Záchrana rdestu dlouholistého *(Potamogeton praelongus)* v České republice

Řešitel: Univerzita Hradec Králové, Rokitanského 62, 500 03 Hradec Králové

hlavní řešitel: RNDr. Romana Prausová, Ph.D., spoluřešitel: Ing. Vladimír Dvořák, další spoluřešitelé: Mgr. Jana Janová, Bc. Jan Myšák

Spolupracující instituce:

Botanický ústav Akademie věd ČR Průhonice, pracoviště Třeboň, Dukelská 135, 379 82 Třeboň: RNDr. Lubomír Adamec, CSc.

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

Firma Ing. Kamil Pásek, Sokolovská 1331, 708 00 Ostrava - Poruba: Ing. Kamil Pásek

ÚVODNÍ TEXT:

V rámci programu podporovaného finančními mechanismy EHP/Norska a MŽP probíhá v období květen 2009 – říjen 2010 projekt „Záchrana rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus* Wulfen) v České republice", jehož řešitelem je Univerzita Hradec Králové (UHK). Společně se spolupracujícími institucemi se zabývá realizací cílů stanovených záchranným programem pro kriticky ohrožený rdest dlouholistý *(Potamogeton praelongus)*, který byl schválen Ministerstvem životního prostředí ČR v roce 2003.

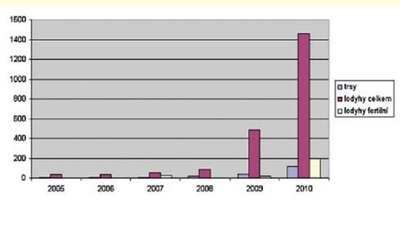
UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ (PRAUSOVÁ, DVOŘÁK, JANOVÁ, MYŠÁK)

Cíle a metody:

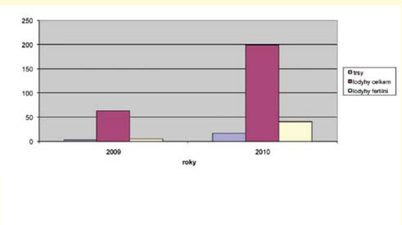
1) **monitoring populací v ČR** - sčítání lodyh a odhad pokryvnosti populací v m²
2) **monitoring stanovištních poměrů lokalit rdestu dlouholistého v ČR** - pravidelné měření základních parametrů vody: teplota, konduktivita, pH; průběžný záznam teplotních a světelných poměrů na vybraných lokalitách pomocí dataloggerů, pravidelné odběry vody a sedimentu pro komplexní analýzy v akreditovaných laboratořích
3) **testování klíčivosti** - klíčení nažek na vlhkých filtračních papírech v Petriho miskách při stálé teplotě 28 °C v termostatu po předchozím ošetření nažek za účelem přerušení dormance (aplikace NaClO – přípravek Savo, střídání teplot, mechanické narušení atd.)
4) **výběr potenciálních lokalit pro reintrodukci rdestu dlouholistého** - vytipování potenciálních lokalit, měření základních parametrů vody a vlastností biotopu (zástin, výskyt mokřadní vegetace atd.)
5) **popularizace záchranného programu, osvěta** - shromáždění podkladů pro vytvoření populárně naučné publikace o záchranném programu, zpracování grafickým studiem

Obr. 1 rdest dlouholistý *(Potamogeton praelongus)*

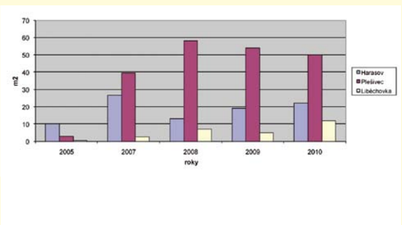
Výsledky:



Obr. 2 Vývoj mikropopulace rdestu dlouholistého v PCHP Rameno u Stříbrného rybníka



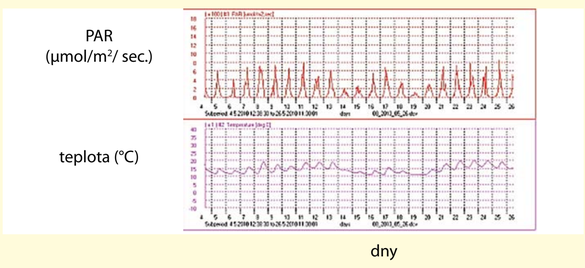
Obr. 3 Vývoj mikropopulace - potenciální lokalita Kašparovo jezero



Obr. 4 Vývoj mikropopulace - Kokořínsko

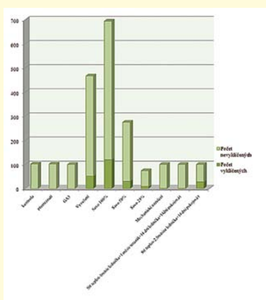
Lokalita	PCHP 1997	PCHP 2005 - 2009	Kašparovo jezero	Plešivec	Liběchovka	Harasov
pH	7,71	7,4	7,48	7,55	8,1	7,7
Vodivost při t=25°C (mS/m)	29,5	34	23,8	23,35	18,95	8,9
CHSK Mn (mg/l)		10,05	5,05	7,45	5,25	11,5
$(NO_2)^-$ (mg/l)	0,018	0,1435	0,1425	0,008	0,015	0,0115
$(NH_4)^+$ (mg/l)	0,276	0,21	0,155	0,095	0,033	0,06
$(NO_3)^-$ (mg/l)	2,01	6,425	9,8	<0,5	<0,5	<0,5
$(PO_4)^{3-}$ (mg/l)	0,0245	0,46	0,285	0,055	0,365	0,415
Ca (mg/l)		72,3	50,95	58,1	42,05	20,3
Mg (mg/l)		8,615	3,9	4,6	4	1,6
K (mg/l)		3,385	3,55	2,235	1,605	1,7

Tab. 1 Průměrné hodnoty základních parametrů vody v lokalitách s výskytem rdestu dlouholistého

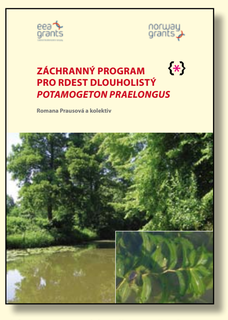


Obr. 5 Kontinuální měření teploty a intenzity dopadajícího světelného záření kombinovaným dataloggerem v lokalitě „Tůň pod Plešivcem – dolní, velká" za období 4.5. – 26.5.2010 (horní graf – intenzita dopadajícího světla PAR, dolní graf – teplota) (grafy byly vytvořeny pomocí programu Mini32).

Obr. 6 Test klíčivosti – metoda vysušení nažek před založením testu klíčivosti



Obr. 7 Výsledky testů klíčivosti za období 2006 – 2010



Obr. 8 populárně naučná publikace o záchranném programu

Z testů klíčivosti vyplývá poměrně nízká schopnost klíčení nažek (v průměru 18,05%). Podmínkou klíčení je narušení vnějších vrstev nažek chemickými či fyzikálními metodami (aplikace přípravku Savo v různých koncentracích, střídání teplot, poškození oplodí při vysušení atd.). Bylo prokázáno, že bez tohoto zásahu nažky nejsou schopny vyklíčit. Nejlepší je uchovávat nažky před testem mokré, protože dlouhodobé vysušení klíčivost nažek snižuje.

Výběr potenciálních lokalit pro introdukci, tedy vysazení druhu do lokalit, kde se v minulosti nevyskytoval, probíhá v současné době pouze v oblastech původního výskytu druhu, tzn. v nivě Orlice mezi Týništěm nad Orlicí a Hradcem Králové, na Českolipsku. Při vyhledávání vhodných lokalit se zjišťují základní parametry, zejména vlastnosti vody (konduktivita, pH), stav vodní a mokřadní vegetace, charakter stanoviště (zástin, charakter dna, substrátu atd.).

Ve fytogeografickém okresu 61b Týnišťský úval nebyla žádná ze čtyř dosavadních výsadeb úspěšná. Ve fytogeografickém okresu 15b Hradecké Polabí proběhla v roce 2008 úspěšně introdukce pouze v jedné ze tří lokalit. Tato lokalita má podobný charakter jako PCHP a nachází se v levobřežní nivě Orlice u Slezského Předměstí. Je známa pod jménem „Kašparovo jezero" a nachází se v nadmořské výšce 230 m. Při monitoringu v roce 2010 byly vytipovány dvě potenciální lokality pro výsadby v nivě spojené Orlice a dvě na toku Ploučnice na Českolipsku.

BOTANICKÝ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČR PRŮHONICE, PRACOVIŠTĚ TŘEBOŇ (ADAMEC)

Cíle a metody:

1) kultivace rdestu dlouholistého v záchranné kultuře – od roku 1988 z 5 rostlin odebraných v rameni u Stříbrného potoka v Malšově Lhotě, pěstování ve čtyřech laminátových nádržích vysokých 69 cm o ploše asi 1,5 m², laťkové zastínění, přezimování na sucho nebo pod vodou
2) studium ekologie druhu – průběžné sledování stavu rostlin, nástupu kvetení a tvorby plodů, měření základních parametrů vody (pH, konduktivita, alkalinita, teplota)
3) zajištění nažek pro testy klíčivosti – uzavření plodenství na rostlinách do prodyšných síťových obalů a sběr až po úplném dozrání, přechování očištěných nažek ve vodě v chladničce
4) dopěstování rostlin získaných ze sterilní tkáňové kultury in vitro – převzetí rostlin ze sterilní tkáňové kultury ve stadiu dostatečného počtu listů a vytvořeného kořenového systému o velikosti cca 8 -10 cm

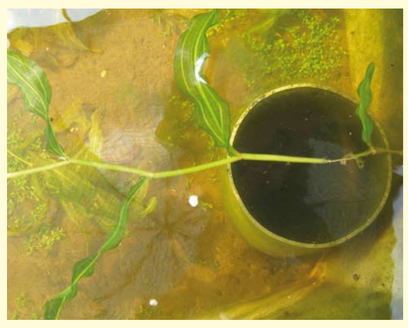
Výsledky:

Obr. 9 Záchranná kultura v BÚ AV ČR Třeboň

1) Kultivace rdestu v záchranných nádržích představuje hlavní množicí kapacitu rdestu, ale opakovaně je pozorováno velmi špatné přežívání rostlin po přezimování na suchu (pouze 10-20 % prýtů), zatímco pod vodou přezimují rostliny velmi spolehlivě (přes zimu uhynou jen starší prýty). Přezimování na sucho a následný jarní růst jsou zřejmě nejkritičtější fáze růstového cyklu rdestu v záchranných nádržích.

2) Ukazuje se, že rdest dlouholistý je druhem mimořádně náročným na obsah minerálních živin v substrátu a že při určitém poklesu obsahu živin v záchranných nádržích přestává růst a jeví znaky fyziologické nemoci. Podstatou této fyziologické nemoci je zřejmě projev a důsledek deficience minerálních živin (N, P, K) ve vyčerpaném substrátu možná kombinovaný s nevhodnou strukturou (ulehlost) substrátu. Mladší a dobře zakořeněné rostliny, které dobře přezimovaly, již ve druhé polovině května hojně kvetou.

3) Je pozorováno, že rostliny pěstované ve 3 květináčích vytvoří 15-102 květů, na nichž dozrává asi 150-1000 nažek. Počet dozrávajících nažek závisí na klimatických podmínkách v daném roce (např. v roce 2010 dozrálo celkem 400 nažek na rostlinách pěstovaných ve 3 květináčích).
4) Zkušenosti z roku 2010 prokázaly, že je možné vysazovat rostliny rdestu vypěstované ve sterilní kultuře in vitro do záchranných nádrží a že tyto rostliny po přibližně jednoměsíční přestávce růstu rychle rostou a za dva měsíce už mají střední velikost prýtu 15-20 cm, a jsou tedy vhodné pro (re)introdukce do přírody. Optimální dobou pro přesazování rostlin z kultury in vitro do záchranné nádrže by vzhledem k obvyklé teplotě vody mohl být přelom května a června.



Obr. 10 rostlina v záchranné kultuře s fyziologickou nemocí

FIRMA ING. KAMIL PÁSEK

Cíle a metody: vytvoření sterilní tkáňové kultury in vitro – sterilizace nažek rdestu přípravkem Savo Prim o koncentracích 100% a 50%, následné propláchnutí a výsev do MS (Murashige-Skoog) media s přídavkem sacharózy (polovina semen ve výsevních zkumavkách s tekutým médiem a polovina semen s tuhým médiem), klíčení v šeru - první měsíc při teplotách 14-18°C, následně již při konstantní teplotě 18°C, pravidelné kontroly a přenos zřetelně klíčících na osvětlené stoly (zářivky / 18°C), pravidelné přesazování po 2-3 měsících na nová media.

Výsledky:

První semena začínají klíčit již po cca 15 dnech, avšak souběžně se začínají objevovat první kontaminace, zejména u semen sterilizovaných nižší koncentrací SAVA a po krátký čas. Rostliny rostou lépe plně ponořené, než submerzně v malém objemu média (cca 50 ml v 250 ml sklenicích). Obecně rostliny rdestu rostou velmi dobře a odnožují pouze na základnim typu media (modifikované GB5 médium) bez přídavku hormonu. V současné době je v kultuře více než 30 klonových linií rdestu v in-vitro.

Obr. 11 rostlina přesazovaná z kultury in vitro do sbírky v BÚ AV ČR Třeboň

Obr. 12 založení sterilní tkáňové kultury

Obr. 13 rostliny linií klonů vypěstované ze sterilní tkáňové kultury

5) PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO OLOMOUC (KITNER)

Cíle a metody: Zjištění genetické variability populací rdestu dlouholistého vyskytujících se na území ČR metodou AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism). Extrakce DNA byla provedena podle modifikovaného CTAB protokolu (Kump & Javornik, 1996) z 87 vzorků (1 vzorek = 1 konkrétní rostlina). Amplifikované AFLP fragmenty (metodika dle Kitner et al., 2008) byly separovány na 6% denaturačním polyakrylamidovém gelu a vizualizovány barvením stříbrem. Statistické vyhodnocení binárních dat (přítomnost "1" nebo nepřítomnosti "0" AFLP fragmentu na gelu) bylo provedeno pomocí programů GenAlex a AFLP-SURV (Peakall & Smouse, 2006; Vekemans et al., 2002), a sestrojení dendrogramu pro vizualizaci vztahů mezi jednotlivými vzorky pomocí programů FreeTree a TreeView (Page, 1996; Pavlíček et al., 1999; metoda UPGMA, Jaccard similarity coefficient).

Výsledky:

Pomocí osmi primerových kombinací bylo získáno 322 detekovatelných fragmentů, z nichž 172 bylo polymorfních (53,41%). Celý analyzovaný soubor vykazoval nízkou úroveň celkové genetické variability (Ht = 0,0554), která je rozdělena z 83,72% na vnitropopulační a z 16,28% na mezipopulační genetickou variabilitu (analýza AMOVA).

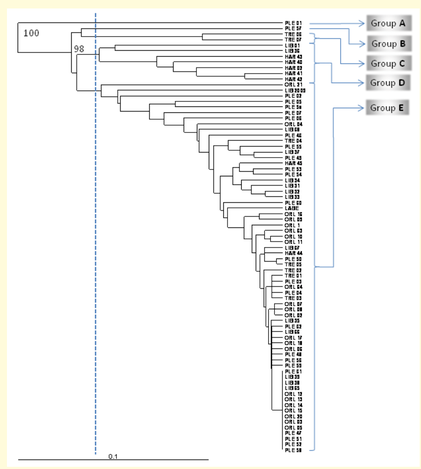
Souhrn základních indexů genetické variability studovaného souboru i jednotlivých populací jsou uvedeny v tabulce 2 (Tab. 2). Nízká úroveň genetické variability mezi- a uvnitř- studovaných populací je patrná i z výsledků UPGMA (Obr. 14) a PcoA diagramu (Obr. 15). Jejich srovnáním byl analyzovaný soubor vzorků rozdělen do pěti skupin (Group A – Group E). Signifikantní hodnoty bootstrapové analýzy (hodnoty nad 50 podporující správnost konstrukce stromu) pro členění větví UPGMA diagramu (Obr. 14) byly zjištěny pouze u linie větvení vzorku "Plešivec 1" (Group A), od vzorku "Plešivec 57" (Group B) a dvou vzorků z Třeboně (Třeboň 06 a 07; Group C). Ve skupině "Group D" převládají vzorky z Harasova. Většina vzorků vytváří mohutnou skupinu označenou jako "Group E". Z obou diagramů je zřejmé, že nedošlo k jasné separaci vzorků pocházejících z jednotlivých lokalit.

Literatura

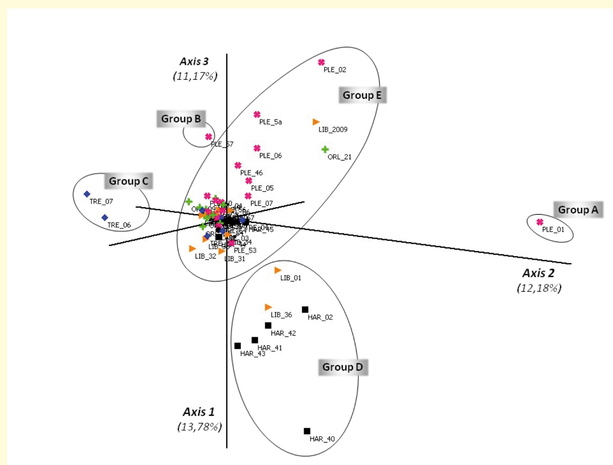
Kitner et al. (2008) Isr. J. Plant Sci. 56: 185-193
Kump& Javornik (1996): Plant Sci. 114: 149-158
Page (1996): Comp. App. Biosci. 12: 357-358
Pavlíček et al. (1999): Folia Biologica 45: 97-99
Peakall & Smouse (2006): Molec. Ecol. Notes 6: 288-295
Vekemans et al. (2002): Mol. Ecol. 11: 139-151
Vos et al (1995): Nucl. Acid Res. 23: 4407-4414

Populace	Harasov	Labe	Liběchovka	Orlice	Plešivec	Třeboň
Počet vzorků	7	1	15	22	25	7
Počet bandů	207	165	231	199	270	197
Polymorfismus (P)	14,91%	n.a	23,91%	23,91%	36,34%	12,11%
Heterozygotnost (He)	0,040	n.a	0,029	0,009	0,033	0,026
Souhrnná data celého souboru						
Celkový počet AFLP fragmentů: 322			Polymorfních fragmentů: 53,41%			
Polymorfismus (P): 16,67%			Heterozygotnost (He): 0,019			

Tab. 2: Souhrnné informace AFLP dat v rámci studovaného souboru a jednotlivých populací rdestu dlouholistého na území ČR



Obr. 14 UPGMA dendrogram (Jaccard´s similarity coefficient) souboru vzorků rdestu dlouholistého z území České republiky, získaný analýzou 322 AFLP fragmentů. Čísla na větvích vyjadřují procentuální výsledky bootstrapové analýzy (1000 replikací). Označení skupin (Group A-E) koresponduje s označením skupin na PCoA diagramu (Obr. 15).



Obr. 15. Výsledky analýzy PCoA (Principal Coordinate Analysis) – 3D diagram. Pomocí tří prvních os je vysvětleno 37,18% celkové variability studovaného souboru. Označení skupin (Group A-E) koresponduje s označením skupin na UPGMA diagramu (Obr. 14).

Summary

The conservation program for *Potamogeton praelongus* was approved by the Department of Environment in 2003. The last native population and its biotope in the temporarily protected area Meander cutoff by the Stříbrný rybník Pond is monitored, as well as reserve population in pools in the protected landscape area Kokořínsko. Methods activating seed germination at the level of approximately 18,5% were identified in laboratory tests. Using a sterile tissue culture in vitro was created 30 clones that are cultivated in the preservation cultivation in the Institute of Botany of Academy of Sciences in Třeboň. The preservation cultivation is a supply of specimens that could be plant to new localities. Outplanting to new localities was successful only twice (right-side cut of the Orlice River in Slezské Předměstí - Kašparovo jezero and in the temporarily protected area). Genetic variation within and among 87 samples populations of *P. praelongus* in the Czech Republic were analysed using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Basic population genetic indices and statistical visualisation are summarised in "Tab. 2" and visualised in "Obr. 14"," Obr. 15". The total genetic diversity within the populations was low (Ht = 0.0554). An analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the major variance component (83.72%) was observed within the populations while the inter-population variance accounted for 16.28% of the total variation.

Poster byl financován v rámci programu „Záchranné programy pro zvláště chráněné druhy" – programu podporovaného grantem z Islandu, Lichtenštejnska a Norska prostřednictvím Finančního mechanismu EHP a finančního mechanismu Norska a MŽP.