

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

The conservation of the Long-stalked Pondweed (*Potamogeton praelongus*) in the Czech Republic

ROMANA PRAUSOVÁ¹, LUBOMÍR ADAMEC², MILOSLAV KITNER³, KAMIL PÁSEK⁴
& VLADIMÍR DVOŘÁK¹

¹ Univerzita Hradec Králové, Rokitanského 63, CZ-500 02 Hradec Králové

² Botanický ústav AV ČR, Úsek ekologie rostlin, Dukelská 135, CZ-379 82 Třeboň
adamec@butbn.cas.cz

³ Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého Olomouc, Šlechtitelů 11
CZ-783 71 Olomouc-Holice

⁴ Sokolovská 1331, CZ-708 00 Ostrava-Poruba

Abstract: In the years 2009–2010, activities of the conservation programme “The conservation of the Long-stalked Pondweed (*Potamogeton praelongus*) in the Czech Republic” were conducted as a component part of the programme “Action Plans for Endangered Species” and were supported by the EEA/Norwegian Financial Mechanisms and the Ministry of the Environment of the Czech Republic. The following activities were implemented during the project: monitoring of micropopulations of *P. praelongus* and its sites, rescue cultivation in the Institute of Botany of the Academy of Sciences at Třeboň, analysis of genetic variation of its micropopulations at the Faculty of Science of the Palacký University at Olomouc, cultivation of a sterile culture *in vitro* in the BestCarnivorousPlants nursery in Ostrava and seed germination tests at the University of Hradec Králové. The last native population and its site in the Temporarily Protected Area Rameno u Stříbrného rybníka oxbow lake were monitored together with introduced, nearly-natural micropopulations in backwater pools in the Kokořínsko Protected Landscape Area, and with potential sites for (re)introduction in the Hradec Králové and Česká Lípa regions.

Keywords: action plan, genetic analysis, Long-stalked Pondweed (*Potamogeton praelongus*), monitoring of sites, seed germination tests, sterile culture *in vitro*

Abstrakt: Projekt „Záchrana rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*) v České republice“ proběhl v období květen 2009 – říjen 2010. Byl finančně podpořen Finančními mechanismy EHP a Norska. V rámci tohoto projektu byly realizovány aktivity vyplývající ze záchranného programu pro *Potamogeton praelongus*. Jednalo se o monitoring mikropopulací v ČR a jejich stanovišť, zajištění záchranné kultivace v BÚ AV ČR v Třeboni, zjištění genetické variability mikropopulací v ČR, vytvoření sterilní kultury *in vitro* a testování klíčivosti nažek. Průzkumy probíhaly na lokalitách v nivě Orlice na Královéhradecku, Ploužnického potoka a Ploučnice na Českolipsku. Ze získaných výsledků byla též zpracována populárně naučná publikace o záchranném programu, jeho principech a realizaci. Na projekt navázaly další aktivity, které směřují k naplnění cílů záchranného programu schváleného Ministerstvem životního prostředí ČR v roce 2003 a zajišťovaného AOPK ČR.

Klíčová slova: genetické analýzy, monitoring stanovišť, rdest dlouholistý, sterilní kultura *in vitro*, testy klíčivosti, záchranný program

Nomenklatura: KUBÁT et al. 2002

Úvod

Rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*) je ponořený druh vodní rostliny, který je kriticky ohrožený na území ČR, v Červeném seznamu IUCN je zařazen do kategorie Least concern – méně ohrožený (BILZ et al. 2011). Na základě literárních údajů (HUSÁK & ADAMEC 1998) se jedná o výrazně stenotopní druh, pro nějž je charakteristický růst v tvrdých čístejších hlubších nížinných vodách na sedimentech bohatých vápníkem. Kombinace těchto stanovištních faktorů je však v hustě osídlených státech Evropy poměrně vzácná, a proto má druh ve střední Evropě recentně už jen minimum lokalit. Spolehlivé údaje o dřívějším výskytu druhu v ČR jsou známy z Českolipska (řeka Ploučnice a Plouznický rybník), dále z Prahy, kde rostl při okraji řeky Vltavy v mírnějším proudu vody, z okolí Písku (řeka Otava a rybníky), Chlumce nad Cidlinou (rybníky) a z nivy Orlice mezi Týništěm nad Orlicí a Hradcem Králové. Lokality v okolí České Lípy, Písku a Chlumce nad Cidlinou zanikly pravděpodobně v první polovině 20. století. V Praze ve Vltavě byl tento druh pozorován naposledy Rydlem v roce 1984 (RYDLO 1995). V Dolním Poorličí byly v roce 1984 nalezeny čtyři lokality. Od roku 1995 je známa už jen jediná lokalita v ČR, a to rameno Orlice v Hradci Králové – Maišově Lhotě.

Na této poslední lokalitě se druh přirozeně vyskytuje pouze v malé populaci čítající kolem jednoho tisíce lodyh rostoucích přibližně v 50 trsech (PRAUSOVÁ 2011). V rámci záchranného programu se v roce 2008 podařilo založit ještě jednu malou populaci na Kašparově jezere v nivě Orlice, a to jeden kilometr od přežívající původní populace. V letech 2001–2005 byly rostliny rdestu vysazeny do několika velkých tůní v nivě Liběchovky a Pšovky v CHKO Kokořínsko. Tůně mají charakter mezotrofních rybníků, avšak jejich vodní režim je zcela závislý na klimatických poměrech a hladině podzemní vody v nivách Pšovky a Liběchovky. V tůních v časném sukcesním stadiu vznikly vhodné podmínky pro růst druhu. Druh se rozrostl do bohatých porostů a vznikla početná populace čítající stovky trsů. Vitální rostliny se staly důležitým potenciálem pro výsadby v rámci reintrodukce a pro testy klíčivosti (PRAUSOVÁ et al. 2011, 2013, KOZELKOVÁ 2011, SIKOROVÁ 2011). Zkušenosti s dosavadními výsadbami ukazují, že v ČR stále existují lokality s vhodnými podmínkami pro tento druh, zejména ve zvláště chráněných územích, kde lze zajistit ochranu proti nežádoucím zásahům do přírodních biotopů. Pozitivní výsledky introdukce a reintrodukce potvrzují správnost směřování záchranného programu k zakládání nových mikropopulací na různá potenciálně vhodná stanoviště, zejména v oblastech původního výskytu druhu v ČR (Královéhradecko, Mimoňsko). Stále je totiž reálná možnost vyhynutí původní populace rdestu na poslední přirozené lokalitě, kde jsou stanovištní poměry v důsledku nežádoucích lidských aktivit hodně vzdáleny od ekologického optima pro tento druh.

Přestože rostliny v přírodě i v kultuře vytvářejí množství zralých semen, jejich klíčivost je velmi nízká (PRAUSOVÁ et al. 2013). Proto se předpokládá, že genetická struktura přírodních mikropopulací rdestu je téměř uniformní (PRAUSOVÁ et al. 2010, PRAUSOVÁ et al. 2011). V současnosti se však podařilo najít jednoduchý a účinný postup, jak stimulovat klíčení semen, a použitím tohoto postupu bylo možno i vytvořit sterilní tkáňovou kulturu *in vitro* (PRAUSOVÁ et al. 2011). Tento moderní přístup v druhové ochraně biodiverzity umožňuje produkovat velké množství jedinců použitelných pro (re)introdukční účely (PRAUSOVÁ et al. 2011), ale zároveň navozuje otázku o genetické variabilitě takto získaných rostlin.

V rámci programu podporovaného Finančními mechanismy EHP a Norska proběhl v období květen 2009 – říjen 2010 projekt „Záchrana rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*) v České republice“, jehož řešitelem byla Univerzita Hradec Králové (UHK).

Se spolupracujícími institucemi se UHK zabývala realizací záchranného programu pro kriticky ohrožený rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus*), který byl schválen Ministerstvem životního prostředí ČR v roce 2003. Jednou z nejvýznamnějších náplní záchranného programu je péče o poslední biotop s přirozeným výskytem rdestu dlouholistého a obnova biotopů v oblastech jeho původního výskytu (niva Orlice, Českolipsko) včetně studia stanovištních poměrů těchto lokalit. Další součástí je studium biologie a ekologie rdestu dlouholistého *in situ* a *ex situ*, reintrodukce a introdukce druhu a studium generativní reprodukce jakožto nástroje pro zvýšení jeho genetické variability a zároveň pro zajištění dostatku rostlin pro výsadby.

Tým řešitelů z UHK se zabýval zejména monitoringem populací tohoto druhu na jeho poslední lokalitě v ČR – přechodně chráněné ploše „Ramen u Stříbrného rybníka“ u Hradce Králové a v záložní populaci v CHKO Kokořínsko. Sledoval stav mikropopulací a stanovištní poměry lokalit v jednotlivých letech a vyhledával potenciální lokality pro výsadby vypěstovaných rostlin ze záchranné kultivace v Botanickém ústavu AV ČR (BÚ AV ČR) v Třeboni. Významnou aktivitou řešitelů UHK bylo též studium generativní reprodukce druhu – testování klíčivosti semen a způsobů přerušení jejich dormance.

Spoluřešitel z Univerzity Palackého v Olomouci (Katedra botaniky PřF UP) analyzoval pomocí metody AFLP genetickou variabilitu mikropopulací rdestu dlouholistého vyskytujících se na území České republiky. Další spoluřešitel (firma Ing. Pásek, Ostava-Poruba) vytvořil sterilní kulturu *in vitro*. Napěstované rostliny rdestu dlouholistého získané touto metodou se v současné době používají k doplnění záchranné kultury rdestu dlouholistého ve sbírce vodních a mokřadních rostlin v BÚ AV ČR v Třeboni a v záchranné kultuře druhu v Býšti u Hradce Králové. Záchranné kultury zajišťují pěstování, přezimování rdestu ve vodě a na sucho, studium ekologických nároků druhu, dále dostatek rostlin pro záchranné repatriace a semenný materiál na testy klíčivosti a přípravu sterilní kultury *in vitro*.

Součástí aktivit projektu byly i navazující hydrobiologické a zoologické průzkumy, analýzy chemických a mikrobiologických vlastností vody a sedimentu z lokalit, ve kterých mikropopulace rdestu dlouholistého rostou. Projekt významně přispěl k realizaci a publicitě záchranného programu také vydáním populárně naučné publikace (PRAUSOVÁ & ADAMEC 2010). Aktivita na záchranném programu pokračují i po skončení projektu podpořeného Finančními mechanismy EHP a Norska. Výsledky průzkumů jsou aplikovány na ochranu druhu *in situ* a *ex situ*.

Metodika

Současný výskyt *Potamogeton praelongus* v České republice

Niva Orlice u Hradce Králové

V současnosti se *P. praelongus* přirozeně vyskytuje pouze v přechodně chráněné ploše (PCHP) Rameno u Stříbrného rybníka v Malšově Lhotě u Hradce Králové. PCHP byla vyhlášena 5. 1. 1998 na dobu 5 let, v roce 2008 byla její platnost podruhé prodloužena, a to do roku 2017. PCHP Rameno u Stříbrného rybníka leží v nadmořské výšce 232 m v levobřežní nivě řeky Orlice, do níž je zaústěné její dolní části. Do horní části ramene je svedena výpust' z rekreačně využívaného Stříbrného rybníka. Rameno má dva výrazné ohyby, v horním ohybu do ramene ústí Stříbrný potok. Rameno je značně zaneseno organickým materiálem, jehož hlavním zdrojem je opad z dřevin z břehových porostů. Z hydrobiologického hlediska lokalita odpovídá slabě eutrofnímu prostředí, kde se stýká stojatá voda s tekoucí (PRAUSOVÁ et al. 2010).

Z výsadeb realizovaných v rámci záchranného programu pro tento druh se podařilo založit novou mikropopulaci v tzv. Kašparově jezeře. Jedná se o odstavené rameno Orlice na jejím pravém břehu. Lokalita je z hlediska stanovištních poměrů velmi podobná přechodně chráněné ploše (obr. 1) (PRAUSOVÁ et al. 2010).



Obr. 1. Lokalizace PCHP Rameno u Stříbrného rybníka a Kašparova jezera v nivě Orlice.

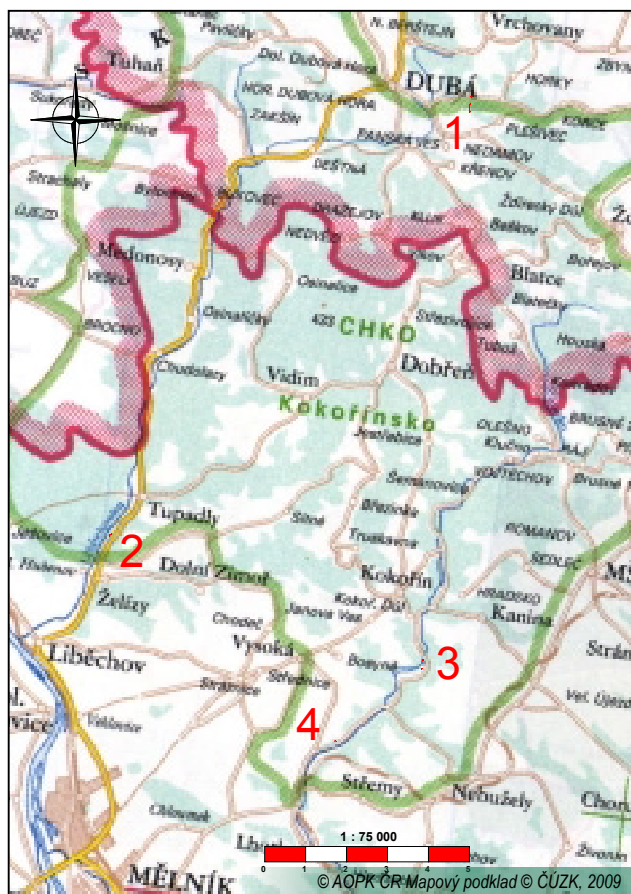
Fig. 1. Localization of the Temporarily Protected Area near the Stříbrný rybník pond and Kašparovo jezero oxbow lake in the Orlice river floodplain as seen from an aerial view.

CHKO Kokořínsko

Záložní populace roste v chráněné krajinné oblasti (CHKO) Kokořínsko (obr. 2). Druh zde roste v revitalizovaných tůňích, kam byl vysazován nezávisle na záchranném programu v letech 2001–2005. Zdrojové rostliny pro výsadby opět pocházely z PCHP Rameno u Stříbrného rybníka. V rámci záchranného programu jsou tůně využívány jako zdroj rostlin pro výsadby do vhodných lokalit v nivě Ploučnice na Českolipsku, kde v minulosti druh rostl. Každoročně jsou v tůňích odebrány nažky rdestu dlouholistého pro realizované testy klíčivosti a také pro vytvoření genetických sbírek semen, resp. nažek (Výzkumný ústav rostlinné výroby v Ruzyni, sbírka semen ve Vlastivědném muzeu v Olomouci). V současné době druh v CHKO roste v následujících lokalitách: tůně pod Plešivcem, tůně nad rybníkem Harasov, tůně u Štampachu, tůně v nivě Liběchovky (PRAUSOVÁ et al. 2011).

Záchranná kultivace v BÚ AV ČR Třeboň

Záchranná kultura je pěstována od roku 1988 v BÚ AV ČR v Třeboni. Rostliny v záchranné populaci pocházejí z PCHP Rameno u Stříbrného rybníka, od roku 2010 též ze sterilní tkáňové kultury. Kultivace druhu probíhá ve venkovních nádržích, v hlubší vodě.



Obr. 2. Lokalizace soustav tůň s výskytem *Potamogeton praelongus* v CHKO Kokořínsko: 1 – tůň pod Plešivcem, 2 – tůň v nivě Liběchovky, 3 – tůň u Harasova, 4 – tůň u Štampachu.

Fig. 2. Localization of backwater pools with *Potamogeton praelongus* in the Kokořínsko Protected Landscape Area: 1– Plešivec, 2 – Liběchovka, 3 – Harasov, 4 – Štampach.

Nádrže jsou přistíněny proti přehřívání vody a růstu řas. Průběžně jsou odstraňovány nárosty vláknitých řas a fytofágní plovatky. Přezimování probíhá ve venkovní nádrži v hluboké vodě nebo na sucho pod vrstvou suchého listí přikrytého fólií. Rostliny v kulturách jsou náročné na tvrdou vodu a minerální živiny v sedimentu. Velká část rostlin zimovaných na sucho trpí odumíráním kořenů aází stonků, což je vysvětlováno vyčerpáním minerálních živin v půdě nebo její značnou ulehlostí (PRAUSOVÁ et al. 2010).

Záchranná kultivace v Býšti u Hradce Králové

Záchranná kultivace v Býšti u Hradce Králové byla založena pro dopěstování malých rostlin získaných z úspěšných testů klíčivosti. Současně s klíčovými rostlinkami jsou ve třech malých vodních nádržích (0,6 m × 1,5 m, hloubka 0,35 m) pěstovány rostliny ze sterilní tkáňové kultury. Rostliny jsou využívány ke studiu jejich ekologických nároků a za účelem získání rostlin pro repatriace do nivy Orlice.

Monitoring populací v ČR

V rámci monitoringu populací byly v nivě Orlice, tj. v PCHP Rameno u Stříbrného rybníka a v Kašparově jezeře, sčítány počty jednotlivých lodyh vyskytujících se ve vzdálenějších trsech či vizuálně rozlišitelných skupinách. Kromě celkového počtu lodyh byl zjišťován počet fertálních lodyh. V lokalitách v CHKO Kokořínsko nebylo možné sčítání jednotlivých lodyh, a proto byla zvolena metoda stanovení velikosti mikropopulace v m². Ve všech lokalitách byl výskyt zaměřen pomocí GPS přístroje GARMIN eTrex H (PRAUSOVÁ et al. 2011).

Monitoring stanovištních poměrů lokalit *Potamogeton praelongus* v ČR

Ke sledování stanovištních poměrů lokalit s výskytem *P. praelongus* byly v období 2005–2011 pravidelně (dvakrát ročně) odebrány vzorky vody pro chemické analýzy prováděné v akreditovaných laboratořích Povodí Labe, s. p. (ČIA č. 1264 dle normy ČSN EN IEC/ISO 17025). Stanovení vodivosti, pH a chemické spotřeby kyslíku (CHSK) (KMnO₄) proběhlo bez předúpravy vzorku (pouze ruční promíchání). Před stanovením aniontů byla provedena filtrace vzorku vody membránovým filtrem 0,45 µm. Stanovení celkového dusíku bylo provedeno po homogenizaci homogenizátorem. Stanovení kovových kationtů bylo provedeno metodou AAS po předchozím přidávku koncentrované kyseliny dusičné, povážení vzorku v mikrovlnném rozkladném zařízení a následném zfiltrování přes membránový filtr 0,45 µm. Detaily metodiky viz PEKÁRKOVÁ & LISCHKE (1974). Při pravidelných návštěvách lokalit bylo prováděno aktuální měření základních parametrů vody (teplota, vodivost, pH) pomocí přístrojů HACH HQ 30d (terénní sada) a GRYF 107L. Na vybraných lokalitách byly instalovány datalogery (Minikin T, EMS, Brno, ČR), které slouží ke kontinuálnímu měření teploty, případně i světelných poměrů v biotopu *P. praelongus*. Datalogery byly ukotveny pevným drátem ke kamenům na dně vodních ploch a umístěny do hloubky, která odpovídá zhruba polovině výšky dospělých rostlin *P. praelongus*.

Testování klíčivosti

Již od roku 2006 probíhají na UHK testy klíčivosti *P. praelongus* (JANOVÁ 2008, 2010, PRAUSOVÁ & JANOVÁ 2010, PRAUSOVÁ et al. 2011, 2013, SIKOROVÁ 2011). Základním principem testů bylo vystavení nažek různým podmínkám, které ukončí dormanci, a následná kultivace v laboratorních podmínkách a v termostatu. Testy se lišily též ve způsobu uložení nažek před zahájením testů klíčivosti (na mokro, na sucho, zavodněné jeden měsíc před zahájením testu). Do konce roku 2011 bylo provedeno více než 50 variant testů klíčivosti, v nichž byly kultivovány nažky bez předchozího zásahu, nažky ošetřené různými koncentracemi Sava (5% chlornan sodný), mechanicky narušené nažky, nažky ovlivněné kyselinou giberelovou, nažky vystavené anaerobnímu prostředí, nažky vystavené střídání teplot, nažky ozářené UV zářením, nažky kultivované v agaru, v tekutých živných médiích, ponořené ve vodním sloupci nebo umístěné na vlhkém filtračním papíru v Petriho miskách (SIKOROVÁ 2011, PRAUSOVÁ et al. 2013).

Klíčení probíhalo na Petriho miskách (u variant testů ve vodě či tekutém médiu byly použity kádinky překryté průhlednou páskou) ve 2 typech prostředí – za tmy v termostatu při stálé teplotě 28 ± 1 °C a za světla při pokojové teplotě 21 ± 1 °C. V průběhu testu probíhalo pravidelné vlhčení sterilizovanou vodou z řeky Orlice. Testy klíčivosti byly komplikovány šířením plísní. Testy byly ukončovány postupně v závislosti na stupni kontaminace. Nejúspěšnější testy byly ponechány po dobu 5 měsíců. Úspěšně vyklíčené rostlinky s 1–2 listy byly přesazovány do klimaboxu, kde byly dopěstovávány ve 4-litrových skleněných lahvích a akváriích v sedimentu tvořeném pískem a jilem v poměru 3:1 za současného provzdušňování vzduchovacím motorkem. Následně byly přesazeny do záchranné kultury v Býšti k dopěstování (PRAUSOVÁ 2011).

Zjištění genetické variability populací *Potamogeton praelongus* na území ČR

Pro zjištění genetické variability populací rdestu dlouholistého vyskytujících se na území ČR byla použita metoda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al. 1995). Extrakce genomické DNA byla provedena ze 100 mg čerstvých listových čepelí podle modifikované CTAB metody (DOYLE & DOYLE 1987). Celkem bylo analyzováno 77 individuálních rostlin z pěti lokalit: Plešivec (25 rostlin), Liběchovka (15), Harasov (7), Orlice (23) a Třeboň (7).

Použitý protokol AFLP a způsob detekce amplifikovaných fragmentů byl popsán detailně jinde (KITNER et al. 2008, 2012, 2013). Pro posouzení genetické diverzity jednotlivých populací byly vypočítány indexy celkové, vnitro- a mezi- populační genetické diverzity, fixační index a analýza molekulární variance (AMOVA) pomocí programů AFLP-SURV, FAMD 1.23β a GenAlEx 6 (VEKEMANS et al. 2002, SCHLÜTER & HARRIS 2006, PEAKALL & SMOUSE 2006).

Vytvoření sterilní kultury *in vitro*

K vytvoření sterilní kultury *in vitro* byly použity nažky sklizené na podzim roku 2009 v kultuře BÚ AV ČR v Třeboni, a to v následujících počtech: 47 ks suchých semen (vysušená při 22 °C ihned po dozrání 15. 9. 2009 a od 8. 10. 2009 uskladněná ve tmě v lednici při 5 °C), 191 ks mokřých semen (skladovaná po dozrání ve vodě ve tmě při teplotě 5 °C). Pro výsev byla zvolena 2 média:

- 1) pevné – 10% MS médium (Murashige-Skoog) s 2 % sacharózy a 0,6 % gerlitu. Do jedné výsevní zkušavky bylo vloženo cca 10 ml média.
- 2) tekuté – 10% MS médium s 2 % sacharózy. Do jedné výsevní zkušavky bylo nalito cca 20 ml tekutého média. Reakce pH média byla nastavena na 6,5 pomocí KOH před rozlitím do zkušavek. Zkušavky s médii byly sterilizovány v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

Sterilizace semen proběhla ve dnech 28. až 29. 12. 2009 ve třech časových sterilizačních skupinách po dobu 4, 8 a 16 hodin protřepáváním ve sterilizačním roztoku (bylo použito komerční SAVO PRIM) v koncentracích 100 % (bez ředění) a 50 % (naředěné destilovanou vodou). Semena byla vysetá v aseptickém prostředí flow-boxu po jednom kusu do výsevní zkušavky, a to polovina semen do média tekutého a druhá polovina na médium pevné. Klíčení probíhalo v šeru, první měsíc při teplotách 14–18 °C, následně již při konstantní teplotě 18 °C. Semena byla pravidelně kontrolována a zřetelně klíčící semena byla přenášena na osvětlené stoly (zářivky, 21 °C).

Jako kultivační médium pro vyklíčené rostliny bylo zvoleno 50% médium Gamborg B5 s redukováným KNO₃ používané pro pěstování vodních masožravých rostlin, se standardním přídatkem mikroelementů a vitamínů a 2,5% sacharózu (ADAMEC & PÁSEK 2000). Objem tekutého média byl 50–70 ml ve 350 ml sklenici anebo později 300 ml v 500 ml sklenici. Před autokláfováním bylo pH nastaveno na 5,7 anebo 6,5 s pomocí KOH. Dva měsíce po nasazení semen muselo být přistoupeno k prvnímu přesazení rostlin na tekuté médium s vyšším obsahem živin, neboť vyklíčené rostliny začaly na výsevním médiu rychle chřadnout. Po přesazení se jejich stav rychle zlepšil a rostliny zrychlily růst, zesílily a začaly odnožovat. Další vyklíčené rostliny byly takto přesazovány do jednoho měsíce po vyklíčení.

Následně v pravidelných 2–3 měsíčních cyklech byly sterilní kultury rdestu přesazovány na nové kultivační médium. Během 2–3 měsíců totiž množící se rostliny postupně vyplnily kultivační sklenice a začaly pozvolna chřadnout (konečné pH média bylo v rozmezí 4,65–6,25), takže bylo nutné přesazení. V konečné fázi před dalším přesazením bylo ve sklenici cca 8–15 vzrostlých vrcholů různé velikosti. Do nového média

se vždy přesazovaly pouze 1–3 růstové vrcholy s poměrnými částmi oddenku. Přebytky rostlin byly poskytnuty do BÚ AV ČR a UHK k venkovnímu dopěstování v záchranných kulturách. Sterilní rostliny byly pěstovány při 21 °C s umělým osvětlením 12 hodin denně (dvě lineární zářivky, asi 20–30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR) bez třepání.

Kultivace *Potamogeton praelongus* v záchranných kulturách, dopěstování rostlin získaných ze sterilní kultury *in vitro*

V letech 2009–2010 byl *P. praelongus* v BÚ AV ČR v Třeboni pěstován v záchranné kultuře ve třech nádržích o výšce 69 cm a ploše asi 1,5 m², které byly zimovány na sucho (viz HUSÁK & ADAMEC 1998), zatímco zimování ve sbírkové nádrži probíhalo v hluboké vodě. Rostliny rdestu získané ze sterilní kultury *in vitro* byly nejčastěji v malých trsech sázeny do jedné uvolněné záchranné nádrže do hloubky asi 30–40 cm. Od konce roku 2011 je druh v BÚ AV ČR v Třeboni pěstován jen ve sbírkové nádrži.

Do tří malých vodních nádrží v Býšti byly v dubnu 2011 zasázeny malé rostlinky ze sterilní tkáňové kultury o velikosti 4–6 cm do květináčů a truhlíků se substrátem tvořeným pískem, bahnitým sedimentem z ramene Orlice a jílem v poměru 3:3:1. Nádrže byly současně provzdušňovány vzduchovacím motorkem.

Výběr potenciálních lokalit pro reintrodukcii *Potamogeton praelongus*

V rámci nivy Orlice na Královéhradecku a v nivách Ploužnického potoka a Ploučnice na Českolipsku jakožto na místech historického výskytu proběhlo vytipování potenciálních lokalit pro výsadby *P. praelongus* ze záchranné kultivace a ze záložní populace (PRAUSOVÁ et al. 2000). Podkladem pro výběr lokalit byla měření základních parametrů vody (pH, elektrická vodivost, alkalinita) a posouzení vlastností biotopu (zástin, výskyt mokřadní vegetace atd.). Při výběru potenciálních lokalit byly jako vhodné parametry vody pro růst druhu použity následující hodnoty: pH reakce 7,1–8,4, elektrická vodivost 11–41 mS $\cdot$ m⁻¹, celková alkalinita vyšší než 1,2 mekv $\cdot$ l⁻¹.

Výsledky

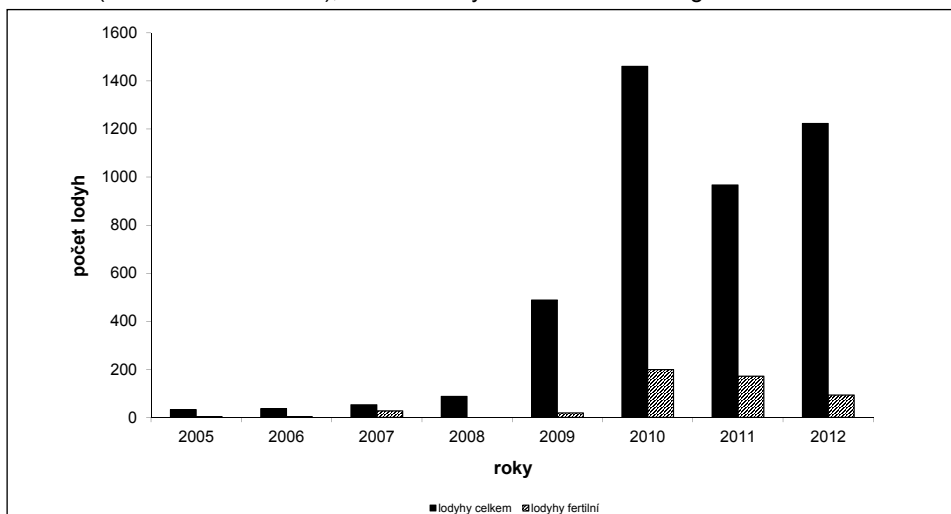
Monitoring populací v ČR

Niva Orlice

V nivě Orlice proběhl monitoring *P. praelongus* v PCHP Rameno u Stříbrného rybníka (dále PCHP) a v lokalitě Kašparovo jezero s úspěšnou výsadbou z roku 2008. V PCHP má populace *P. praelongus* vzestupný trend (PRAUSOVÁ et al. 2010), k dočasnému poklesu došlo v roce 2011 (obr. 3). Na lokalitě Kašparovo jezero byla prosperující mikropopulace v roce 2011 negativně ovlivněna okusem býložravými rybami (obr. 4) a ve vegetační sezóně 2012 byl druh na lokalitě znovu nalezen ve 3 malých trsech (cca 30 lodyh).

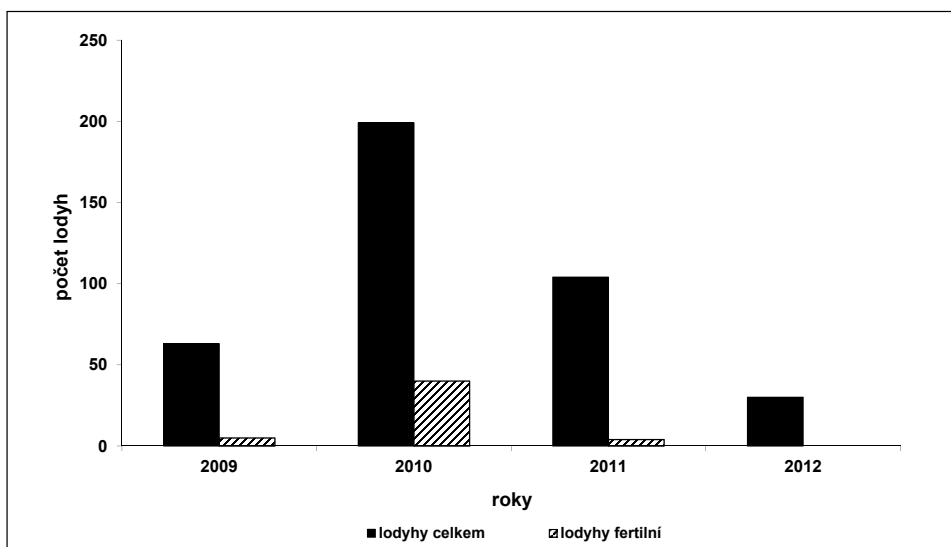
V PCHP je mikropopulace stále soustředěna zejména do místa zaústění ramene do Orlice, ale díky výsadbám v roce 2008 se rozšiřuje podél obou břehů ramene a přibývá tak rostlin vzdálenějších od vlastního zaústění ramene do Orlice. Nové trsy jsou nalézány na plochách nepřímě ovlivněných činnostmi sacího bagru (odbahnění realizováno v roce 2003). Při použití sacího bagru byly totiž ponechány bez zásahu pruhy podél břehů o šířce cca 3 m, naopak střední část ramene byla odbahněna. V následujících letech se bahnitý sediment od břehů ramene sesunul do odbahněné střední části. Podél břehů tak vznikly mělké plochy s výrazně tenčí vrstvou bahna, které jsou

v současné době pozvolna osídlovány novými rostlinami. Tyto nové rostliny vznikají odnožováním z původních trsů, ale i uchycením vysázených lodyh (výsadby v roce 2008). Ve vegetační sezóně 2012 byly nové trsy *P. praelongus* nalezeny v nejhlubších částech ramene (u zaústění do Orlice), které vznikly činností sacího bagru v roce 2003.



Obr. 3. Stav mikropopulace *Potamogeton praelongus* v letech 2005–2012 v PCHP Rameno u Stříbrného rybníka.

Fig. 3. The abundance of the micropopulation of *Potamogeton praelongus* in the Temporarily Protected Area Rameno u Stříbrného rybníka oxbow lake in 2005–2012.

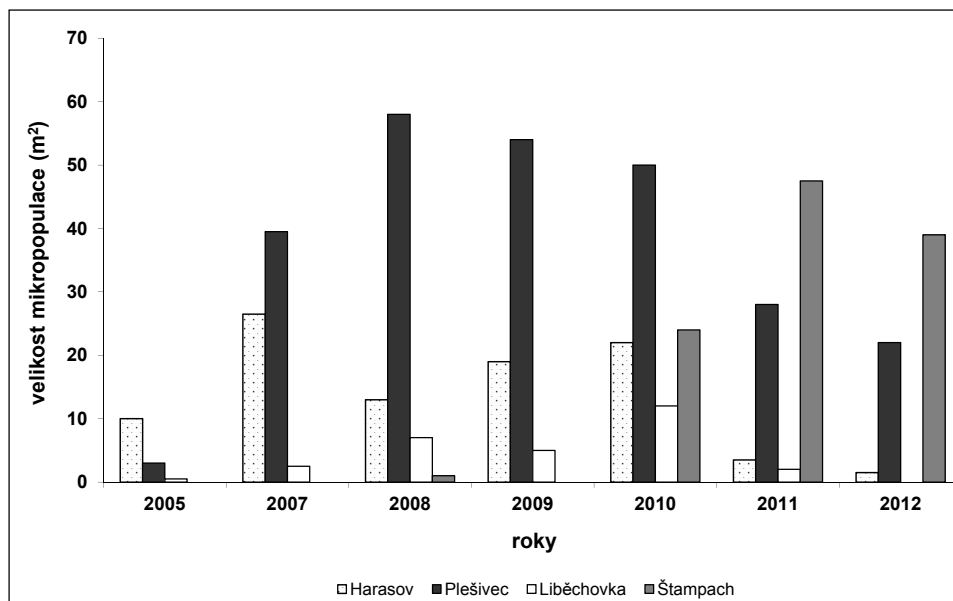


Obr. 4. Stav mikropopulace *Potamogeton praelongus* v letech 2009–2012 v lokalitě Kašparovo jezero.

Fig. 4. The abundance of the micropopulation of *Potamogeton praelongus* in Kašparovo jezero oxbow lake in 2009–2012.

CHKO Kokořínsko

V současné době druh roste v lokalitách: tůňě pod Plešivcem, v nivě Liběchovky, u Štampachu a nad rybníkem Harasov. Velikost mikropopulací se mění v souvislosti s intenzitou zarůstání relativně malých a ve většině případů mělkých tůň. Pokles velikosti mikropopulací (obr. 5) byl zaznamenán ve všech lokalitách s výjimkou tůňě u Štampachu, která byla vybudována nejpozději. Většina tůň je negativně ovlivněna zarůstáním rákosinovými druhy, ale i konkurenčně silnými vodními makrofyty (např. *Potamogeton natans*). V letech 2010–2011 Správa CHKO provedla řízené zásahy na všech lokalitách. Byly posekány litorály velkých tůň, u některých malých tůň proběhlo jejich obnovení. Ve vegetační sezóně 2012 byl velmi kritický stav v tůňích v nivě Liběchovky a v tůňi nad rybníkem Harasov, kde druh ustoupil konkurenčně silnějším druhům a negativním vlivům člověka (nelegální chov ryb, znečištění povrchových vod).



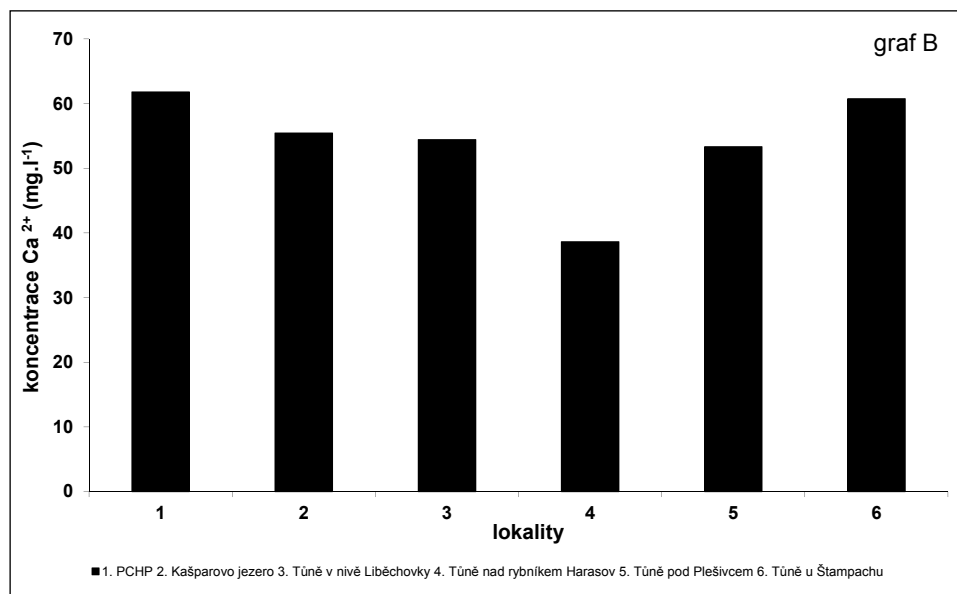
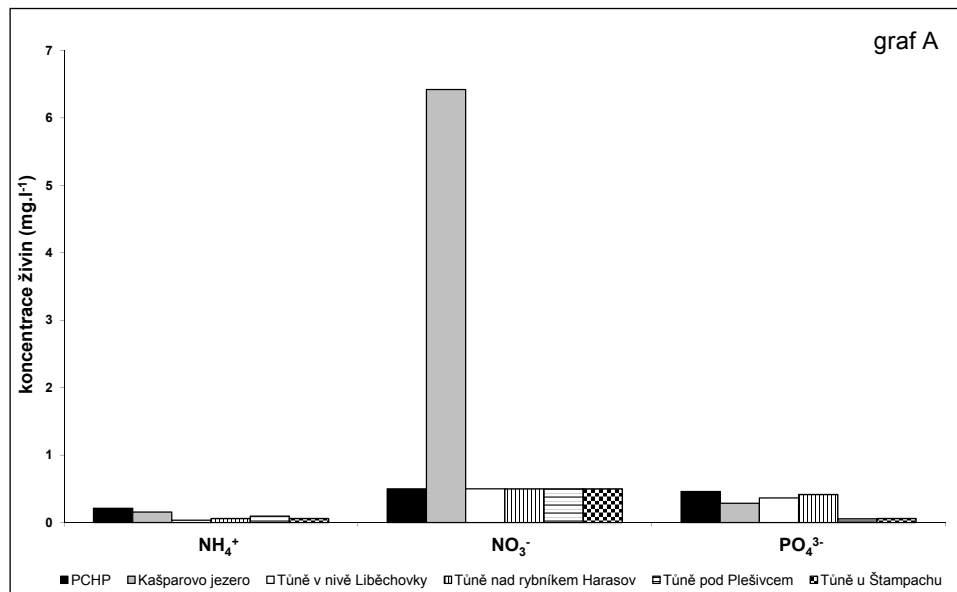
Obr. 5. Stav mikropopulací v jednotlivých lokalitách v CHKO Kokořínsko v letech 2005–2012.

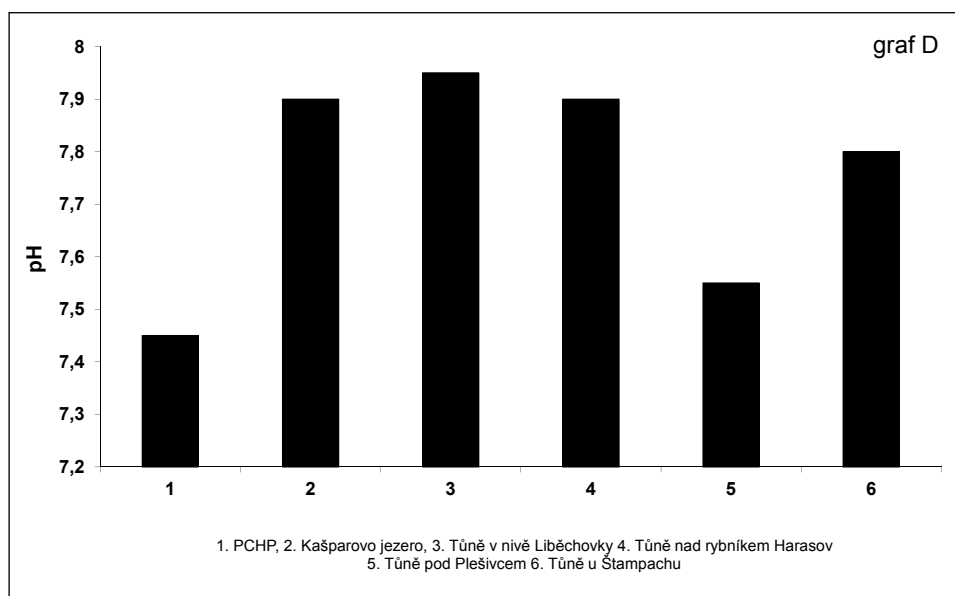
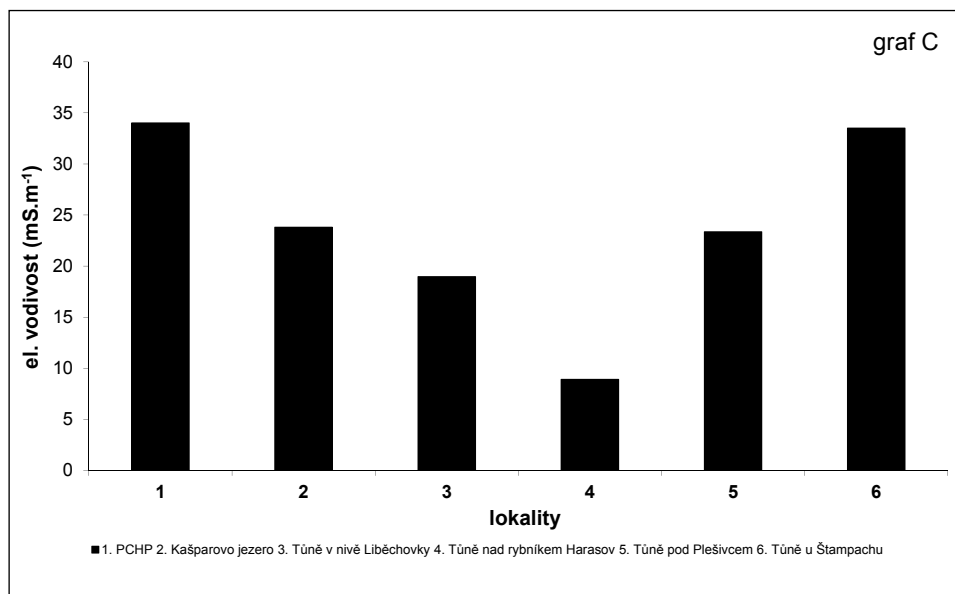
Fig. 5. The abundance of the micropopulations of *Potamogeton praelongus* at sites in the Kokořínsko Protected Landscape Area in 2005–2012.

Monitoring stanovištních poměrů lokalit *Potamogeton praelongus* v ČR

Z naměřených hodnot základního chemismu vody (obr. 6a–d) vyplývá, že ve všech lokalitách roste *P. praelongus* v mírně alkalickém prostředí, průměry z naměřených hodnot se pohybují v rozmezí 7,4–7,9. Nejnížší hodnoty pH byly naměřeny v PCHP, naopak nejvyšší hodnoty byly naměřeny v tůňi v nivě Liběchovky. Průměrné hodnoty elektrické vodivosti se ve většině lokalit pohybovaly mezi 19 a 34 mS · m⁻¹. Výrazně nižší průměr byl zaznamenán v tůňi nad rybníkem Harasov. Průměrné hodnoty koncentrace vápníku dosahovaly 53–62 mg · l⁻¹, pouze v lokalitě tůňě nad rybníkem Harasov byla v průměru naměřena koncentrace 38 mg · l⁻¹. V lokalitách v nivě Orlice roste rdest ve vodách s vyšším obsahem dusičnanových, dusitanových a amonných iontů, jejichž zdrojem je

zejména voda v Orlici zatížená zemědělským využíváním pozemků v okolí, přítomností chatových osad a dalším lokálním znečištěním. V současné době stav PCHP zhoršuje též manipulace na Stříbrném rybníku, z něhož je eutrofní voda vypouštěna výpustí přímo do ramene s *P. praelongus*. Část ramene pod zaústěním Stříbrného potoka je zanesená velkým množstvím písčitého sedimentu, který pochází z povodí toku, kde probíhají technické úpravy koryta i budování lesních rybníků.





Obr. 6. Srovnání průměrných naměřených hodnot ve vodě za období 2005–2011: a) koncentrace NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , b) koncentrace vápníku, c) elektrická vodivost a d) pH na lokalitách s mikropopulacemi *Potamogeton praelongus*.

Fig. 6. Comparison of mean values measured in water at the period 2005–2011: a) concentration of NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , b) concentration of Ca^{2+} , c) conductivity, d) pH at sites with micropopulations of *Potamogeton praelongus*.

Testování klíčivosti

Z dílčích výsledků dosud realizovaných testů klíčivosti (JANOVÁ 2010, PRAUSOVÁ & JANOVÁ 2010, PRAUSOVÁ et al. 2011, 2013, SIKOROVÁ 2011) vyplývá nejúspěšnější klíčení zavodněných nažek při střídání teplot, kdy jsou nažky několik měsíců uloženy ve vodovodní vodě v kádinkách v ledničce při teplotě 8 °C a následně přeneseny do pokojové teploty (21 ± 1 °C) nebo do termostatu (28 ± 1 °C) na dobu 1 a více týdnů. Při kultivaci 2,5 měsíce v ledničce a 14 dní v pokojové teplotě 21 °C dosáhla klíčivost 32,7 % (PRAUSOVÁ et al. 2013), při kultivaci v termostatu při teplotě 28 ± 1 °C dosáhla klíčivost 66 % (SIKOROVÁ 2011). V současné době probíhají další testy založené na principu stratifikace. K dalším úspěšným testům klíčivosti patří vystavení nažek rdestu anaerobnímu prostředí, které je docíleno přikápnutím několika kapek ethanolu do Petriho misek a následným oblepením okrajů Petriho misek izolepou. U zavodněných nažek se klíčivost v anaerobním prostředí pohybovala kolem 12 % (PRAUSOVÁ et al. 2013). Pozitivně klíčení ovlivnilo též ozáření UV lampou (UV-A záření) po dobu 30 minut, kdy zavodněné nažky dosáhly klíčivosti 15 % (PRAUSOVÁ et al. 2013). K přírodě blízkým postupům patří též mechanické poškození nažek smirkovým papírem, následně kultivovaných v Petriho miskách v termostatu při teplotě 28 ± 1 °C, kdy klíčivost dosáhla u zavodněných nažek 8 % (PRAUSOVÁ et al. 2013). Nažky rdestu klíčí též po ošetření přípravkem Savo (SIKOROVÁ 2011, PRAUSOVÁ et al. 2013), kdy dojde k odstranění nepropustného oplodí a osemení a zlepší se prostupnost pro vodu. Úspěšnost růstu klíčků však závisí na koncentraci Sava. Testy prokázaly, že dlouhodobé působení 100% Sava vyvolává narušení embrya, takže růst klíčků ustává (PRAUSOVÁ et al. 2013). Z dosavadních testů vyplynuly jako nejvhodnější varianty aplikace 100% Sava po dobu 2 hodin nebo 50% Sava po dobu 2–4 hodin. V těchto variantách se klíčivost pohybovala v rozmezí 5–10 % (PRAUSOVÁ et al. 2013). Nažky vůbec nevyklíčily ve variantách, kdy byly vystaveny působení kyseliny giberelové, dále pak v případě kultivace na agaru, kde snadno podléhaly kontaminacím. Komplex testů klíčivosti stále pokračuje.

Zjištění genetické variability populací *Potamogeton praelongus* vyskytujících se na území České republiky metodou AFLP

Pomocí osmi primerových kombinací se třemi až pěti (E-xyz/M-xyzqw) selektivními nukleotidy (tab. 1) bylo nalezeno 322 detekovatelných fragmentů, z nichž 172 bylo polymorfních (53,4 %). Detailní informace o použitých primerových kombinacích jsou dostupné u autorů.

Tab. 1. Použité kombinace primerů a počty detekovaných AFLP fragmentů.

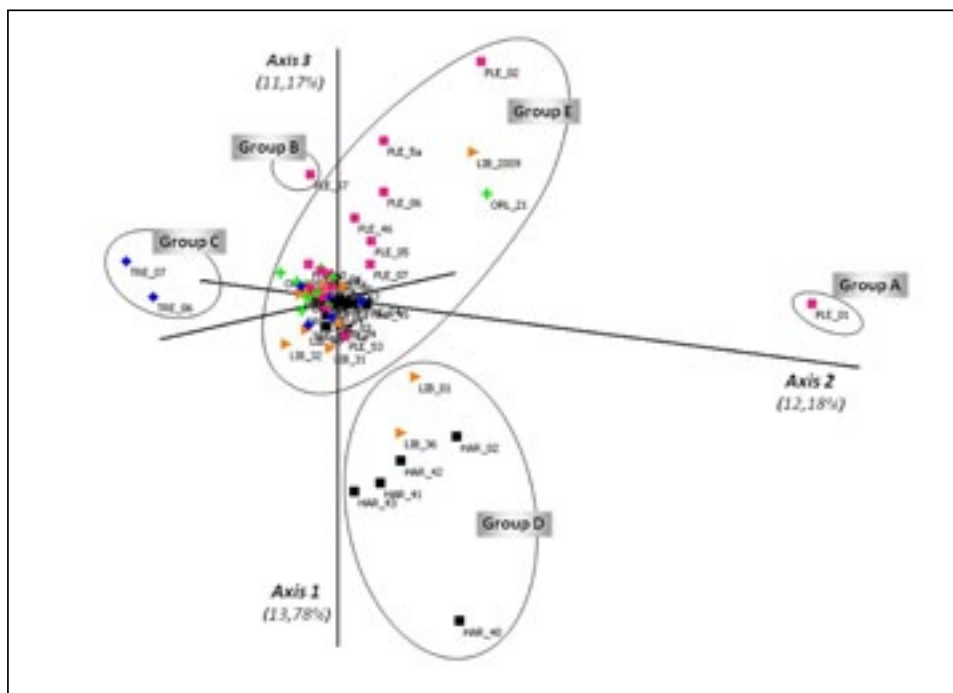
Table 1. Combination of primers and numbers of detected AFLP fragments.

Použité primery	Celkový počet bandů	Počet polymorfních bandů
E-ACT/M-CAG	17	32,07 %
E-ACT/M-AAG	36	25,00 %
E-ACT/ M-CGA	27	59,26 %
E-ACT/ M-CAAC	37	54,05 %
E-AGC/ M-CAACG	63	63,49 %
E-AGC/M-CGATG	22	63,63 %
E-AGC/ M-CGATC	69	73,90 %
E-ACA/ M-CAACG	13	30,77 %
Celkový počet fragmentů	322	53,41 %

Nejvyšší hodnotu polymorfismu (36,3 %) vykazovala populace Plešivec, dále populace Liběchovka (23,9 %), Harasov (14,9 %) a Orlice (12,7 %) a Třeboň (12,1 %). Podobně jako u polymorfismu byly nejvyšší hodnoty heterozygotnosti (0,040) zjištěny u populace Harasov, dále u populace Plešivec (0,033), Liběchovka (0,029) a Třeboň (0,026). Nejnižší hodnota heterozygotnosti (0,009) byla zjištěna u populace Orlice.

Celková genetická variabilita studovaného souboru je nízká ($H_t = 0,0554$). Analýzou molekulární variance bylo zjištěno, že 83,7 % této celkové variability představují rozdíly mezi jednotlivými vzorky uvnitř populací, zatímco pouze 16,3 % rozdíly mezi studovanými populacemi. Vysokou míru podobnosti analyzovaných populací (nízkou úroveň divergence alel v populacích) ukazuje hodnota Wrightova fixačního indexu ($F_{st} = 0,0131$).

Nízká úroveň genetické variability mezi studovanými populacemi i uvnitř studovaných populací a absence členění vzorků podle odběrových lokalit je patrná i z PcoA diagramu (obr. 7), kde byl analyzovaný soubor vzorků rozdělen do pěti skupin (Group A – Group E). Většina vzorků vytváří mohutnou skupinu označenou jako „Group E“. Ve skupině „Group D“ převládají vzorky z Harasova a skupina „Group C“ představují dva vzorky z Třeboň (Třeboň 06 a 07). Oddělení vzorků „Plešivec 1“ (Group A) a „Plešivec 57“ (Group B) od zbytku analyzovaných vzorků (Group C–E) bylo zřejmě způsobeno přítomností epifytických organismů na odebraných listech.



Obr. 7. Výsledky analýzy PCoA (Principal Coordinate Analysis) – 3D diagram. Pomocí tří prvních os je vysvětleno 37,2 % celkové variability studovaného souboru (PLE, Plešivec; HAR, Harasov; LIB, Liběchovka; ORL, Orlice; TRE, Třeboň).

Fig. 7. Principal coordinate analysis of the pair-wise Jaccard's similarity matrix of 138 *P. praelongus* samples. The first three principal coordinates accounted for 37.2 % of the total variation (PLE, Plešivec; HAR, Harasov; LIB, Liběchovka; ORL, Orlice; TRE, Třeboň).

Vytvoření sterilní kultury *in vitro*

Z 238 sterilně vyšetých semen rdestu dlouholistého sterilně vyklíčilo 49 semen, které daly základ pro 30 jednotlivých klonových linií (obr. 8), které jsou dále udržovány a pravidelně přesazovány. Podařilo se odvodit úspěšný protokol pro převod rdestu dlouholistého prostřednictvím semen do podmínek *in vitro* a také optimalizovat další dlouhodobou kultivaci *in vitro* na tekutém modifikovaném médiu Gamborg B5. Kultury mohou sloužit pro dostatečné namnožení rostlin ve sterilních podmínkách jak již pro (re)introdukce anebo jako cenný materiál pro další výzkum tohoto kriticky ohroženého druhu.



Obr. 8. Klíčící semena rdestu na tekutém a pevném médiu, leden 2010, průměr zkumavek 3 cm. Foto K. Pásek 2010.

Fig. 8. Germinating seeds of *Potamogeton praelongus* in a liquid and solid medium, January 2010, diameter of test tube 3 cm. Photo K. Pásek 2010.

Použité tekuté médium Gamborg B5 v navrhované modifikaci se jeví jako vhodné pro dlouhodobou kultivaci rdestu v podmínkách *in vitro*. Rostliny na něm dobře rostou a během 2–3 měsíců vyplní objem sklenice (obr. 9). Na rostlinách nejsou patrné žádné deformace ani poruchy růstu. Rostliny se také dobře množí – přibližně 4–6 násobně za jeden kultivační cyklus. Pro kontinuální růst bez stagnace je nutné je přesazovat alespoň každé 2–3 měsíce na nové médium. Není také pozorováno žádné omezení růstu během zimního období.

Testovaný objem média cca 50–70 ml ve sklenici 350 ml (výška hladiny média cca 1 cm) pro submerzní pěstování se jeví jako nedostatečné, z důvodů neuspokojivého růstu listů nad médiem a jejich částečného odumírání na konci kultivačního cyklu. Rostlina uvítá plné ponoření alespoň do 300 ml média ve sklenicích 500 ml (výška hladiny 7 cm). Větší množství média a větší sklenice se jeví mnohem více optimální, neboť rostliny mohou vyrůst na délku i 12 cm v jednom kultivačním cyklu. Testované médium o pH 5,7 je pro rdest příliš kyselé, rostliny rostou mnohem lépe na médiu s vyšším pH 6,5, které více odpovídá ekologickým nárokům tohoto druhu.



Obr. 9. Optimálně narostlé kultury ve stáří dvou měsíců, vhodné k převodu do kultury anebo k přesazení do nového média. Foto K. Pásek 2010.

Fig. 9. Optimally grown up *in-vitro* cultures at the age of two months, appropriate for transplantation to outdoor cultivation tanks or a new medium. Photo K. Pásek 2010.

Kultivace *Potamogeton praelongus* v záchranných kulturách, dopěstování rostlin získaných ze sterilní kultury *in vitro*

V záchranné kultuře v BÚ AV ČR v Třeboni se daří již od roku 1988 *P. praelongus* přezimovat. Nejvhodnějším způsobem je přezimování pod vodou. Rostliny *P. praelongus* přezimují mnohem lépe a následný růst rostlin je mnohem stabilnější. Při přezimování na sucho přežije jen asi 10–30 % prýtů. Rostliny přezimované na sucho průběžně trpí odumíráním bází stonků, což je zřejmě spojeno s nevhodným složením a ulehlostí substrátu (malý podíl rozložitelných organických látek a málo živin N a P).

Rostliny rdestu přezimované pod vodou mohou bohatě kvést již ve druhé polovině května. Opylování rdestu závisí na počasí. Např. v květnu 2010 (nízké teploty, déšť) byly rostliny jen slabě opylovány, takže počet vyvíjejících se nažek byl poměrně nízký a nevyrovnaný. V některých květenstvích byly jen 1–3 dozrávající nažky. Při hodnocení v polovině září 2010 bylo napočítáno jen 62 plodenství s alespoň jednou zralou nažkou, tj. jen 61 % otevřených květů bylo schopno vytvářet zralé plody. Mnoho květů uhnulo ještě před možným dozráváním plodů. Celkový počet zralých nažek z 62 plodenství byl 378, v průměru jen 6,10 nažek na plodenství. Plodenství s uhnívajícími stopkami se v průběhu srpna postupně sbírají a ukládají v průlničité textilií. Nechají se dozrát ve vodě ve sbírkové nádrži. Zralé nažky jsou následně posbírány, propláchnuty vodou a předány na testy klíčivosti (UHK).

Na konci července 2010 bylo přibližně 100 rostlin vylahvených ze sterilní kultury vysazeno do záchranné nádrže ve sbírce BÚ AV ČR v Třeboni. Tyto rostliny rdestu, které byly přesazeny na nová média ve sterilní kultuře začátkem května 2010, měly velikost prýtů asi 5 až 15 cm. Měly nápadně dobře vyvinuté dlouhé kořeny. Přesazené rostliny rdestu po přechodné době asi dvou týdnů začaly znovu růst a do konce srpna 2010 zvětšily svou délku.

Ze sterilní tkáňové kultury bylo na podzim 2010 a začátkem května 2011 dodáno cca 25 klonů *P. praelongus* (po cca 5–20 rostlinkách) na UHK. Pěstování proběhlo ve 4-litrových lahvích a 3 akváriích (objem 15–20 l) v klimaboxu za stálé teploty $21 \pm 1^\circ\text{C}$, délky dne 16 hodin, intenzity světla $700 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Rostlinky ze sterilní tkáňové kultury se lišily jak velikostí, tak svojí vitalitou. Z celkového množství rostlinek se v klimaboxu ujalo přibližně 75 %. Rostlinky, které se ujaly, začaly poměrně brzy tvořit oddenkový systém a nové lodyhy.

Od května do srpna 2011 byly rostliny o velikosti 10 cm průběžně přenášeny z klimaboxu do samostatných květináčů do venkovní záchranné kultury v Býšti. K 31. 10. 2011 se podařilo vypěstovat přibližně 600 lodyh rdestu dlouholistého. Úspěšnost uchycení přenesených rostlin byla téměř 100%. Několik jedinců bylo na podzim 2011 experimentálně vysazeno na 4 přírodní lokality za účelem otestování schopnosti adaptace v konkrétních podmínkách a schopnosti přezimovat. Ve vegetační sezóně 2012 však na lokalitách nebyly nalezeny žádné rostliny. Rdest byl ve venkovní záchranné kultuře v Býšti přezimován pod vodou, ale žádná rostlina nepřežila. Rostliny ze sterilní tkáňové kultury byly pěstovány v záchranné kultuře v Býšti také v roce 2012.

Měření základních veličin chemismu vody (pH, elektrická vodivost) v červenci 2010 ve vodě v nádržích BÚ AV ČR v Třeboni prokázala velké rozdíly mezi nádržemi. Odlišnosti jsou evidentně způsobeny biomasou vodních rostlin v nádržích. Zatímco ve sbírkové nádrži v důsledku přítomnosti vysoké biomasy několika druhů rdestů bylo pH kolem 9,4 a vodivost byla vlivem vysrážení části uhlíčanů na rostlinách nízká ($20 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$), v ostatních záchranných nádržích s nízkou biomasou rostlin bylo pH jen mezi 8,1–8,9 a vodivost mezi 28,2 až $35,0 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$. V záchranné kultuře v Býšti se pH v průběhu vegetační sezóny 2011 pohybovalo mezi 7,34–9,93 (σ 8,69), vodivost mezi $15,9$ – $51,1 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$ (σ $26,0 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$).

Výběr potenciálních lokalit pro reintrodukcí *Potamogeton praelongus*

Před zahájením projektu, tj. do roku 2009, byla úspěšná jediná výsadba v nivě Orlice, a to na Kašparově jezeře – pravobřežním rameni Orlice u Hradce Králové – Slezského Předměstí ($50^\circ 12' 47,38''\text{N}$, $15^\circ 52' 20,14''\text{E}$). V průběhu řešení projektu a v následujících letech bylo vytipováno a v terénu ověřeno 20 potenciálních lokalit pro výsadby, z toho 10 v nivě Orlice a 10 v povodí Ploučnice na Českolipsku. Proběhly též experimentální výsadby do těchto lokalit, z nichž v nivě Orlice nebyla úspěšná žádná a v nivě Ploučnice byly úspěšné dvě. Dočasně úspěšná byla výsadba v roce 2010 do Ploučnice ve vojenském prostoru Ralsko ($50^\circ 37' 51,734''\text{N}$, $14^\circ 43' 5,682''\text{E}$), kde vysázené rostliny přezimovaly. Při vysokém průtoku v průběhu roku 2011 však byly odplaveny. Další vysázené rostliny přezimovaly v rameni Ploučnice u obce Heřmaničky ($50^\circ 39' 50,987''\text{N}$, $14^\circ 36' 37,843''\text{E}$), kde byly vysázeny ve druhé polovině vegetační sezóny 2011 a po celou vegetační sezónu 2012 byly v lokalitě nalézány (přibližně 25 rostlin). Přestože vytipované lokality splňovaly parametry potenciálních lokalit pro výsadbu rdestu, vlastní výsadby měly velmi nízkou úspěšnost. Na přírodních lokalitách je mnoho dalších faktorů, které úspěšnost výsadeb ovlivňují, např. vyšší průtoky, tlak byložravých živočichů (ryby, vodní ptáci apod.), rybářské či rekreační využití lokalit. Další lokality jsou i nadále vyhledávány, a to nejen v nivách toků, ale i v sukcesně mírně pokročilých zavodněných pískovnách.

Diskuse

Z pravidelného monitoringu mikropopulace *P. praelongus* v letech 2005–2012 vyplývá vzrůst početnosti i pokryvnosti tohoto taxonu v PCHP Rameno u Stříbrného rybníka. Největší velikosti populace dosáhla v roce 2010. V roce 2011 byla populace negativně ovlivněna rybáři, kteří v rámci úprav břehů ramene naházeli v době květu veškerý drn i se zeminou do kvetoucích porostů *P. praelongus*. Je jasné, že rostliny nemohly být dostatečně opyleny

a zároveň měly ztížené podmínky pro dýchání a fotosyntézu vzhledem k pokrytí listů jemnými částicemi pocházejícími z naházeného materiálu. Česká inspekce životního prostředí v Hradci Králové bohužel ukončila řešení případu pro nedostatek důkazů. V roce 2012 byl v lokalitě zaznamenán další negativní vliv, a to okus rostlin polodivokými kachnami.

Z dosavadních experimentálních výsadeb druhu, které probíhají od počátku realizace záchranného programu na Královéhradecku, byla dosud úspěšná pouze výsadba v roce 2008 v Kašparově jezeře, které se nachází na opačném břehu Orlice cca 1,5 km severozápadně od PCHP. Úspěšné byly též posilovací výsadby v PCHP Rameno u Stříbrného rybníka, které proběhly v letech 2005 a 2008. Na Českolipsku se jeví jako úspěšná výsadba z roku 2011 v místě zaústění levostranného ramene do řeky Ploučnice u Heřmaniček. Při vyhledávání nových potenciálních lokalit pro výsadby *P. praelongus* se osvědčily lokality, které mají podobný charakter jako PCHP nejen z hlediska chemických parametrů vody a sedimentu, ale také z hlediska podobné geomorfologie. Současné mikropopulace *P. praelongus* rostou v ramenech Orlice nebo Ploučnice, která jsou alespoň dolním koncem napojena na řeku. Rostou v místě zaústění ramene do řeky v kamenném záhozu, kde jsou chráněné proti odnosu při povodňových stavech. V prostorách mezi balvany se dostávají k živinami bohatému sedimentu. Zároveň jsou ovlivněny proudící vodou. V nivě Orlice se k výsadbám doposud neosvědčila zcela odstavená ramena, která mají charakter zázemňujících se tůň.

Odlíšná situace je v CHKO Kokořínsko, kde *P. praelongus* roste v soustavách různě velkých tůň. Tyto mikropopulace byly založeny výsadbou v letech 2001–2005 do nově vybudovaných tůň. Od roku 2005 je pravidelně monitorován jejich stav, který je značně závislý na stavu sukcese v tůňích a na klimatických poměrech v daném roce. Zejména malé tůně rychle zarůstají a vodní rostliny ustupují šířícím se druhům rákosin. Svoji roli sehrává též výška vodní hladiny a její prohrátí, které ovlivňuje vitalitu rostlin v průběhu vegetační sezóny. Horní části lodyh vystavené přehřátí hnědnou a odumírají. Díky řízeným zásahům, které Správa CHKO Kokořínsko v lokalitách realizuje, se daří udržovat většinu tůň ve stadiu sukcese, které je pro mikropopulace *P. praelongus* a dalších vodních makrofyt příznivé. S největší pravděpodobností bude nutné konstatovat zánik mikropopulací v tůňích v nivě Liběchovky a v tůni nad rybníkem Harasov, kde velkou roli sehrálo nelegální vysazování ryb a znečištění vody.

Ze srovnání chemických parametrů vody v lokalitách v nivě Orlice, Ploučnice a v CHKO Kokořínsko vyplývá, že se lokality shodují mírně zásaditou reakcí, srovnatelnou vodivostí, ale trofie vody (zejména zastoupení různých forem dusíku) je v nivě Orlice vysoká a dost proměnlivá v čase. Souvisí to se zdroji znečištění, které v nivě Orlice na Královéhradecku a také přímo v lokalitě PCHP jsou. Z těchto výsledků vyplývá, že *P. praelongus* roste v mírně eutrofním prostředí, snáší i dočasný nárůst obsahu živin ve vodě a jeho opětovný pokles.

Předpokladem úspěšných výsadeb je napěstování dostatečného množství lodyh a též zvýšení jejich genetické variability s využitím sterilní kultury *in vitro*. Z výsledků genetických analýz vyplynula velmi nízká genetická variabilita českých mikropopulací rdestu dlouholistého, čímž se potvrzuje, že druh se v lokalitách rozrůstá vegetativní cestou. Navíc záložní mikropopulace v CHKO Kokořínsko, záchranná kultivace v BÚ AV ČR v Třeboni a nově založené mikropopulace v Kašparově jezeře v nivě Orlice a v rameni Ploučnice u Heřmaniček pocházejí z přesazených rostlin z PCHP. V současné době je k dispozici cca 30 nových klonů, které byly získány metodou *in vitro* z nažek. Z těchto klonů bude možné dopěstovat rostliny k výsadbám v záchranné kultuře v Býšti. Tuto sterilní kulturu *in vitro* je nutné udržet v laboratorních podmínkách tak dlouho, dokud se nepovede přenést dopěstované rostliny z této kultury do vhodných potenciálních lokalit a založit z nich nové mikropopulace. Podmínkou získání dostatečně velkých a vitálních rostlin pro výsadby, reintrodukce a introdukce je pěstování rostlin získaných ze sterilní kultury *in vitro* po dobu 2 let v záchranné kultuře v Býšti. Mladé rostliny musí po první vegetační sezóně v kultuře přezimovat a v následující vegetační sezóně investovat energii jak do asimilující, tak

do nezelené, podzemní části. Potřebují mít bohatý kořenový systém s oddenky, který zvyšuje pravděpodobnost jejich uchycení při výsadbách do přírodních lokalit. Spektrum posuzovaných lokalit pro výsadby se rozšířilo o zaplavené písčiny v pokročilém stadiu sukcese.

Optimální podmínky pro růst *P. praelongus* v PCHP jsou pouze v úseku 10–15 m od zaústění ramene do Orlice. Zbývající části ramene momentálně jako biotop druhu nevyhovují a jsou předmětem plánovaného odbahnění. Dvě dílčí odbahnění realizovaná v letech 2001 a 2003 se osvědčila jako účinná. Velikost populace *P. praelongus* v PCHP vzrostla od roku 2005 z původních 32 lodyh na počet asi kolem tisíce lodyh v současnosti. Přesto je nutné odbahnit i zbývající části ramene. Zajištění ochrany PCHP vyžaduje komplexní řešení v povodí Stříbrného potoka, kde je zásadním problémem intenzivní splach písčitého sedimentu, a v povodí Orlice, odkud do ramene přicházejí živiny ovlivňující trofiu v rameni. Prvním drobným úspěchem tohoto přístupu je zahájení výstavby migračně prostupné sedimentační nádrže na Stříbrném potoce nad jeho zaústěním do ramene v říjnu 2012. Následovat musí šetrné odbahnění ramene, které je předmětem v současnosti realizované studie proveditelnosti, kterou zpracovává Povodí Labe, s. p. Současně je nutné řešit vypouštění rybářsky využívaného Stříbrného rybníka a odpadních vod z chat, které v blízkosti lokality stojí. Podkladem pro všechna plánovaná a realizovaná opatření jsou výsledky průzkumů realizovaných v rámci záchraného programu (dlouhodobý monitoring populace rdestu dlouholistého, stanovištních poměrů, floristický, hydrobiologický, ichtyologický, malakologický, odonatologický, batrachologický a ornitologický průzkum).

P. praelongus zůstane nadále kriticky ohroženým druhem, který v ČR bude žít v malých mikropopulacích na několika lokalitách. Tyto lokality budou muset mít vyřešenou nejen ochranu druhu, ale též ochranu biotopu. Druhá ochrana bude muset jít ruku v ruce s územní ochranou. V případě úspěšné realizace záchraného programu se předpokládá změna ochrany v lokalitě Rameno u Stříbrného rybníka z kategorie přechodně chráněná plocha na vyšší kategorii ochrany.

Shrnutí

V současné době roste *Potamogeton praelongus* v České republice na jediné původní lokalitě, v přechodně chráněné ploše Rameno u Stříbrného rybníka u Hradce Králové. V rámci záchraného programu se v roce 2008 podařilo založit novou mikropopulaci v pravobřežním rameni Orlice (Kašparovo jezero) a levobřežním rameni Ploučnice. Všechny stávající lokality *P. praelongus* v přirozeném prostředí mají velmi podobný charakter, dolním úsekem zaústějí do řeky a rdest v nich roste v kamenném záhozu.

Záložní mikropopulace byly založeny v letech 2003–2005 v tůních v CHKO Kokořínsko nezávisle na záchraném programu. V současné době jsou mikropopulace *P. praelongus* ve všech lokalitách – tůně nad rybníkem Harasov, u Štampachu, v nivě Liběchovky, pod Plešivcem – monitorovány a využívány ke sklizení nažek k vytvoření genetické banky a k testům klíčivosti, které jsou realizovány na Univerzitě Hradec Králové.

Kromě monitoringu stavu mikropopulací proběhl v letech 2009–2010 v rámci projektu „Záchrana *P. praelongus* v ČR“ monitoring jejich stanovišť. Voda na lokalitách v nivě Orlice je více zatížena dusičnanovými, dusitanovými a amonnými ionty než voda v tůních v CHKO Kokořínsko. Na všech lokalitách (niva Orlice i CHKO Kokořínsko) rdest roste v mírně alkalickém prostředí (v rozmezí 7,4–8,1), vodivost se pohybuje mezi 20 a 30 mS·m⁻¹ a průměrné koncentrace vápníku dosahují 50–60 mg·l⁻¹.

V testech klíčivosti byly neúspěšnější varianty, při nichž byly nažky *P. praelongus* vystaveny střídání teplot, anaerobnímu prostředí, UV-A záření nebo ošetření chlornanem sodným (přípravek Savo) v různých koncentracích. Testy však byly komplikovány značným šířením plísni v Petriho miskách.

Z 238 sterilně vysetých semen rdestu dlouholistého sterilně vyklíčilo 49 semen, které daly základ pro 30 jednotlivých klonových linií, které jsou dále udržovány a pravidelně přesazovány. Rostlinky dobře rostou při úplném ponoření alespoň ve 300 ml média ve sklenicích 500 ml (výška hladiny 7 cm). Optimální pH média je 6,5.

Nejvhodnějším způsobem přezimování *P. praelongus* v záchranné kultuře je přezimování pod vodou. Rostliny tak přezimují mnohem lépe a následný růst rostlin je mnohem stabilnější. Při přezimování na sucho přežije jen asi 10–30 % prýtů. Rostliny přezimované na sucho průběžně trpí odumíráním bází stonků, což je zřejmě spojeno s nevhodným složením a ulehlostí substrátu (malý podíl rozložitelných organických látek a málo živin N a P). Rostliny rdestu přezimované pod vodou mohou bohatě kvést již ve druhé polovině května.

Za účelem popularizace problematiky záchranného programu zajišťovaného AOPK ČR byla v roce 2010 v rámci řešení projektu vydána populárně-naučná publikace.

Summary

The last recent native Czech micropopulation of *Potamogeton praelongus* occurs in the Rameno u Stříbrného rybníka Temporarily Protected Area in the Orlice river floodplain near Hradec Králové. Out of all introductions of *P. praelongus* plants in this region, only those carried out at the Kašparovo jezero backwater oxbow lake at Slezské Předměstí (in 2008) and the backwater oxbow lake on the Ploučnice river at Heřmaničky (2011) have been successful so far. Moreover, a similar introduction of the plants to the last site has strengthened this micropopulation.

Rescue micropopulations have been created in pools at five sites in the Kokořínsko Protected Landscape Area since 2001–2005. These micropopulations are also important as a source of seeds that are used for germination tests.

Methods for stimulation of seed germination were determined in laboratory tests. Both changing of temperatures, anaerobic conditions, UV-A irradiation and treatment by a concentrated sodium hypochlorite solution were effective to markedly breaking very strong seed dormancy. Using a sterile *in-vitro* culture raised from sterilised seeds, 30 clones were created. Plants raised from this *in-vitro* culture could be grown up in an outdoor rescue culture for c. two years before being used at optimum for introductions to potential suitable field sites.

Genetic variation within and among 87 sampled plants in all populations of *P. praelongus* in the Czech Republic were analysed using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). The total genetic diversity within the populations was low ($H_t = 0.0554$). An analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the major variance component (83.7 %) was observed within the populations, while the inter-population variance accounted for only 16.3 % of the total variation.

Results of the action plan for *Potamogeton praelongus* were published in a colour book for the general public.

Poděkování

Autoři věnují tento článek památce významného československého a českého hydrobotanika Dr. Štěpána Husáka, CSc., který 25. 10. 2014 zemřel. Byl to právě on, kdo v 80. letech minulého století začal studovat tehdy ještě početné populace rdestu dlouholistého na Královéhradecku a v dalším desetiletí s autory tohoto článku řešil záchranu tohoto druhu na poslední lokalitě. Děkujeme mu za to, že rozpracoval záchranu tohoto druhu i že nás hodně naučil.

Výsledky výzkumu z let 2009–2010 byly finančně podpořeny grantem z Islandu, Lichtenštejnska a Norska, prostřednictvím finančního mechanismu EHP a finančního mechanismu Norska a MŽP. Následující výzkumy UHK v letech 2011–2012 byly podpořeny ze specifického výzkumu UHK (č. 2121, 2123/2011, 2122/2012) a z prostředků AOPK ČR na záchranné programy. Výzkum Katedry botaniky PFF UP Olomouc byl podpořen projektem MSM 6198959215. L. A. byl podpořen dlouhodobým koncepčním projektem RVO 67985939.

Literatura

- ADAMEC L. & PÁSEK K. (2000): Medium optimization for growing *Aldrovanda vesiculosa* *in vitro*. – *Carniv. Plant. Newslett. (Fullerton)* 29: 122–124.
- BILZ M., KELL S. P., MAXTED N. & LANDSDOWN R. V. (2011): European Red List of Vascular Plants [online]. – Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- DOYLE J. J. & DOYLE J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- HUSÁK Š. & ADAMEC L. (1998): Záchranné kultivace ohrožených druhů vodních a mokřadních rostlin v Botanickém ústavu AV ČR v Třeboni. – *Příroda* 12: 7–26.
- JANOVÁ J. (2008): Biologie a ekologie rodu rdest (*Potamogeton* L.) a možnosti zachování a obnovy populace kriticky ohroženého rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus* WULFEN) v České republice. – Ms. [Bakal. pr.; depon. in: Pedagogická fakulta, Univerzita Hradec Králové].
- JANOVÁ J. (2010): Rdest dlouholistý (*Potamogeton praelongus* WULFEN) v České republice. – Ms. [Dipl. pr.; depon. in: Pedagogická fakulta, Univerzita Hradec Králové].
- KITNER M., LEBEDA A., DOLEŽALOVÁ I., MARAS M., KRÍSTKOVÁ E., NEVO E., PAVLIČEK T., MEGLIC V. & BEHARAV A. (2008): AFLP analysis of *Isaaca saligna* germplasm collections from four European and three Middle Eastern countries. – *Israel J. Plant Sci.* 56: 185–193.
- KITNER M., MAJESKÝ Ľ., GILLOVÁ L., VYMYSLICKÝ T. & NAGLER M. (2012): Genetic structure of *Artemisia paniculata* populations inferred from AFLP and cpDNA data. – *Preslia* 84: 97–120.
- KOZELKOVÁ Z. (2011): Monitoring populací rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus* WULFEN) v České republice. – Ms. [Bakal. pr.; depon. in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové].
- KUBÁT K., HROUDA L., CHRTEK J. JUN., KAPLAN Z., KIRSCHNER J. & ŠTĚPÁNEK J. [eds] (2002): Klíč ke květeně České republiky. – Academia, Praha.
- PEAKALL R. & SMOUSE P. E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. – *Molec. Ecol. Notes* 6: 288–295.
- PEKÁRKOVÁ K. & LISCHKE P. (1974): Chemické metody analýzy vod. – SNTL, Praha.
- PRAUŠOVÁ R. (2011): Roční závěrečná zpráva – Záchranný program pro rdest dlouholistý. – Ms. [Depon. in: Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha].
- PRAUŠOVÁ R. & ADAMEC L. (2010): Záchranný program pro rdest dlouholistý *Potamogeton praelongus*. – Olga Čermáková, grafické a reklamní studio, Hradec Králové.
- PRAUŠOVÁ R. & JANOVÁ J. (2010): Současný stav výskytu rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*) v České republice. – *Příroda* 27: 155–168.
- PRAUŠOVÁ R., RYBKA V., ADAMEC L., HUSÁK Š. & RYDLO J. (2000): Záchranný program pro rdest dlouholistý. – Ms. [Depon. in: Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha].
- PRAUŠOVÁ R., DVOŘÁK V., ADAMEC L., KITNER M., PÁSEK K., ŠPAČEK J., HORÁLEK V., JURAJDA P., SIMON O., KLADIVOVÁ V., BERAN L., JANEČKOVÁ A. & ČÍP D. (2010): Záchrana rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus*) v České republice. Závěrečná zpráva projektu. – Ms. [Depon. in: Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Praha].
- PRAUŠOVÁ R., JANOVÁ J. & ADAMEC L. (2011): Rescue of the critically endangered long-stalked pondweed (*Potamogeton praelongus*) in the Czech Republic. – *Acta Biol. Sloven.* 54: 43–54.
- PRAUŠOVÁ R., JANOVÁ J. & ŠAFÁŘOVÁ L. (2013): Testing achene germination of *Potamogeton praelongus* Wulfen. – *Cent. Eur. J. Biol.* 8: 78–86.
- RYDLO J. (1995): Pozoruhodné jevy v přírodních rezervacích a na lokalitách ohrožených druhů. – *Muzeum a Současnost* 9: 161–164.
- SCHLÜTER P. M. & HARRIS S. A. (2006): Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. – *Mol. Ecol. Notes* 6: 569–572.
- ŠKOROVÁ P. (2011): Studium generativní reprodukce rdestu dlouholistého (*Potamogeton praelongus* WULFEN) v České republice. – Ms. [Bakal. pr.; depon. in: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové].

- VEKEMANS X., BEAUWENS T., LEMAIRE M. & ROLDAN-RUIZ I. (2002): Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasmy and of a relationship between degree of homoplasmy and fragment size. – Mol. Ecol. 11: 139–151.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VANDELEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M. (1995): AFLP – a new technique for DNA-fingerprinting. – Nucl. Acid Res. 23: 4407–4414.