAIS, 1973; VAN WAES ET DEBERGH, 1986B; RASMUSSEN, 1995).

Cukry

Cukry jsou velmi častou složkou média, představují zdroj energie i organicky vázaného uhlíku sloužícího k výživě protokormů. Místo těžce rozložitelných polysacharidů typu škrobu, celulózy, které jsou vhodné pro symbiotické výsevy (ARDITTI ET AL., 1990; SMITH ET READ, 1997), ale pro samotné protokormy jsou nevyužitelné, se používají mono- a disacharidy typu sacharózy, glukózy či fruktózy, nejčastěji v množství 10 až 20 g.l⁻¹.

Růstové regulátory

Růstové regulátory zahrnují fytohormony, což jsou přirozené endogenní metabolity, které regulují růst a vývoj organismu. Růstové regulátory typu auxinů a cytokininů jsou pro kultury in vitro nejdůležitější (TROST, 1985).

Auxiny

Auxiny se používají pro iniciaci růstu vrcholových meristémů stonku a stimulují růst kořenových meristémů. Mezi obecně užívané auxiny patří přirozené (IAA, PAA), které jsou během kultivace postupně destruovány účinkem světla, a proto se používají méně často. Syntetické (např. IBA, 2,4 -D, NAA). Indolyloctová kyselina (IAA) podporuje prodlužovací růst buněk a zakládání kořenů. Vyšší koncentrace auxinů může iniciovat proliferaci, ale musí se dbát na to, aby se poté koncentrace silně snížila, aby se vyloučilo riziko toxicity (TROST, 1985).

Cytokininy

Z přirozených cytokininů se pro kultivaci in vitro obecně používají zeatin a 2iP, ze syntetických pak např. kinetin, BAP, adenin a TDZ. Obecně cytokininy stimulují dělení buněk, ovlivňují přímou i nepřímou tvorbu pupenů, vysoké koncentrace však mohou inhibovat tvorbu kořenů (TROST, 1985).

Podle MITRY (1989) cytokininy samotné nebo v kombinaci s auxinem IAA podporují klíčení. Podobný efekt má použití adeninu. Naproti tomu HADLEY (1970) uvádí, že 1–10 ppm kinetinu s nebo bez 1 ppm IAA může retardovat klíčení druhu *Dactylorhiza purpurella*,

ale zvyšuje rychlost růstu protokormů. VAN WAES ET DEBERGH (1986B) zjistili, že efekt cytokininů na klíčivost, jmenovitě BA, je závislý na jeho koncentraci a druhu orchideje.

Gibereliny

Gibereliny se v médiích používají velice zřídka, jejich aplikace v nízkých koncentracích může příznivě ovlivnit růst orgánů již založených (TROST, 1985).

Organické dodatky

Z nedefinovatelných organických dodatků se do médií přidává nejčastěji kokosové mléko nebo kokosová voda. Pro růst protokormů se přidávají také další látky, které jsou především zdrojem kinetinu. Mezi tyto látky patří březová voda, ananasová šťáva, extrakt z mrkve, rajčat nebo travní extrakt (MICHL, 1981). Tyto látky obsahují vitaminy a růstové regulátory ve vhodné kombinaci a koncentraci pro kultivaci orchidejí. Například jednou ze základních složek kokosového mléka je myo-inositol (VAN WAES ET DEBERGH, 1986B). Ananasová šťáva podporuje tvorbu kořenů a růst protokormů a semenáčů (MALMGREN, 1996). Některé druhy dobře rostou na bramborovém či kvasničném extraktu (HADLEY, 1970).

2.3.1.2.3 Aktivní uhlí

V některých případech se do média přidává aktivní uhlí, který se do média dodává v koncentraci 1 až 5 g.l⁻¹ (BUTCHER A MARLOW, 1989). Je to velmi jemně porézní materiál se sorbční schopností. Pozitivní efekt spočívá v adsorbci inhibičních nebo fyto toxických metabolitů produkovaných kulturou, které způsobují hnědnutí protokormů a média (YAM ET AL., 1990; TROST, 1985). Aktivní uhlí také stabilizuje pH (FAST, 1980) a zvyšuje aeraci média (ARDITII ET ERNST, 1984). Způsobuje ztmavnutí média, které simuluje přirozené prostředí, a tím stimuluje kořenové špičky k růstu (YAM ET AL., 1990).

2.3.1.2.4 Ztužovací agens

Nejčastěji používaným ztužovacím agens je agar. Agar je polysacharid s vysokou molekulovou hmotností. Jedná se o mořskou řasu, která při teplotách nad 45 °C přechází do tekutého stavu a při opětovném ochlazení tuhne (ZÁKREJS, 1980).

2.3.1.3 Ošetření semen před výsevem

Ošetření zralých semen před výsevem má za úkol jednak jejich povrchovou sterilizaci a rovněž odstranění bariér inhibujících klíčení. Těmito bariérami jsou pro vodu takřka nepropustná testa, integumenty embrya obsahující suberin (VAN WAES ET DEBERGH, 1986a) a rovněž jimi mohou být endogenní inhibitory typu ABA (LUCKE ET BEBLER, 1997). Byly vyvinuty různé metody ošetření semen, lišící se použitým chemickým agens, ale i dobou jejich působení (VAN WAES ET DEBERGH, 1986b; VLAŠÍNOVÁ, 1988; MITCHELL, 1989). Například relativní nepropustnost testy některých druhů orchidejí je možné překonat pouhým několikadenním nebo několikatydenním máčením ve vodě (VAN WAES ET DEBERGH, 1986a). Mnohem intenzivnější a rychlejší účinek vykazuje použití chlorového vápna $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ se čtyřmi efekty: 1. sterilizuje semena pro aseptický výsev; 2. testa je degradována oxidací a alkalizací (VAN WAES ET DEBERGH, 1986a); 3. odstraňuje vyplavením kyseliny abscisovou ze semene (embrya) (LUCKE ET BEBLER, 1997) a konečně 4. odstraňuje suberin na integumentech embrya, čímž se zvyšuje difúze a permeabilita pro vodu (HARVAIS ET HADLEY, 1967a). Suberinizace embrya je přitom druhově specifická a závisí rovněž na stupni zralosti semene. Obecně platí, že čím tmavší se integumenty jeví, tím více jsou suberinizovány. Podle tohoto ukazatele je třeba upravit sterilizační čas nebo koncentraci hypochloridu. Obdobně se též používá chlornan sodný (NaOCl , komerční přípravek Savo). Je však mnohem agresivnější a proto je nutné jeho použití v nižších koncentracích, případně kratší expozici (RASMUSSEN, 1995). Celý postup musí být pečlivě sledován, aby nedošlo k porušení buněk embrya, které by znamenalo jeho smrt. Např. dle VAN WAES A DEBERGHA (1986a) u druhu *Dactylorhiza maculata* po 2 až 8 hodinovém působení 5% hypochloridu vápenatého s přísadkou 1% roztoku smáčedla Tween 80 dochází k degradaci testy, ovšem po 24 hodinové expozici již dochází k poškození embrya. Přídavek detergentu, např. přípravku Tween 80 (sorbitolanhydrid), případně předpůsobení 70% roztokem etanolu, je nutné k dobrému smáčení testy, která obsahuje lipidní vrstvu (RASMUSSEN, 1995; VEJSADOVÁ, 1997). Příkladem účinné metody ošetření semen může být použití 70% etanolu v kombinaci s 0,5% roztokem NaOCl nebo 7% roztokem $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (VEJSADOVÁ ET MALÁ, 1996; VEJSADOVÁ, 1997; VEJSADOVÁ ET AL., 1998), kdy i semena ve vysokém stupni zralosti některých druhů orchidejí vykazovala dobrou klíčivost. Peroxid vodíku ani 96% etanol se neukázaly jako vhodné sterilizanty (VAN WAES, 1984).

Ve snaze zvýšit klíčivost semen byly vyvinuty některé další metody jejich ošetření. MIYOSHI A MII (1995b) máčeli 7 dnů semena druhu *Calanthe discolor* v roztocích NAA o koncentraci 1 až 100 mg.l⁻¹ a po 170 dnech kultivace klíčilo přes 50 % semen, zatímco v kontrolní skupině pouze 38 %. LINDÉN (1992) kombinoval klasické ošetření semen roztokem hypochloridu s použitím vakua nebo enzymů degradujících testu semene. Rovněž použitím dosud nezralých semen se někteří autoři snažili obejít problém jejich inhibice. V procesu dozrávání semen se totiž postupně vytváří všechny inhibitory klíčení, tj. zvyšuje se nepropustnost testy, probíhá suberinizace integumentů embrya a zvyšuje se koncentrace endogenní ABA (kyselina abcisová). MICHL (1981) doporučuje k výsevům semena ve stádiu jejich dvoutřetinové zralosti, což odpovídá zhruba 6 až 8 týdnům vývoje po opylení. V případě použití nezralých semen je nutné zkrátit dobu působení sterilizačních činidel, popřípadě použít pouze povrchovou sterilizaci dosud uzavřených intaktních tobolek. MICHL (1981) jako výhodu použití nezralých semen uvádí kromě vyšší klíčivosti i lepší vyrovnanost získaných kultur.

K orientačnímu posouzení vhodnosti použité sterilizační metody lze použít tzv. tetrazoliový test (VAN WAES ET DEBERGH, 1986a). Ošetřená semena jsou vystavena působení roztoku, který je v přítomnosti rostlinných dehydrogenáz redukován na červený formazan. Semena, jejichž embrya se po inkubaci v tetrazoliové soli zbarví červeně, mají tedy propustnou testu a integumenty embrya a přitom jsou životaschopná. Zralá semena evropských druhů orchidejí neošetřená působením chlornanů nevykazují buď žádné zbarvení, anebo se podíl semen dávajících pozitivní reakci na TTC test pohybuje řádově v desetinách procenta (např. *Dactylorhiza maculata* – 0,2 %), jak uvádí VAN WAES A DEBERGH (1986a). Otázkou je, nakolik pozitivní reakce na TTC test koreluje s dosaženou klíčivostí semen (VAN WAES ET DEBERGH, 1986a; VAN WAES ET DEBERGH, 1986b). Problém spočívá v koncentracích endogenní ABA, které se mezi jednotlivými druhy liší ve značném rozpětí – např. semena *Spiranthes spiralis* obsahovala 1,29 µg (ABA).g⁻¹ čerstvé hmotnosti, zatímco u semen druhu *Ophrys apifera* tato hodnota činila 15,44 µg (ABA).g⁻¹ čerstvé hmotnosti (LUCKE ET BEBLER, 1997). Obsah ABA se působením chlornanů výrazně snižuje (LUCKE ET BEBLER, 1997), ovšem její aktuální hodnota se po působení chlornanů běžně nezjišťuje.

2.3.1.4 Skladování a životnost druhu *Liparis loeselii*

K výsevům jsou nejvhodnější semena vyvinutá na mateřské rostlině v přírodě a odebraná bezprostředně před výsevem v době optimální zralosti (JEŽEK, 1990).

2.3.1.5 Podmínky kultivace

U většiny médií je hodnota pH upravena na 5,2 – 5,5. Optimální teplota klíčení je 18 až 23 °C v plné tmě (MICHL, 1981). HARVAIS ET HADLEY (1967a) zjistili, že asymbiotické výsevy potřebují kultivační teploty pohybující se kolem 20 °C (při teplotách 23 - 29 °C pozorovali nejvyšší klíčivost) na rozdíl od symbiotických výsevů, pro které je vhodná teplota kolem 11 °C.

Některé evropské orchideje, např. druhy *Dactylorhiza*, přestávají růst 4 až 5 měsíců po vyklíčení a musejí být přeneseny na 8 – 12 týdnů do teploty 2 – 4 °C. Po jejich opětovném přenosu na 18 - 23 °C růst pokračuje a vyvábí se druhý list.

Většina druhů klíčí ve tmě. Světlo inhibuje klíčení většiny terestrických orchidejí (HARVAIS, 1973; RASMUSSEN ET AL., 1990).

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Metoda *in vitro*

3.1.1 Rostlinný materiál

Pro pokusy byla použita semena druhu *Liparis loeselii*, která byla odebrána v roce 1999 na lokalitě Shnilé louky. Stejně pokusy byly prováděny i u druhu *Dactylorhiza bohemica*, jejíž semena byla odebrána na Českolipsku v roce 2002. Všechna semena, resp. tobolky se semeny, odebrala Vejsadová, při úplné zralosti semen.

Následující experimenty byly provedeny ve Výzkumném ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví (VÚKOZ) v Průhonicích.

3.1.2 Uchovávání semen

Po odběru tobolek na lokalitě byla semena vysypána z tobolek a následně přemístěna do ampulí (viz. Přílohy, fotografie 7). Dále byla semena vysušena v Petriho miskách na vrstvě s bezvodým CaCl_2 po dobu 2 týdnů při teplotě 5 °C. Vysušená semena byla přesypána do ampulí a uchována v hermeticky uzavřených nádobkách se silikagelem při teplotě -20 °C (VEJSADOVÁ ET MALÁ, 1996) do doby výsevu. Dva týdny před výsevem byla semena přenesena do teploty 5 °C.

3.1.3 Příprava živného média

Jako výsevní a kultivační médium bylo použito upravené médium (VEJSADOVÁ ET AL. 2002), vycházejícího ze základního složení makroelementů podle Vlašínové (1988).

Tab. 6 Základní složení výsevních a kultivačních médií

	Výsevní médium (g.l ⁻¹)	Kultivační médium (g.l ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,216	0,216
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,246	0,246
KCl	0,150	0,150
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,029	0,029
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,132	0,132
Kys. citrónová	0,192	0,192
Biotin	0,001	0,001
Pyridoxin	0,001	0,001
Inositol	0,001	0,001
Kys. listová	0,001	0,001
Niacinamid	0,001	0,001
Ca pantothenát	0,001	0,001
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	-	0,019
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	-	0,014
Aktivní uhlí	1,00	1,00
Agar ROTH	12,00	-
Agar Sigma	-	7,5
Kasein hydrolyzát	0,50	0,50
Kvasničný extrakt	0,50	0,50
Sacharóza	20	25
Růstové regulátory		+
pH	5,3	5,3

3.1.4 Metoda asymbiotického výsevu semen na agarové médium

Den před výsevem byla semena vyjmuta z lednice a uchována při laboratorní teplotě kolem 20 °C. Povrchová sterilizace byla provedena asepticky ve flow boxu pomocí injekční stříkačky s jehlou. Semena sledovaného taxonu byla postupně protřepávána po dobu 3 min. v 70% etanolu, poté 40 min. v 0,5% roztoku NaClO (komerční přípravek Savo) s přídavkem 3 kapek smáčedla Tween 80. Po dobu 20 minut byla 3x proplachována ve sterilní destilované vodě až do odbarvení semen na barvu slonové kosti. Po posledním propláchnutí byla destilovaná voda vylita tak, aby ve stříkačce zbyla pouze semena. Pomocí bakteriologické kličky byla semena rozetřena na šikmý agar do zkumavek (viz. Přílohy, fotografie 6).

Každá zkumavka obsahovala 5 ml média. Semena klíčila v termostatu při teplotě 20 ± 2 °C (viz. Přílohy, fotografie 4).

3.1.5 Kultivace rostlin

Rostliny byly kultivovány v místnosti ve speciálních a důkladně popsanych sklenicích (viz. Přílohy, fotografie 8 a 9), při termoperiodě 22/18°C, intenzitě světla 2500 luxů a fotoperiodě 16/8 hod (viz Přílohy, fotografie 5)

3.1.6 Pokus č.1: Povrchová sterilizace semen

Byly zjišťovány vlivy dvou sterilizačních látek. 7,2% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 0,5% NaOCl a jejich kombinace se 70% etanolem na klíčivost semen u druhů *Liparis loeselii* a *Dactylorhiza bohemica*. Ve všech variantách byla doba působení filtrátu chlornanu vápenatého a roztoku chlornanu sodného cca 30 – 50 minut, do odbarvení hnědé barvy semene do zabarvení slonové kosti. 70% etanol byl použit po dobu 3 minut před působením vlastních sterilizačních látek. Každá varianta obsahovala 44 opakování. Jedno opakování bylo tvořeno 1 zkumavkou, obsahující 40 – 60 semen. Po 15 týdnech byly pomocí binokulátoru stanoveny počty vyvinutých protokormů a procenticky vyhodnoceny.

3.1.7 Pokus č. 2: Vliv růstových regulátorů na růst nadzemních částí a kořene

Po 15 týdnech byly protokormy přeneseny z výsevních médií na kultivační, obsahující jako zdroj dusíku standardní $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v základní koncentraci $0,132\text{g.l}^{-1}$; auxiny $2,46 \mu\text{M}$ IBA (kys. indolymáselná), $1,34 \mu\text{M}$ NAA (kys. naftyloctová), $1,43 \mu\text{M}$ IAA (kys. Indolyloctová); cytokyniny $1,11 \mu\text{M}$ BA (benzyladenin), $0,72 \mu\text{M}$ Zeatin, $1,16 \mu\text{M}$ kinetin. Byly sledovány účinky auxinů, cytokininů a auxinů ve spojení s cytokininy na růst semenáčů po 12 měsících. Subkultivace na médium shodného složení byla prováděna každé 3 měsíce. Každá varianta obsahovala 30 opakování (rostlin).

3.1.8 Pokus č.3: Vliv dusíku na růst semenáčů

Po 15 týdnech byly protokormy přeneseny z výsevních médií na kultivační, obsahující jako zdroj dusíku amonné ionty jako kontrolu a srovnávací varianty s adicí organického peptonu nebo aminokyselin. Vyhodnocení proběhlo po 12 měsících kultivace. Byl sledován

vliv základní koncentrace dusíku v kultivačním médiu ve formě anorganické soli $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0,132\text{g.l}^{-1}$), adice organického dusíku formou peptonu (1 g.l^{-1}) nebo aminokyselin v koncentraci 10 ml.l^{-1} (firma Sigma R 7131) na růstové parametry semenáčů. Standardní složkou organického dusíku byl u všech použitých médií také kvasničný extrakt a kaseinhydrolyzát. Subkultivace na médium shodného složení byla prováděna každé 3 měsíce. Každá varianta obsahovala 30 opakování (rostlin).

3.1.9 Statistické hodnocení

Výsledky byly statisticky zpracovány metodou jednocestné analýzy ANOVA a srovnávacího Duncanova testu na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

3.2 Metody pro fytoocenologické snímkování vegetace a analýzu vody NPR Ruda

3.2.1 Fytoocenologické snímkování vegetace NPR Ruda

Přibližně v místech vymezených souřadnicemi 49st,8', 57,02''N , 14st 41',1,83''E bylo provedeno fytoocenologické snímkování, a to ve dnech 21.9.2004, 29.8.2005 a 11.9.2006.

Velikost ploch pro fytoocenologické snímkování byla stanovena 100 m². Pro odhad početnosti jednotlivých druhů byl použita 9 členná Braun-Blanquetova stupnice. U vzácných druhů byl použit hrubý odhad početnosti populace na ploše.

Nomenklatura cévnatých rostlin byla použita dle DOSTÁLA (1989).

3.2.2 Chemická analýza vody NPR Ruda

Pro chemickou analýzu byla odebrána voda z přímé blízkosti nalezeného hlízovce. Odběr byl proveden 21.9.2004.

Stanovení aniontů bylo provedeno na průtokovém analyzátoru FIAstar, firma Tecator, Sweden, v Botanickém ústavu AV ČR Třeboň.

Stanovení aniontů bylo založeno na spektrofotometrické analýze vybarvených vzorků po chemické reakci. Intenzita zabarvení je úměrná koncentraci daných aniontů ve vzorku.

3.2.2.1 Stanovení N-NH₄

Kapalný vzorek s obsahem amonných iontů je smíchán s hydroxidem, kdy v zásaditém prostředí dojde k uvolnění plynného amoniku, který difunduje přes membránu. Separace vzorku od matrice odstraňuje rušivé vlivy sloučenin obsažených ve vzorku a umožňuje analýzu amonných iontů také u barevných vzorků.

Plynný amoniak reaguje s acido-basickým indikátorem na základě HI za vzniku NH₄⁺ a I⁻ iontů. Vzniklé žluté zabarvení je měřeno při vlnové délce 590 nm.

3.2.2.2 Stanovení N-NO₂⁻

Obsah dusitanů ve vzorku je stanoven po reakci se sulfanilamidem za vzniku diazotačního produktu a následnou kopulační reakcí s N-(1-naphtyl)-ethylenediaminem dihydrochloridem (NED). Růžové zabarvení vzorků je měřeno při vlnové délce 540 nm.

3.2.2.3 Stanovení NO_3^-

Dusičnany ve vzorku jsou redukovány na kadmiovém sloupci na dusitany a následně stanoveny dle metodiky pro dusitany při vlnové délce 540 nm.

3.2.2.4 Stanovení TPN (Total Nitrogen)

Vzorky jsou mineralizovány persulfátem draselným v přítomnosti kyseliny borité a hydroxidu sodného 30 min při teplotě 150°C. Mineralizace probíhá v semimikro měřítku. Anorganické i organické formy dusíku jsou mineralizací převedeny na N-NO_3^- .

Dusičnany jsou stanoveny po redukci na kadmiovém sloupci jako dusitany N-NO_2^- . Po reakci se sulfanilamidem a následnou kopulační reakcí s N-(1-naphtyl)-ethylenediaminem dihydrochloridem (NED). Růžové zabarvení vzorků je měřeno při vlnové délce 540 nm.

3.2.2.5 Stanovení TKN (organic kjeldhal nitrogen)

Vzorky jsou mineralizovány kyselinou sírovou v přítomnosti Se jako katalyzátoru v semimikro měřítku.

Organické formy dusíku jsou mineralizací převedeny na amonné ionty (N-NH_4^+), které jsou stanoveny spektrofotometricky po reakci plynného amoniaku s acido-bazickým indikátorem na průtokovém analyzátoru FIA při vlnové délce 590 nm.

3.2.2.6 Stanovení PO_4^{3-}

Orthofosforečnany reagují s molybdenanem amonným v kyselém prostředí za vzniku molybdenofosforečné kyseliny, která je v prostředí kyseliny sírové redukována chloridem cínatým. Výsledné intenzivní modré zabarvení produktu je měřeno při vlnové délce 690 nm.

3.2.2.7 Stanovení TPP (Total Phosphor)

Jednotlivé formy fosforu jsou persulfátovou mineralizací převedeny na orthofosforečnany. Orthofosforečnany reagují s molybdenanem amonným v kyselém prostředí za vzniku molybdenofosforečné kyseliny, která je v prostředí kyseliny sírové

redukována chloridem cínatým. Výsledné intenzivní modré zbarvení produktu je měřeno při vlnové délce 690 nm.

3.2.2.8 Stanovení TP (Total Phosphor)

Jednotlivé formy fosforu jsou mineralizovány v přítomnosti kyseliny chloristé. Po ukončení mineralizace je zbytek převeden do destilované vody a nerozpuštěné pyrofosfáty jsou hydrolyzované za zvýšené teploty. Veškerý fosfor je tímto převeden na fosforečnany, které jsou stanoveny na průtokovém analyzátoru.

Orthofosforečnany reagují s molybdenanem amonným v kyselém prostředí za vzniku molybdenofosforečné kyseliny, která je v prostředí kyseliny sírové redukována chloridem cínatým. Výsledné intenzivní modré zbarvení produktu je měřeno při vlnové délce 690 nm.

3.2.2.9 Stanovení Cl⁻

Chloridy ve vzorku reagují s rhodanidem rtuťnatým za vzniku aniontu thiokyanidu. Po reakci s třímocným kationtem železa vzniká žlutě zbarvený komplex, jehož zbarvení je měřeno při vlnové délce 463 nm.

4. VÝSLEDKY

4.1 Výsledky – *in vitro* metody

4.1.1 Vliv sterilizačních látek na tvorbu protokormů u vybraných druhů

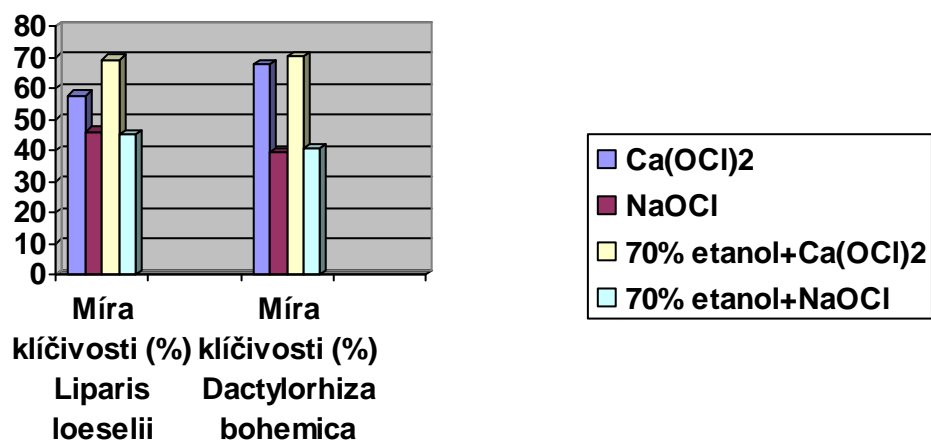
Účinek 7,2% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a 0,5% NaOCl na tvorbu protokormů byl vyjádřen procenticky jako míra klíčivosti semen (tab.5).

Tab.7. Vliv sterilizačních látek na míru klíčivosti sledovaných druhů po 15 týdnech inkubace semen

Druh	Sterilizační látka	Míra klíčivosti (%)
<i>Liparis loeselii</i>	$\text{Ca}(\text{OCl})_2$	57,72
	NaOCl	46,13
	70% etanol + $\text{Ca}(\text{OCl})_2$	69,44
	70% etanol + NaOCl	45,10
<i>Dactylorhiza bohemica</i>	$\text{Ca}(\text{OCl})_2$	67,72
	NaOCl	39,20
	70% etanol + $\text{Ca}(\text{OCl})_2$	70,22
	70% etanol + NaOCl	40,61

Výsledky prokázaly průkazný stimulační účinek 7,2% chlornanu vápenatého na tvorbu protokormů u uvedených druhů. Použitím chlornanu sodného u všech semen statisticky významně míru klíčivosti snížilo. Účinek 0,5% chlornanu sodného byl inhibiční – embrya byla ve velké míře poškozena a hodnoty klíčivosti byly výrazně nižší. Předpůsobení 70% etanolem mělo v přítomnosti $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ pozitivní, ale neprůkazný vliv na tvorbu protokormů u druhu *Dactylorhiza bohemica*, ale v případě druhu *Liparis loeselii* tato kombinace průkazně klíčivost podpořila. Míra klíčivosti se pohybovala v rozmezí 39,2 – 70,22%.

Graf 1 Vliv sterilizačních látek na míru klíčivosti sledovaných druhů po 15 týdnech inkubace semen



4.1.2 Vliv růstových regulátorů na růst nadzemních částí a kořene

4.1.2.1 Vliv auxinů

Tab.8 Vliv auxinů IBA, NAA a IAA v kultivačním médiu na délku nadzemní části, kořenů a počet listů po 12 měsících kultivace.

<i>Liparis loeselii</i>			
Auxiny	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
IBA	34,20 ± 0,50	24,90 ± 0,27	2,30
NAA	36,60 ± 0,51	25,60 ± 0,29	2,70
IAA	35,09 ± 0,49	21,20 ± 0,25	2,80
<i>Dactylorhiza bohemica</i>			
Auxiny	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
IBA	79,00 ± 0,27	51,60 ± 0,50	3,80
NAA	78,30 ± 0,27	60,50 ± 0,50	3,90
IAA	90,30 ± 0,26	54,80 ± 0,56	4,20

Po 12měsících působení auxinů v médiu byl zjištěn vyšší přírůstek nadzemní části v přítomnosti NAA. Délka kořene byla stimulována v přítomnosti NAA a počet listů nebyl žádným z testovaných auxinů ovlivněn.

4. Vliv cytokininů

Tab. 9 Vliv cytokininů BA, Zeatinu a Kinetinu v kultivačním médiu na délku nadzemní části, kořenů a počet listů po 12 měsících kultivace.

<i>Liparis loeselii</i>			
Cytokininy	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
BA	32,70 ± 0,23	20,50 ± 0,25	2,10
Zeatin	48,60 ± 0,21	21,80 ± 0,27	2,00
Kinetin	38,60 ± 0,24	19,50 ± 0,24	2,40
<i>Dactylorhiza bohemica</i>			
Cytokininy	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
BA	82,10 ± 0,31	41,60 ± 0,32	3,50
Zeatin	101,40 ± 0,23	50,00 ± 0,39	4,00
Kinetin	79,80 ± 0,34	51,70 ± 0,41	3,90

Cytokinin zeatin stimuloval růst nadzemních částí, ale nikoliv počet listů a růst kořenů.

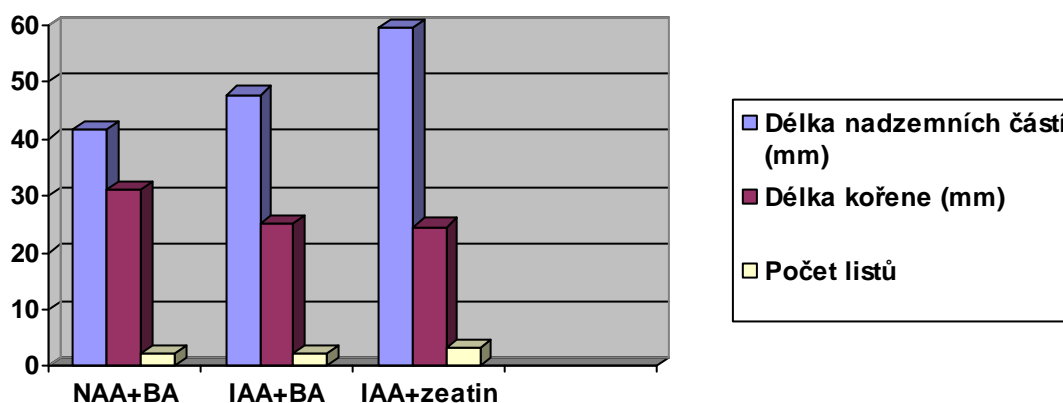
4.1.2.3 Vliv auxinů a cytokininů

Tab.10 Vliv auxinů a cytokininů v kultivačním médiu na délku nadzemní části, kořenů a počet listů po 12 měsících kultivace

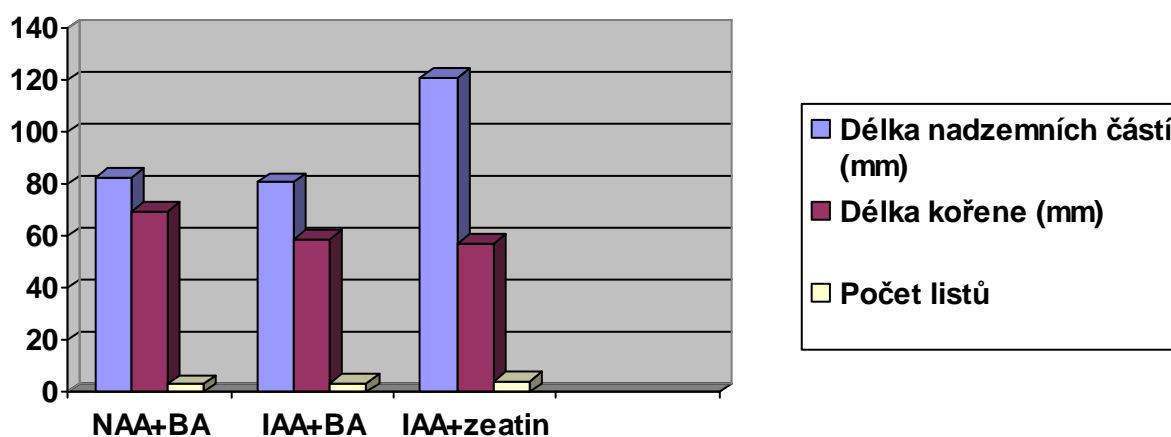
<i>Liparis loeselii</i>			
Auxiny Cytokininy	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
NAA + BA	41,6 ± 0,24	31,00 ± 0,27	2,20
IAA + BA	47,70 ± 0,27	25,10 ± 0,28	2,20
IAA + zeatin	59,60 ± 0,25	24,50 ± 0,27	3,30
<i>Dactylorhiza bohemica</i>			
Auxiny Cytokininy	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
NAA + BA	82,50 ± 0,29	69,80 ± 0,41	3,10
IAA + BA	80,70 ± 0,30	58,90 ± 0,48	3,50
IAA + zeatin	121,10 ± 0,28	57,50 ± 0,43	4,30

Po 12 měsících kultivace byly přírůstky průkazně nejvyšší u nadzemní části v přítomnosti auxinu IAA a cytokininu zeatinu, u kořene měla pozitivní růstový efekt kyselina naftyloctová (NAA) v kombinaci s benzyladeninem (BA). Multiplikace listů byla statisticky významně stimulována kyselinou indolyoctovou (IAA) ve spojení se zeatinem.

Graf 2 Vliv auxinů a cytokininů v kultivačním médiu na délku nadzemní části, kořenů a počet listů u druhu *Liparis loeselii*, po 12 měsících kultivace



Graf 3 Vliv auxinů a cytokininů v kultivačním médiu na délku nadzemní části, kořenů a počet listů u druhu *Dactylorhiza bohemica* po 12 měsících kultivace



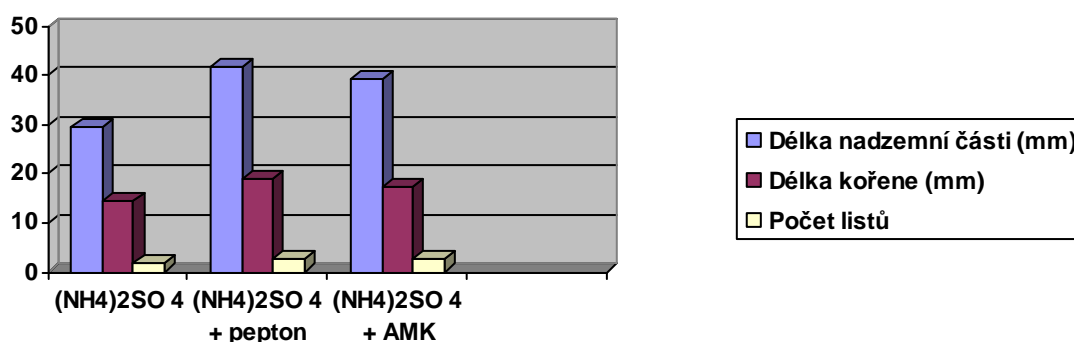
4.1.3 Vliv dusíku na růst semenáčů

Tab.11 Vliv dusíku v kultivačním médiu ve formě anorganické a s přidavkem peptonu nebo aminokyselin na růst semenáčů po 12 měsících kultivace.

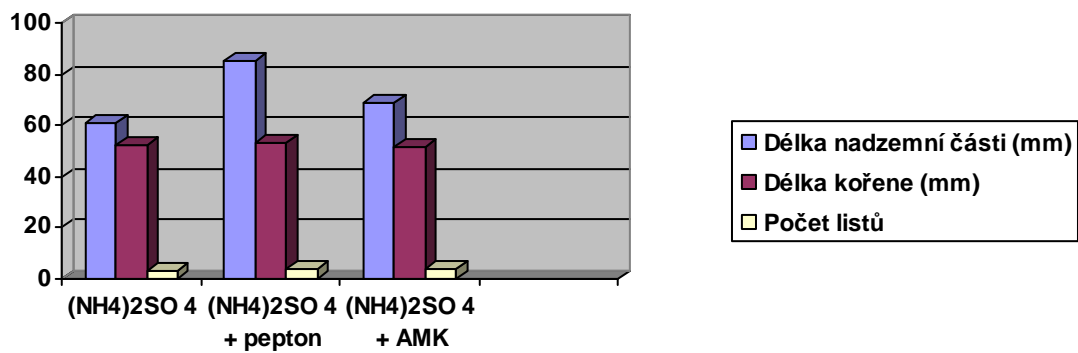
<i>Liparis loeselii</i>			
Forma dusíku	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
(NH ₄) ₂ SO ₄	29,60 ± 0,46	14,50 ± 0,50	2,00
(NH ₄) ₂ SO ₄ + pepton	41,80 ± 0,38	19,10 ± 0,53	2,66
(NH ₄) ₂ SO ₄ + AMK	39,10 ± 0,52	17,30 ± 0,58	2,50
<i>Dactylorhiza bohemica</i>			
Forma dusíku	Délka nadzemní části (mm) ± SD	Délka kořene (mm) ± SD	Počet listů/semenáč
(NH ₄) ₂ SO ₄	61,10 ± 0,90	52,10 ± 0,57	3,33
(NH ₄) ₂ SO ₄ + pepton	85,50 ± 1,03	53,50 ± 0,69	3,76
(NH ₄) ₂ SO ₄ + AMK	68,80 ± 0,91	51,40 ± 0,60	4,00

Růst nadzemní části semenáčů byl statisticky stimulován po 12 měsících kultivace adicí organické formy dusíku ve formě peptonu a také byl prokázán pozitivní účinek aminokyselin. Forma dusíku v uvedených koncentracích neměla tak významný vliv na růst kořenů a tvorbu listů.

Graf 4 Vliv dusíku v kultivačním médiu na délku nadzemní části, kořenů a počet listů u druhu *Liparis loeselii* po 12 měsících kultivace



Graf 5 Vliv dusíku v kultivačním médiu na délku nadzemní části, kořenů a počet listů na druh *Dactylorhiza bohemica* po 12 měsících kultivace



4.2 Výsledky - Fytocenologické snímky

Na lokalitě byly provedeny tři fytocenologické snímky (viz. Příloha 3), avšak pouze v roce 2004 jsem zaznamenala výskyt druhu *Liparis loeselii*.

Ze snímků je patrné, že *Liparis loeselii* roste v porostech společně s ostřicemi a dále na této lokalitě dochází k pomalé expanzi dřevin. Jedná se hlavně o druhy *Salix pentandra*, *Alnus glutinosa*, *Salix aurita*, *Salix cinerea* a také *Frangula alnus*.

4.3 Výsledky - Chemická analýza vody NPR Ruda

Tab.12 Chemická analýza vody, lokalita Ruda, odběr 21.9.2004

vodivost	NH⁴N	PO⁴P	NO²N	NO³N	pH
μS/cm	μg/l	μg/l	μg/l	μg/l	
35	148,892	23,654	5,812	11,679	5,58

V porovnání s chemickou analýzou NÁVRATILOVÉ (2004), se pH mého vzorku pohybuje na nižší úrovni, ale výrazně se neliší. Vodivost a množství aniontů se ve srovnání s výsledky NAVRÁTILOVÉ (2004) pohybují v průměrných hodnotách.

5. DISKUSE

Jedním z cílů této práce bylo najít vhodný způsob povrchové sterilizace zralých semen. K tomuto účelu se obecně používají sodné či vápenaté chlornany. Při nevhodné koncentraci či době působení se mohou semena nenávratně poškodit nebo naopak nedostatečně ošetřená semena nemohou klíčit. Na základě výsledků z předešlých pokusů (VEJSADOVÁ ET MALÁ, 1996; VEJSADOVÁ, 2001) byly vybrány dvě základní sterilizační činidla 7,2% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a 0,5% NaOCl (10% komerční přípravek Savo) ve spojení se 70 % etanolem. Testována byla klíčivost u druhů *Liparis loeselii* a *Dactylorhiza bohemica*. Doba působení filtrátu chlornanu vápenatého a roztoku chlornanu sodného cca 30 – 50 minut do odbarvení hnědé barvy semene do zabarvení slonové kosti. 70% etanol byl použit po dobu 3 minut před působením sterilizačních látek. Výsledky prokázaly stimulační účinek 7,2 % chlornanu vápenatého na tvorbu protokormů. Předpůsobení 70% etanolem mělo v přítomnosti $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ pozitivní, ale neprůkazný vliv na tvorbu protokormů u druhu *Dactylorhiza bohemica*, naopak u druhu *Liparis loeselii* tato kombinace klíčivost průkazně podpořila. Výsledné údaje jsou shodné s výsledky dosaženými u ostatních testovaných taxonů při různé době působení, která se lišila podle stupně zralosti semen.

Naše výsledky nepotvrzují nutné, několikahodinové působení chlornanu vápenatého, jak uvádí např. VAN WAES, DEBERGH(1986b), kteří použili nižší koncentraci $\text{Ca}(\text{OCl})_2$.

Důležitý je také způsob uchovávání semen od sklizně do výsevu. RASMUSSENOVÁ (1995) jako optimální vlhkost semen orchidejí uvádí 5 %. Toho může být dosaženo buď nasyceným vodným roztokem CaCl_2 , ve kterém se semena máčí po dobu 2 týdnů při teplotě 5°C nebo pomocí silikagelu při 2 °C. V mých pokusech byla semena přesypána do ampulí a uchována v hermeticky uzavřených nádobkách se silikagelem při teplotě -20°C (VEJSADOVÁ ET MALÁ, 1996) do doby výsevu.

Celý proces klíčení je ovlivněn mnoha faktory, u kterých nelze zcela jednoznačně určit podíl vlivu na dosažené výsledky, protože působí komplexně a nelze je posuzovat odděleně.

Na základě vlastních výsledků mohu potvrdit, že metody odběru semen, jejich uchovávání a ošetření před výsevem, stejně tak jako složení kultivačních médií jsou z hlediska produkce obou kultivovaných druhů plně funkční. Hledání dalších způsobů, vedoucích ke zvyšování klíčivosti nepovažuji za prioritní.

Jedním z dalších cílů mé práce bylo zjištění účinků formy a koncentrace dusíku a růstových regulátorů na růst semenáčů. Po 15 týdnech byly již vyvinuté protokormy

přeneseny z výsevních médií na média kultivační. Ta obsahují jako zdroj dusíku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nebo organický dusík ve formě peptonu/aminokyselin, popřípadě růstové regulátory auxiny a cytokininy. U druhu *Liparis loeselii* byl růst nadzemních částí stimulován peptonem v koncentraci 1g.l^{-1} a aminokyselinami. Forma dusíku neměla žádný vliv na růst kořenů. Inhibiční účinek aminokyselin uvádí MITRA (1989). V mých pokusech se však toto prokázat nepodařilo.

Po 12 měsících působení auxinů v kultivačním médiu jsem zjistila vyšší přírůstek nadzemních částí v přítomnosti auxinu IAA v koncentraci $1,43\mu\text{M}$. Růst kořenů byl stimulován auxinem NAA ($1,34\mu\text{M}$) s cytokininem BA ($1,11\mu\text{M}$). Cytokinin zeatin průkazně zvýšil růst nadzemních částí, ale nikoli počet listů a růst kořenů. Nejvyšší přírůstek nadzemních částí byl zjištěn v přítomnosti zeatinu a kyseliny indolyoctové (IAA). Tyto účinky potvrzuje i VEJSADOVÁ ET AL. (2002).

Nízké hodnoty směrodatné odchylky uváděné ve výsledných tabulkách pro *in vitro* metody jsou zřejmě způsobeny tím, že semena byla odebrána pouze z jedné lokality a pouze z jedné tobolky druhu *Liparis loeselii*. Toto a stejné růstové podmínky mohly způsobit malé rozdíly mezi rostlinami pěstovanými v *in vitro* podmínkách. V budoucnu by bylo zajímavé porovnání rostlin z odlišných tobolek, ale i odlišných lokalit.

Smyslem celé práce je převedení semenáčů získaných pomocí asymbiotických výsevů v kultuře *in vitro* do nesterilních podmínek, což naráží na mnoho úskalí. Procento úspěšnosti je závislé na zvolené metodě přenosu, velikosti a fázi vývoje rostlin, ale i na specifikách samotného rostlinného druhu. Čím více je daný druh orchideje závislý na mykotrofní výživě, tím je převod problematictější. Naopak druhy slabě mykotrofní, jako je např. *Cypripedium* sp., lze převádět bez větších problémů (MICHLE, 1981). Fáze vývoje ovlivňuje schopnost přežití rostliny a proto by rostliny měly mít dle mého názoru plně funkčně vyvinuty kořeny a listy. Metody převodů mají jedno společné, a to nutnost inokulace sterilních semenáčů vhodným houbovým endofytem. *Liparis loeselii* je druh na mykotrofii velmi závislý a zatím se nikomu nepodařilo převést jej do nesterilních podmínek. Proto považuji v další fázi výzkumu za prioritní zabývat se problematikou mykotrofie a následné repatriace tohoto druhu na jeho původní nebo jinak vhodné přírodní lokality.

Dále považuji za důležité, udržet jednotlivé populace druhu *Liparis loeselii* na stávajících lokalitách, což je možné realizací tzv. „Záchranných programů“, řízených Správami CHKO a Agenturou ochrany přírody a krajiny (AOPK). Velice důležitý je především vhodný management, protože s ubývajícími srážkami, vyššími teplotami, nálety dřevin, atd., lokality nevratně mizí. To potvrzuje i PROCHÁZKA ET VELÍSEK (1983).

Jedním z dalších cílů bylo provedení fytoocenologických snímků na lokalitě Ruda, avšak pouze v roce 2004 jsem zaznamenala výskyt druhu *Liparis loeselii*. Hlízovec byl nalezen přibližně na stejném místě, jako jej našel RYBENSKÝ v letech 1982 – 1994. Jedná se o místo, které RYBENSKÝ(2000) pojmenoval “u lesíka” (viz Přílohy, mapa 3). Z provedených snímků je patrné, že *Liparis loeselii* roste v porostech společně s ostřicemi a stejně je tomu i v případě lokality Shnilé louky. Zde se *Liparis loeselii* vyskytoval na místech, kde rostl druh *Carex diandra*, zřejmě proto, že jsou oba druhy náročnější na minerální výživu (KUBÁT, 2000).

V průběhu let fytoocenologického snímkování jsem pozorovala, že na lokalitě Ruda dochází k pomalé expanzi dřevin. Jedné s hlavně o druhy *Salix pentandra*, *Alnus glutinosa*, *Salix aurita*, *Salix cinerea* a také *Frangula alnus*. KUBÁT (2000) zjistil, že na lokalitě Shnilé louky taktéž dochází k expanzi, a to rákosu na mokrá až trvale mělce zaplavená místa a dále expanze dřevin, především *Betula pendula* a *Pinus sylvestris* na sušší místa.

V přímé blízkosti od nalezeného druhu *Liparis loeselii* byl odebrán vzorek vody. V porovnání s chemickou analýzou NAVRÁTILOVÉ (2004), se pH mého vzorku pohybuje na nižší úrovni, ale výrazně se neliší. NAVRÁTILOVÁ (2004) zjistila, že pH lokality Ruda během roku kolísá. Zjistila, že se pH od dubna do června zvyšuje a koncem léta opět klesá na původní hodnoty. *Liparis loeselii* roste při pH 4,9-8,5, takže naměřené pH 5,58 by nemělo mít negativní vliv na výskyt tohoto druhu na této lokalitě. Vodivost a množství naměřených aniontů se ve srovnání s výsledky NAVRÁTILOVÉ pohybují v průměrných hodnotách.

6.ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabývala množением terestrických orchidejí metodou asymbiotických výsevů v kulturách *in vitro*. V pokusech jsem použila semena našich domácích druhů orchidejí, a to *Liparis loeselii* a *Dactylorhiza bohemica*.

Cílem bylo zjistit jaký mají vliv 1) sterilizační látky na tvorbu protokormů u vybraných druhů, 2) růstové regulátory na růst nadzemních částí a kořene 3) dusík na růst semenáčů.

U pokusu č.1 prokázaly výsledky stimulační účinek 7,2% chlornanu vápenatého na tvorbu protokormů u uvedených druhů. Použitím chlornanu sodného u všech semen statisticky významně míru klíčivosti snížilo. Účinek 0,5% chlornanu sodného byl inhibiční – embrya byla ve velké míře poškozena a hodnoty klíčivosti byly výrazně nižší. Předpůsobení 70% etanolem mělo v přítomnosti $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ pozitivní, ale neprůkazný vliv na tvorbu protokormů u druhu *Dactylorhiza bohemica*, ale v případě druhu *Liparis loeselii* tato kombinace průkazně klíčivost podpořila. Míra klíčivosti se pohybovala v rozmezí 39,2 – 70,22%.

Při pokusu s růstovými regulátory bylo zjištěno, že při působení auxinů v médiu, vykazuje vyšší přírůstek nadzemní části přítomnost auxinu NAA. Délka kořene byla stimulována v přítomnosti NAA a počet listů nebyl žádným z testovaných auxinů ovlivněn. Cytokinin zeatin stimuloval růst nadzemních částí, ale nikoliv počet listů a růst kořenů. Při kombinacích auxinů s cytokininy byly přírůstky průkazně nejvyšší u nadzemní části v přítomnosti auxinu IAA a cytokininu zeatinu, u kořene měla pozitivní růstový efekt kyselina naftyloctová (NAA) v kombinaci s benzyladeninem (BA). Multiplikace listů byla statisticky významně stimulována kyselinou indolyoctovou (IAA) ve spojení se zeatinem.

Při zjišťování vlivu dusíku na růst nadzemní části semenáčů bylo zjištěno, že je růst statisticky stimulován adicí organické formy dusíku ve formě peptonu a také byl prokázán pozitivní účinek aminokyselin. Forma dusíku v uvedených koncentracích neměla tak významný vliv na růst kořenů a tvorbu listů.

Jedním z dalších cílů bylo provedení fytoocenologických snímků na lokalitě Ruda, avšak pouze v roce 2004 jsem zaznamenala výskyt druhu *Liparis loeselii*. Z provedených snímků je patrné, že *Liparis loeselii* roste v porostech společně s ostřicemi a dále na této lokalitě dochází ke značnému náletu dřevin. Jedná se o druhy *Salix pentandra*, *Alnus glutinosa*, *Salix aurita*, *Salix cinerea* a také *Frangula alnus*.

V přímé blízkosti od nalezeného druhu *Liparis loeselii* byl odebrán vzorek vody. V porovnání s chemickou analýzou NÁVRATILOVÉ (2004), se pH mého vzorku pohybuje

na nižší úrovni (pH 5,58), ale výrazně se neliší. Vodivost a množství aniontů se ve srovnání s výsledky NAVRÁTILOVÉ (2004) pohybují v průměrných hodnotách.

7. SEZNAM LITERATURY

ADAMEC L. (2007), *in verb*

ALBRECHT J. (1985): Inventarizační průzkum SPR Ruda – Vegetační kryt. – Ms. 77 pp.+ přílohy (Depon in: AOPK ČR, Praha).

ALEXANDER C., HADLEY G. (1984): The effect of mycorrhizal infection of *Goodyera repens* and its control by fungicide. – *New Phytologist* 97: 391 – 400.

ANDERSEN T. F., RASMUSSEN H. N. (1996): The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular, biology, ecology, pathology and disease control*. Netherlands: Kluwer Academic, 379 – 390 pp.

ARDITTI J., ERNST R. (1984): Physiology of germinating orchid seeds. In: *Orchid biology. Rewies and perspectives III.*, J. Arditti (eds.) Ithaca. USA: Cornell University Press, 197 – 200 pp.

ARDITTI J., ERNST R., YAM T. W., GABLE C. (1990): The contribution of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. – *Lindleyana* 5: 249 – 255.

BALÁŽ M. (1999): Orchideoidní mykorrhiza – mýty a skutečnost. – *Roezliana* 28: 48 – 51.

BURGEFF H. (1959): Mycorrhiza of orchids. In: Withner, C.L. (ed.) *The orchids*. New York: The Roland Press.

BURKHARD J. (1987): Minerální výživa evropských orchidejí. – *Roezliana* 20: 17 – 20.

BUTCHER D., MARLOW S. A. (1989): Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. In: Pritchard H.W. (ed.) *Modern methods in orchid conservation – the role of physiology, ecology and management*. Cambridge: Cambridge University Press, 31– 38 pp.

CLEMENTS M. A. (1988): Orchid mycorrhizal associations. – *Lindleyana* 3: 73 – 86.

DIJK, E., ECK, N. (1995a): Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist* 131: 361-367.

DIJK, E., ECK, N. (1995b): Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus responses of some Dutch marsh orchids. *New Phytologist* 131: 353-359.

DIJK E., WILLEMS J., VAN ANDEL J. (1997): Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species. – *Acta Bot. Neerl.* 46: 339 – 363.

DOSTÁL J. (1989): *Nová květena ČSSR*. – Academia, Praha.

DUŠEK J., KRÍSTEK J. (1986): *Orchideje*. – Academia, Praha.

- FAST G. (1980): Vermehrung und Anzucht. In: Fast, G. (ed.) Orchideenkultur, Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen. Stuttgart: Ulmer. 207 – 223 pp.
- HADLEY G. (1970): The interaction of kinetin, auxin and other factors in the development of north temperate orchids. – *New Phytologist* 69: 549 – 555.
- HADLEY, G., WILLIAMSON, B. (1971): Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 70: 445-455.
- HADLEY, G. (1975): Organization and fine structure of orchid mycorrhiza. In: Sanders, F.E., Moose, B., Tinker, P.B. (eds.) *Endomycorrhizas*. London: Academic Press Inc. pp. 335-351.
- HARVAIS G. (1973): Growth requirements and development of *Cymbidium reginae* in axenic culture. – *Can. J. Bot.* 51: 327 – 332.
- HARVAIS, G., HADLEY, G. (1967a): The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist* 66: 217-230.
- HARVAIS, G., HADLEY, G. (1967b): The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytologist* 66: 205-215.
- HONCŮ M. (1995): Vstavačovité (Orchidaceae) Českolipska.- Bezděz, Česká Lípa, 3: 91-167.
- HONCŮ M., JÓŽA M. (1995): Ohrožené druhy vstavačovitých na Dokesku. - *Živa*, 43:62-63.
- HOLUB J., CHÁN V., PROCHÁZKA F., ŠTECH M., ŽÍLA V. (1999): Komentovaný červený a černý seznam květeny jižní části Čech. *Příroda*, Praha
- JATIOVÁ M., ŠMITÁK J. (1996): Rozšíření a ochrana orchidejí na Moravě a Slezsku. – Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha.
- KUBÁT K. (2000): *Liparis loeselii* (L.) L.C. Richard u Jestřebí. – Severočeskou přírodou, 2000, č. Příloha 12 – Flóra a vegetace mokřadu na Českolipsku.
- LINDÉN, B. (1992): Two new methods for pretreatment of seeds Northern orchids to improve germination in axenic culture. *Ann. Bot. Fennici* 29: 305-313.
- LUCKE E., BEBLER B. (1997): Ist Abscisinsäure verantwortlich für die Keimhemmung von Orchideensamen. – *Gartenbauwissenschaft* 62: 189 – 190.
- MALMGREN S. (1996): Orchid propagation: theory and practice. In: North American native terrestrial orchids – propagation and production. 63 – 71pp.
- MICHL J. (1981): Pěstování a množení evropských orchidejí. – *Roezliana* 12: 29 – 41.
- MITCHELL, R.B. (1989): Growing hardy orchids from seeds at Kew. *The Plantsman* 11: 152-169.

- MITRA G. C. (1989): *In vitro* culture of orchid seeds for obtaining seedlings. – In: Vij, S.P. (ed.) *Biology, conservation, and culture of orchids.* - East – West Press pvt ltd, pp. 401-409.
- MIYOSHI, K., MII, M. 1995b. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in symbiotic culture. *Scientia Horticulturae* 63: 263-267.
- MÖLLER O. (1987): Od semen až k první pravé hlíze: protokormové stádium *Orchis mascula*. – *Die Orchidee* 38: 298-301. In *Roezliana* 22: 38 – 40, 1988.
- NAVRÁTILOVÁ J. (2004): Ekologie vegetace rašelinných okrajů rybníků Třeboňské pánve. - In: Konference České botanické společnosti "Doktorandské inspirace v botanice". 20.-21. listopadu 2004, Praha, p. 39.
- NAVRÁTILOVÁ J. ET NAVRÁTIL J. (2005): Stanovištní nároky ohrožených a vzácných rostlin rašelinišť Třeboňska. – *Zpráva Čes. Bot. Společ.* 40: 275-299.
- NOVÁK F. J. (1990): *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin.* – Academia, Praha.
- PETERSON R. L., UETAKE Y., ZELMER C. (1998): Fungl symbiose with orchid protocorms. – *Symbiosis*, 25:29-55.
- POTŮČEK O., ČAČKO L. (1996): *Všechno o orchidejích.* – Slovart s.r.o, Praha.
- POKORNÝ J., SMRTOVÁ E., KAŽMIERSKI T. (2003): *Natura 2000.* – Regionální environmentální centrum Česká republika.
- PRITCHARD, H.W. (1984): Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *Cryo-Letters* 5: 295-300
- PROCHÁZKA F. (1980a): Jak poznáme naše orchideje. – *Roezliana* 11, 13 – 16.
- PROCHÁZKA F. (1980b): *Naše orchideje.* – Krajské muzeum východních Čech, Pardubice.
- PROCHÁZKA F., VELÍSEK V. (1983): *Orchideje naší přírody.* – Academia, Praha.
- PROCHÁZKA F. a kol. (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). *Příroda*, 18: 1–166.
- PROCHÁZKA F., ČERNOHOUS F. (1985): Rozšíření a ekologie *Liparis loeselii* (L.) L.C. Rich. v Československu.- *Čas. Nár. Muz., Praha, sect. natur.*, 154: 10-30.
- PURVES S., HADLEY G. (1976): The physiology of symbiosis in *Goodyera repens*. – *New Phytologist* 77: 689 – 696.
- RASMUSSEN H. N. (1990): Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt a Summerh. (Orchidaceae) during germination in vitro. – *New Phytologist* 116: 137 – 147.

- RASMUSSEN H. N. (1995): Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. – Cambridge University Press, Cambridge.
- REKTORIS L. (2006), *in verb.* Mgr. Ladislav Rektoris, botanik Správy CHKO Třeboňsko, Třeboň
- RYBENSKÝ J. (2007), *in verb.* Mgr Jiří Rybenský, člen Jihočeské pobočky České botanické společnosti, Č. Budějovice
- SMITH S. E. (1967): Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. – *New Phytologist* 66: 371 – 378.
- SMITH S. E., READ D. J. (1997): Mycorrhizal symbiosis. – Academic Press Limited, London.
- ŠTECHOVÁ T. (2005a): Monitoring druhu druhu *Hamatocaulis vernicosus* rok 2005. – Ms., 151pp. + přílohy (Depon in AOPK CR Praha).
- ŠTECHOVÁ T. (2005b): Ekologická studie druhu *Hamatocaulis vernicosus* (*Amblystegiaceae*, *Bryophyta*) a návrh managementu na jeho lokalitách.
- TROST M. (1985): Předpisy pro živné půdy – kouzelná formulka nebo střízlivá realita? – *Die Orchidee* 18: 56-64. In: *Roetziana* 19: 21 – 25, 1986.
- UETAKE Y., PETERSON R. L. (1997): Changes in actin filament arrays in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*, induced by the symbiotic fungus *Ceratobasidium cornigerum*. – *Can. J. Bot.* 75: 1661 – 1669.
- VAN WAES, J.M. (1984): *In vitro* studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideen. Thesis. Rijkuniversiteit Gent.
- VAN WAES J. M., DEBERGH P. C. (1986a): Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. – *Physiol. Plant.* 66: 435 – 442.
- VAN WAES J. M., DEBERGH P. C. (1986b): *In vitro* germination of some Western European orchids. – *Physiol. Plant.* 67: 253 – 261.
- VEJSADOVÁ H. (2004), *in verb*
- VEJSADOVÁ H. (2001): Endangered orchid conservation using *in vitro* method. – In: [www.Plantaeuropa.org/html/conference 2001/docs/Vejsadova-ENDANGERED.doc](http://www.Plantaeuropa.org/html/conference%202001/docs/Vejsadova-ENDANGERED.doc)
- VEJSADOVÁ H., MALÁ M. (1996): Zjištění klíčivosti semen v aseptických podmínkách u některých ohrožených druhů z čeledi vstavačovitých (*Orchidaceae*). *Acta Průhoniciana*, 63: 77–84.
- VEJSADOVÁ H. (1997a): Klíčivost semen terestrických orchidejí v aseptických podmínkách. - In: Kindlmann P., Jersáková J., Balounová Z. (eds.): *Populační dynamika a*

ekologie terestrických orchidejí, p. 49–54. Biologická fakulta Jihočeské university, České Budějovice.

VEJSADOVÁ H. (1997b): Klíčivost terestrických orchidejí v aseptických podmínkách. –In: Vlčko J., Hrivnák R. (eds.): Evropské vstavačovitě (*Orchidaceae*)- výskum a ochrana, p. 76–80. Slovenská agentúra životného prostredia, Banská Bystrica.

VEJSADOVÁ H., DOSTÁLEK J., LÁTALOVÁ K. (1998): Ekologie a reintrodukce kriticky ohroženého taxonu *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó subsp. *Maculata* (*Orchideaceae*) v severních Čechách. – Acta Průhoniciana, 66: 53-64.

VEJSADOVÁ H., LÁTALOVÁ K., ŘÍZKOVÁ R. (2002): Význam růstových regulátorů při kultivaci semenáčů terestrických orchidejí v podmínkách *in vitro*. – Acta Průhoniciana, 73: 27-36.

VLAŠÍNOVÁ H. (1988): Metodika generativního množení *Orchis morio* v aseptických podmínkách. – Metodický materiál ČÚOP v Brně, Brno.

YAM T. W., ERNST R., ARDITTI J., NAIR H., WEATHERHEAD M. A. (1990): Charcoal in orchid seed germination and tissue culture media: a review. – Lindleyana 5: 256 – 265.

ZÁKREJS J. (1980): Orchidey. – Příroda, Bratislava.

Online zdroje:

Evropsky významné lokality v České Republice, seznam lokalit, 23.7.2007

<http://www.nature.cz>

Mapový server Ministerstva životního prostředí, geoportal.cenia.cz, 20.9.2007

<http://www.geoportal.cenia.cz>

8. PŘÍLOHY

Seznam příloh

Mapy: Mapa 1) Rozšíření druhu *Liparis loeselii*

Mapa 2) Lokalita Ruda

Mapa 3) Místa výskytu druhu *Liparis loeselii*, lokalita Ruda (RYBENSKÝ, 2007)

Mapa 4) Jestřebsko - Dokesko

Mapa 5) Podtrosecká údolí

Mapa 6) Byšičky

Mapa 7) Březová – Kalábová

Mapy byly převzaty z online zdroje, 23.7.2007, mapa č.3 převzata z mapového serveru Ministerstva životního prostředí ČR (geoportal.cenia.cz, 20.9.2007)

Fotografie:

- 1) Lokalita Ruda, celkový pohled
- 2) Železité sraženiny, lokalita Ruda
- 3) *Liparis loeselii*, zralé tobolky, lokalita Ruda
- 4) Termostat pro klíčení semen
- 5) Kultivační místnost s *in vitro* kulturami
- 6) Asymbiotický výsev na zašikmeném výsevním médiu
- 7) Vyjmutí semen z tobolek a následné přemístění do ampulí
- 8) Označení sklenic po výsevu
- 9) Semenače druhu *Liparis loeselii* po 12 měsících růstu

Fotografie byly pořízeny na lokalitě Ruda a v laboratoři Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví (VÚKOZ) v Průhonicích.

Veškeré fotografie zhotovila Jana Pavlová.

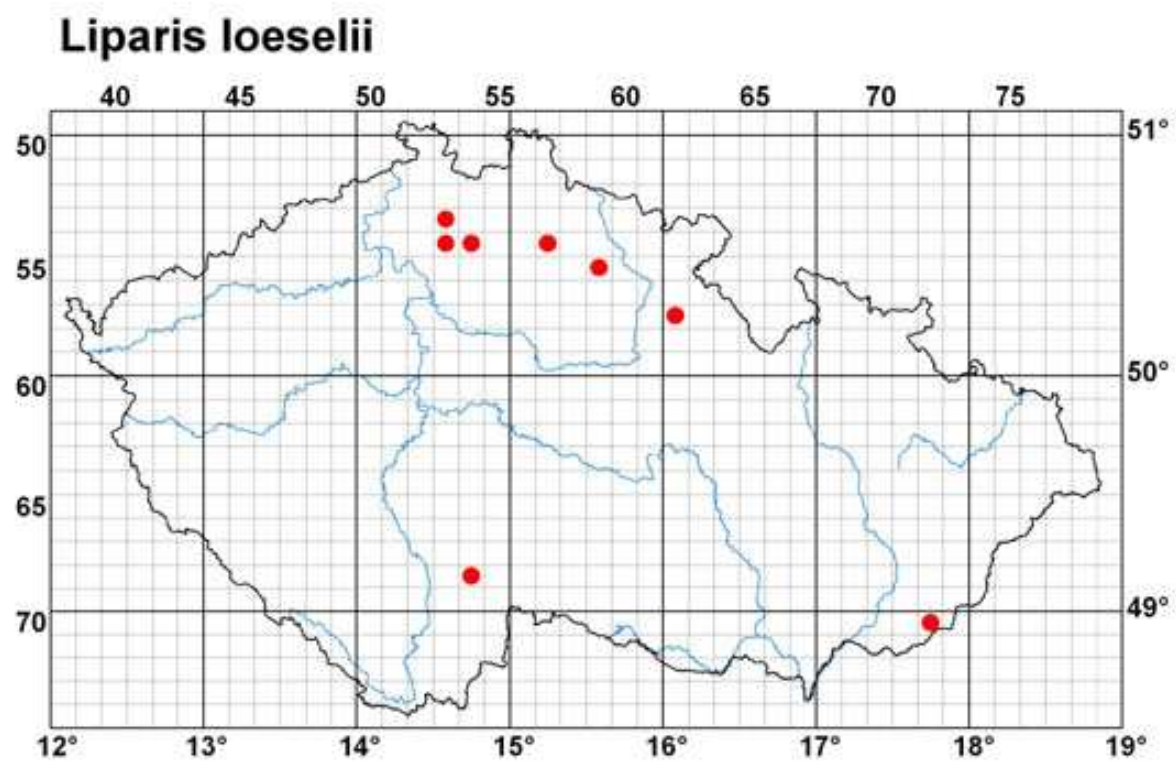
Fytocenologické snímky:

Fytocenologický snímek č.1

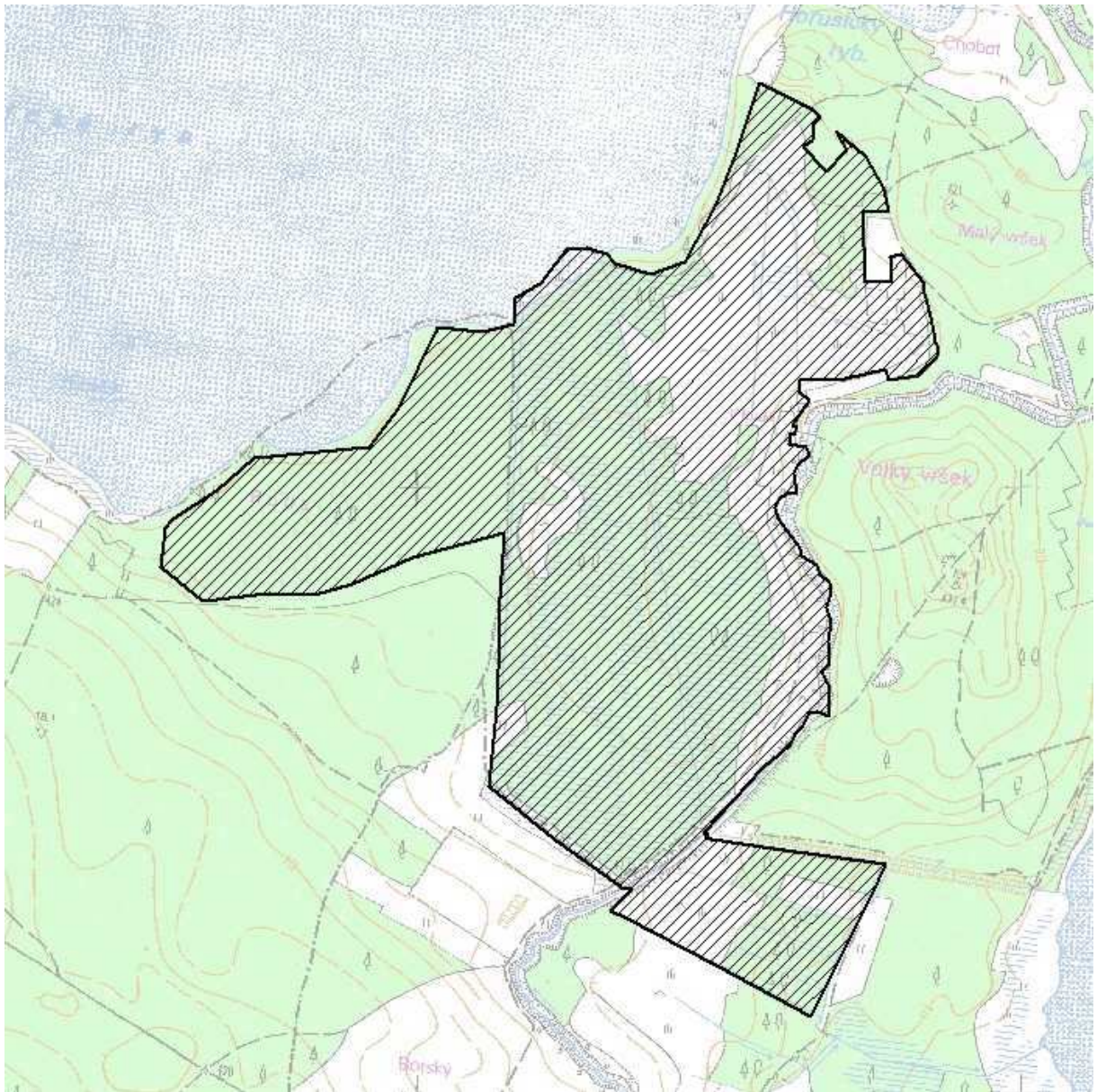
Fytocenologický snímek č.2

Fytocenologický snímek č.3

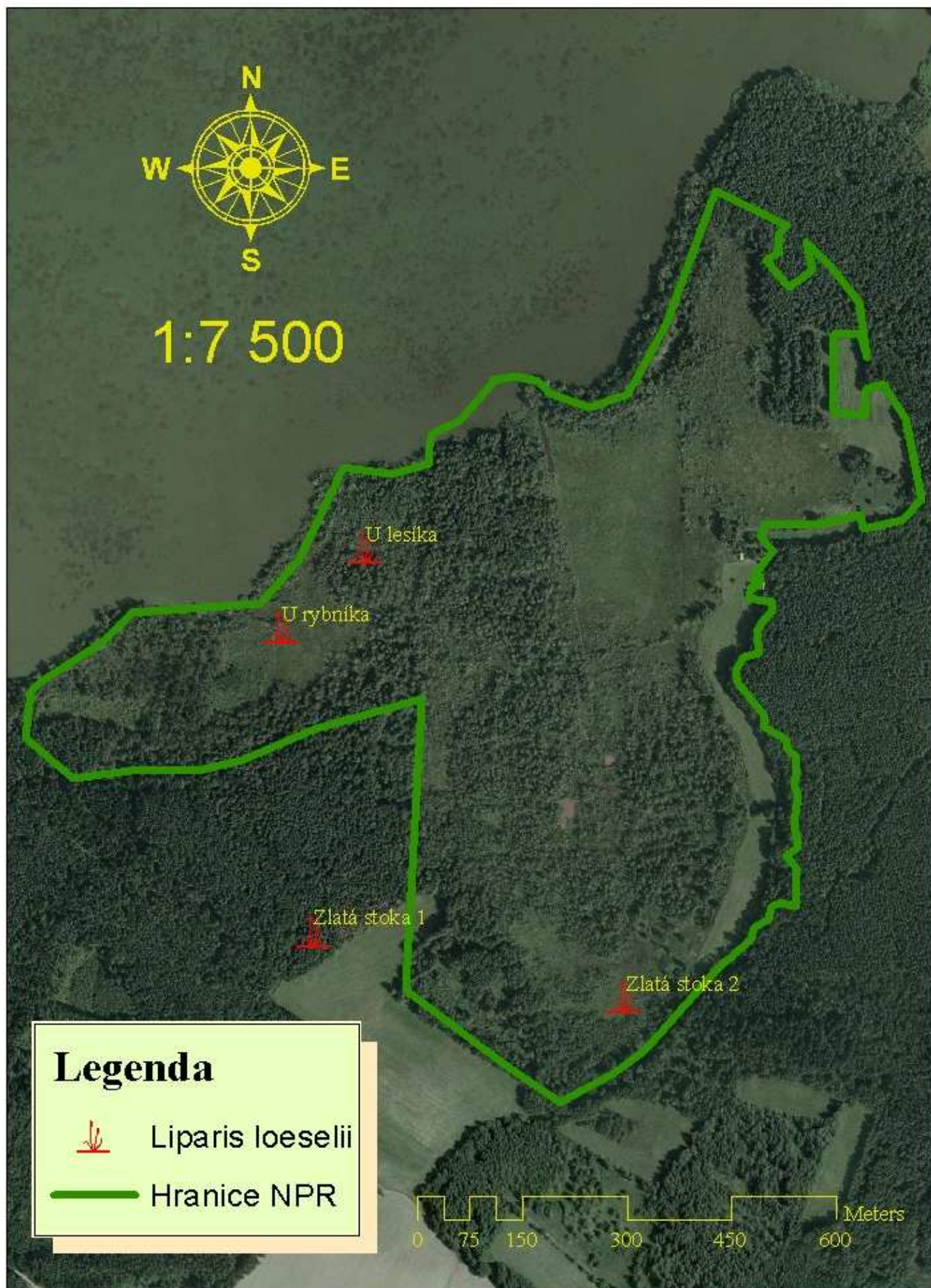
8.1 Mapy



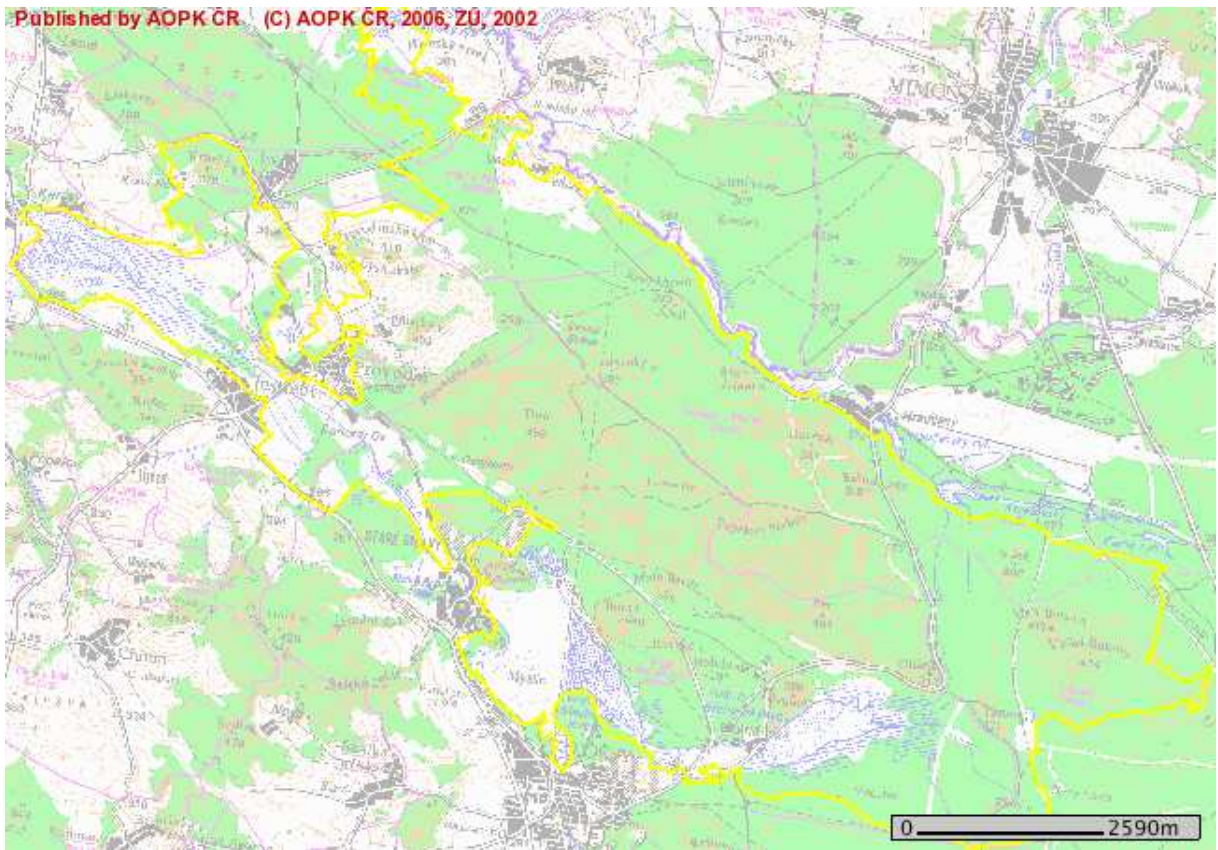
Mapa 1: Rozšíření druhu *Liparis loeselii* (AOPK, 2003)



Mapa 2: Lokalita Ruda (AOPK, 2003)

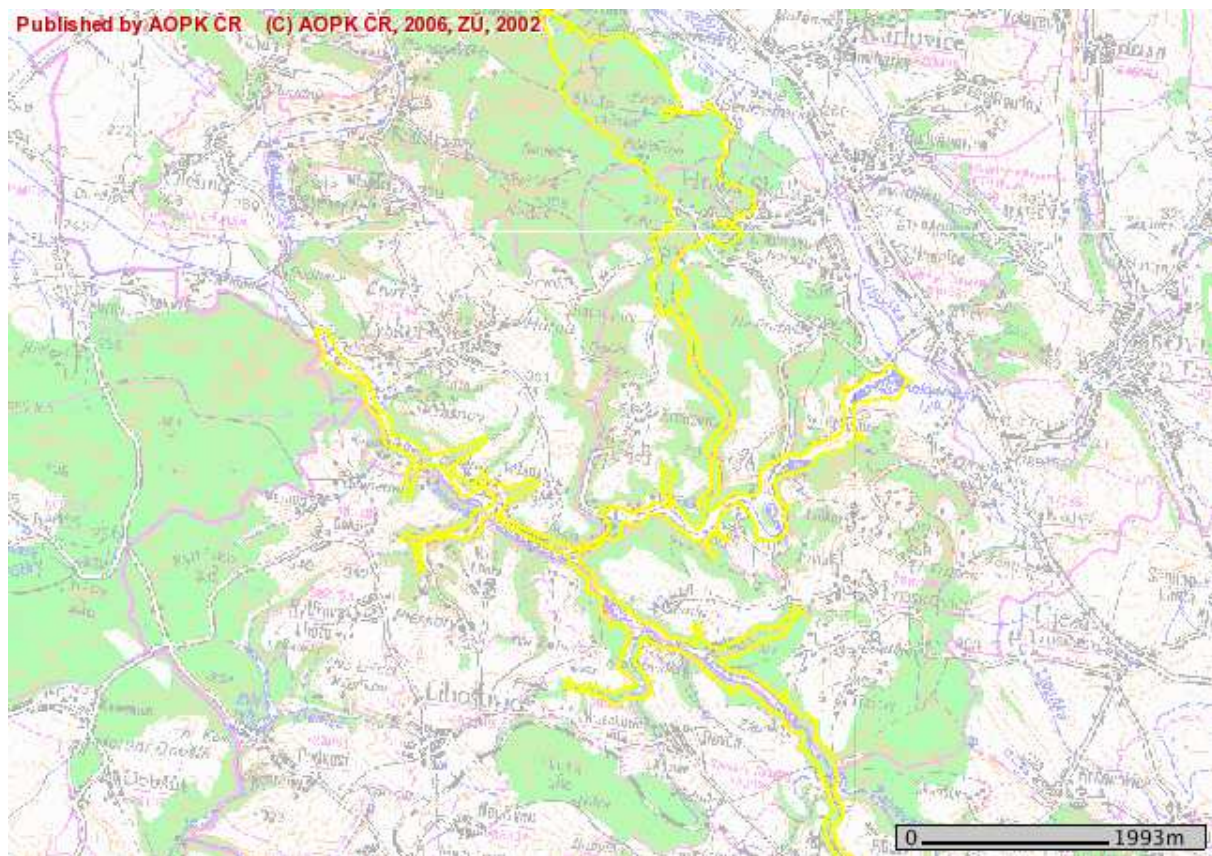


Mapa 3: Místa výskytu druhu *Liparis loeselii*, lokalita Ruda (souřadnice dle RYBENSKÉHO, 2007)

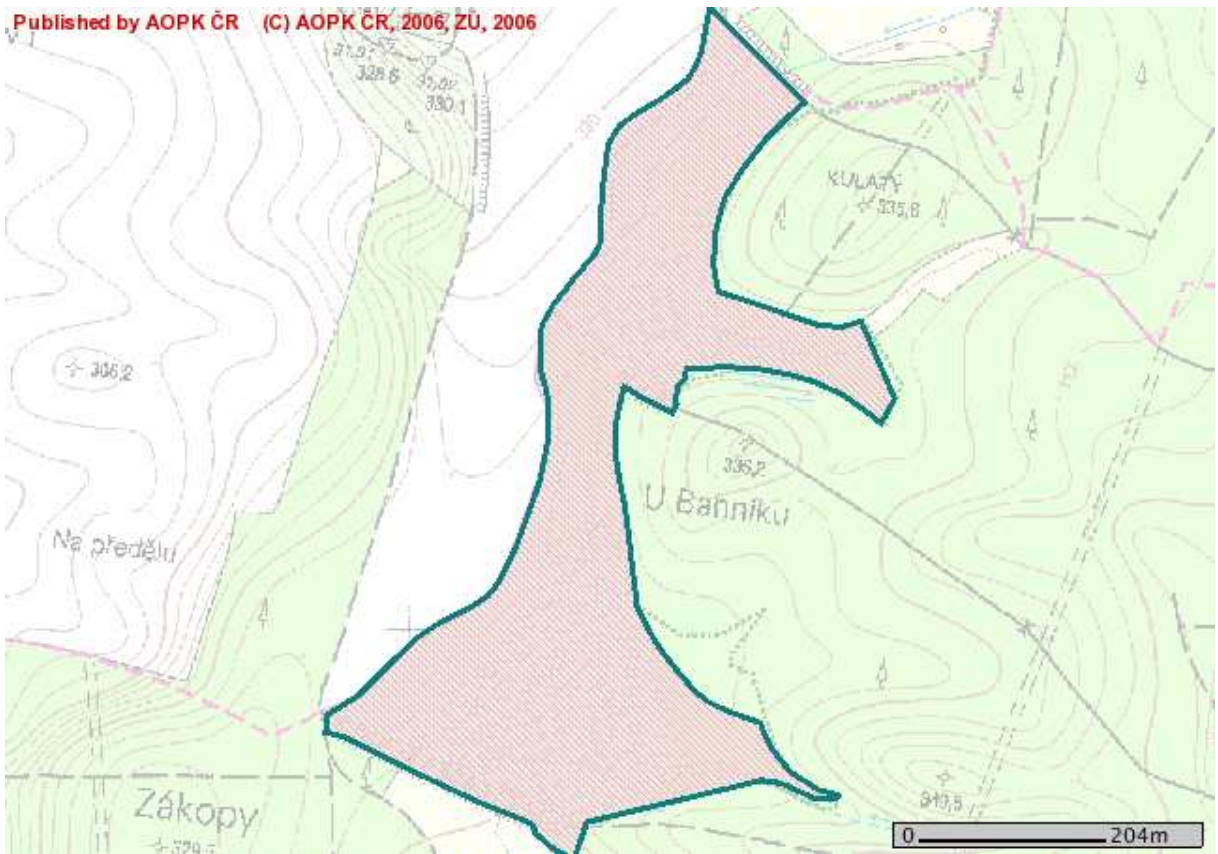


Mapa 4: Jestřebsko – Dokesko (AOPK, 2003)

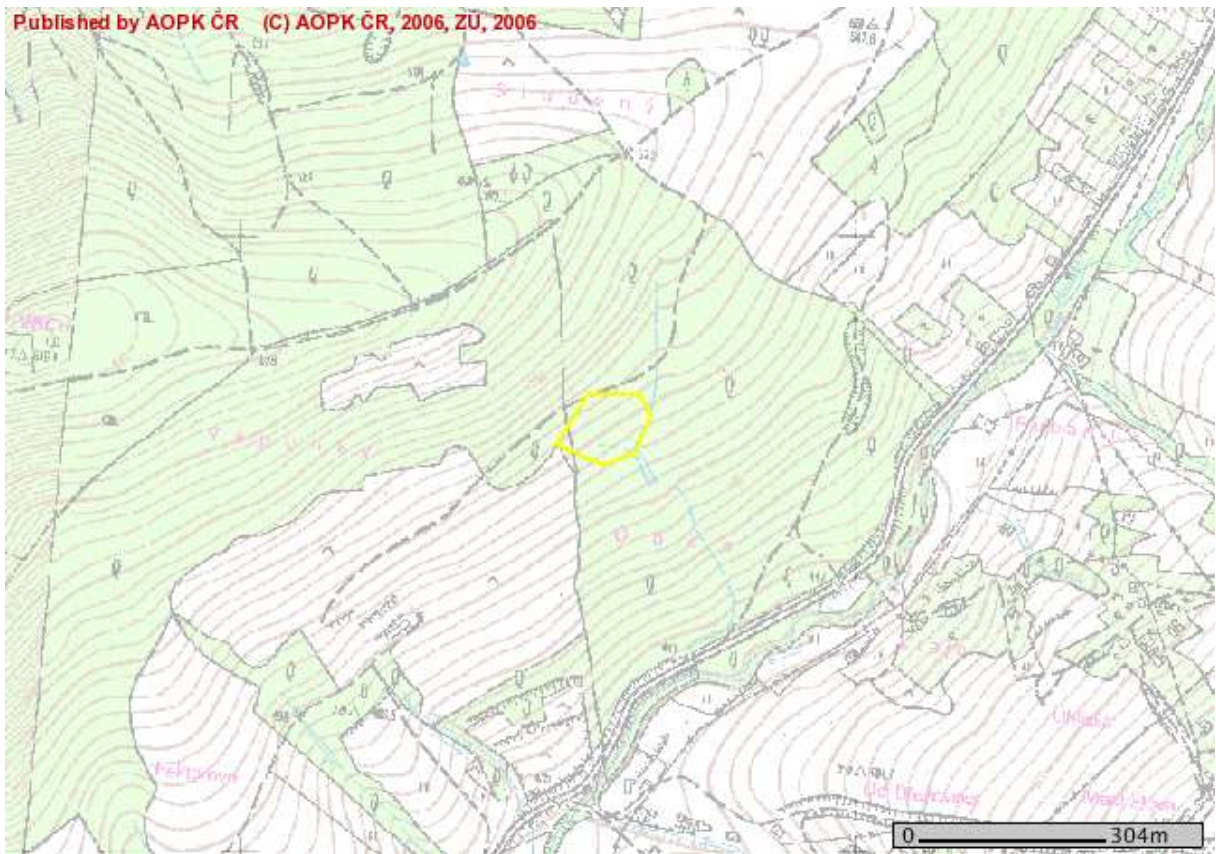
Published by AOPK ČR (C) AOPK ČR, 2006, ZÚ, 2002



Mapa 5: Podtrosecká údolí (AOPK, 2003)



Mapa 6: Byšičky (AOPK, 2003)



Mapa 7: Březová – Kalábová (AOPK, 2003)

8.2 Fotografie



1: Lokalita Ruda, celkový pohled, 21.9.2004



2: Železité sraženiny, lokalita Ruda. 21.9.2004



3: *Liparis loeselii*, zralé tobolky, lokalita Ruda, 21.9.2004



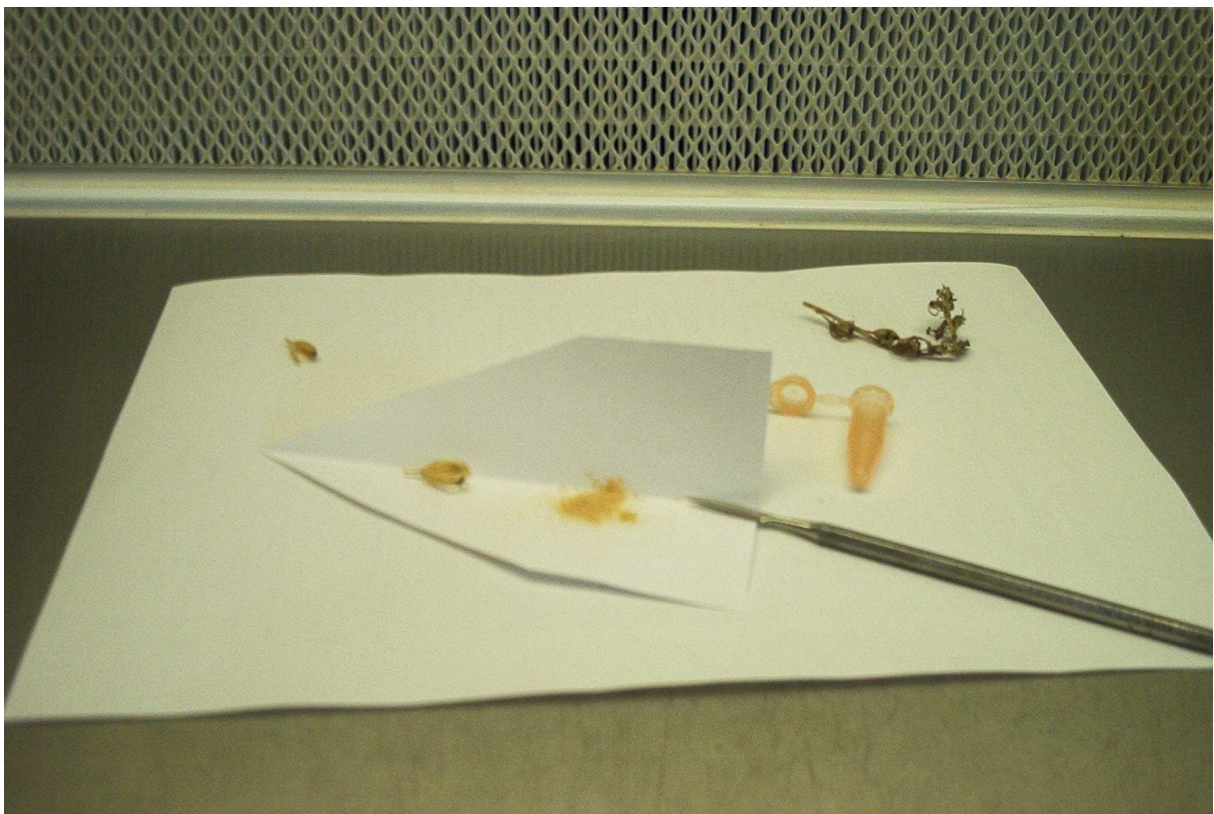
4: Termostat pro klíčení semen, 25.6.2007



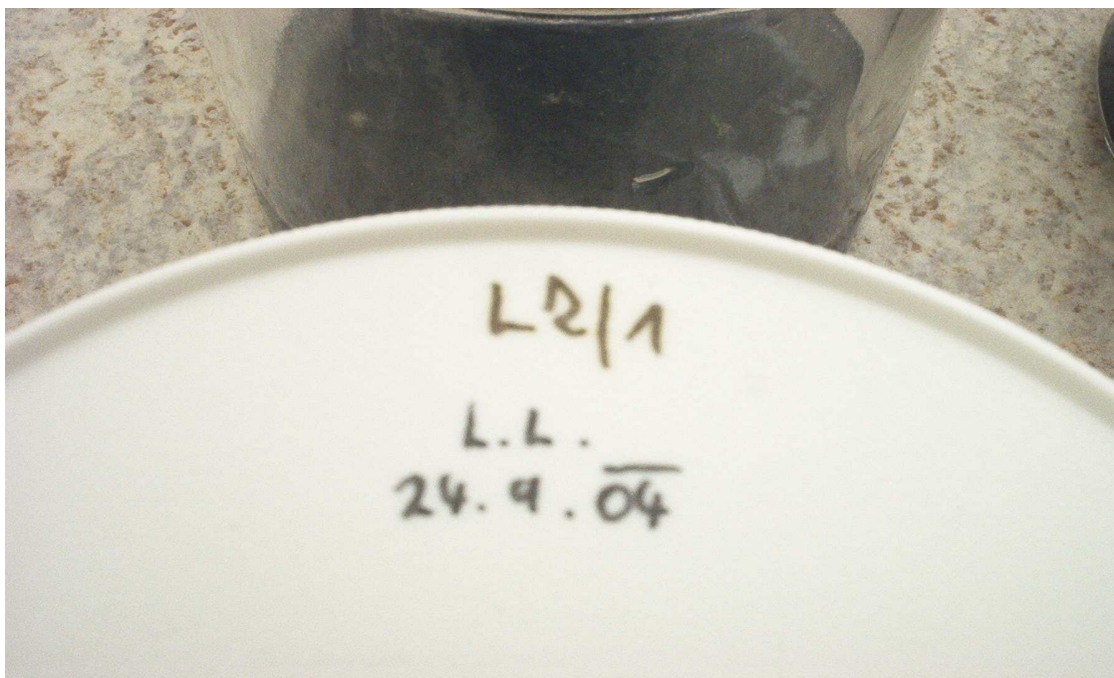
5: Kultivační místnost s *in vitro* kulturami, 25.6.2007



6: Asymbiotický výsev na zašikmeném výsevním médiu, 25.6.2006



7: Vyjmutí semen z tobolek a následné přemístění do ampulí, 25.6.2007



8: Označení sklenic po výsevu, 25.6.2007



9: Semenáče druhu *Liparis loeselii* po 12 měsících růstu, 25.6.2

8.3 Fytocenologické snímky

Fytocenologický snímek č.1

Nadmořská výška (m ²) : 416			
Datum : 21.9.2004			
Lokalita :NPR Ruda u Horusic			
Plocha snímku : 100 m ²			
Celková pokryvnost : 100%		Celkem druhů : 21	
E ₀	90%	E ₀	4
E ₁	30%	E ₁	12
E ₂	30%	E ₂	5

Druh	Početnost – pokryvnost : stupnice Braun - Blanquetova								
	r	+	1	2m	2a	2b	3	4	5
<i>Salix pentandra</i>		-							
<i>Salix aurita</i>								-	
<i>Pinus silvestris</i>			-						
<i>Alnus glutinosa</i>				-					
<i>Frangula alnus</i>			-						
<i>Molinia caerulea</i>				-					
<i>Cirsium palustre</i>								-	
<i>Menyanthes trifoliata</i>				-					
<i>Lythrum salicaria</i>				-					
<i>Lysimachia vulgaris</i>				-					
<i>Epilobium palustre</i>			-						
<i>Viola palustris</i>			-						
<i>Peucedanum palustre</i>			-						
<i>Liparis loeselii</i>		-							
<i>Fragaria vesca</i>			-						
<i>Galium palustre</i>			-						
<i>Potentilla erecta</i>			-						
<i>Aulacomnium palustre</i>							-		
<i>Sphagnum palustre</i>								-	
<i>Sphagnum teres</i>				-					
<i>Sphagnum fallax</i>				-					

Fytocenologický snímek č.2

Nadmořská výška (m ²) : 416			
Datum : 29.8.2005			
Lokalita :NPR Ruda u Horusic			
Plocha snímku : 100 m ²			
Celková pokryvnost : 100%		Celkem druhů : 27	
E ₀	85%	E ₀	5
E ₁	60%	E ₁	15
E ₂	45%	E ₂	7

Druh	Početnost – pokryvnost : stupnice Braun - Blanquetova								
	r	+	1	2m	2a	2b	3	4	5
<i>Salix pentandra</i>			-						
<i>Salix aurita</i>		-							
<i>Salix cinerea</i>				-					
<i>Pinus silvestris</i>			-						
<i>Betula pendula</i>			-						
<i>Alnus glutinosa</i>				-					
<i>Frangula alnus</i>				-					
<i>Molinia caerulea</i>		-							
<i>Cirsium palustre</i>		-							
<i>Menyanthes trifoliata</i>		-							
<i>Calamagrostis canescens</i>		-							
<i>Lythrum salicaria</i>	-								
<i>Lisimachia vulgaris</i>			-						
<i>Lisimachia thyrsoflora</i>			-						
<i>Viola palustris</i>		-							
<i>Peucedanum palustre</i>		-							
<i>Epilobium palustre</i>			-						

<i>Carex nigra</i>		-							
<i>Fragaria vesca</i>		-							
<i>Galium palustre</i>		-							
<i>Potentilla erecta</i>		-							
<i>Potentilla palustris</i>		-							
<i>Aulocomnium palustre</i>							-		
<i>Sphagnum palustre</i>								-	
<i>Sphagnum teres</i>			-						
<i>Sphagnum fallax</i>			-						
<i>Climacium dendroides</i>			-						

Fytocenologický snímek č.3

Nadmořská výška (m ²) : 416			
Datum : 11.9.2006			
Lokalita :NPR Ruda u Horusic			
Plocha snímku : 100 m ²			
Celková pokryvnost : 100%		Celkem druhů : 23	
E ₀	85%	E ₀	4
E ₁	30%	E ₁	13
E ₂	75%	E ₂	6

Druh	Početnost – pokryvnost : stupnice Braun – Blanquetova								
	r	+	1	2m	2a	2b	3	4	5
<i>Salix pentandra</i>			-						
<i>Alnus glutinosa</i>				-					
<i>Betula pendula</i>			-						
<i>Frangula alnus</i>				-					
<i>Salix cinerea</i>				-					
<i>Salix aurita</i>		-							

<i>Molinia caeruleae</i>		-							
<i>Menyanthes trifoliata</i>		-							
<i>Carex canescens</i>			-						
<i>Calamagrostis canescens</i>		-							
<i>Carex rostrata</i>			-						
<i>Lysimachia thyrsoflora</i>		-							
<i>Lythrum salicaria</i>	-								
<i>Potentilla palustris</i>			-						
<i>Calla palustris</i>			-						
<i>Liparis loeselii</i>	-								
<i>Carex nigra</i>		-							
<i>Lysimachia vulgaris</i>			-						
<i>Cirsium palustre</i>		-							
<i>Aulacomnium palustre</i>								-	
<i>Sphagnum palustre</i>								-	
<i>Sphagnum teres</i>								-	
<i>Sphagnum fallax</i>							-		