

NEJNOVĚJŠÍ INFORMACE O LÝKOVCI VONNÉM – PRVNÍ ROK ŘEŠENÍ PROJEKTU TAČR (SQ01020054)

LATEST INFORMATION ABOUT *DAPHNE CNEORUM* (FRAGRANT FLOWER) – FIRST YEAR OF THE TAČR PROJECT IMPLEMENTATION (SQ01020054)

Jana Hanzal Šedivá¹ , Roman Businský¹ , Hana Drahošová¹ , Jan Holub³, Jan Humplík² , Lenka Kašparová¹, Michaela Pekařová¹ , Kateřina Podrábská¹ , Zuzana Rottová¹ , Zdeněk Špišek² 

¹ Odbor rostlinných biotechnologií, Výzkumný ústav pro krajinu, v. v. i., Květnové náměstí 391, 252 43 Průhonice, Česká republika

² Katedra chemické biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Česká republika

³ Jan Holub s.r.o., Hvozdečko 7, 78 325 Bouzov, Česká republika

Abstrakt

Lýkovec vonný (*Daphne cneorum* L.) patří mezi kriticky ohrožené druhy v ČR. Pro jeho záchranu je v přípravě záchranný program, který je pod gescí Agentury ochrany přírody a krajiny České republiky. Pro úspěšnost tohoto programu je nezbytné získat co nejaktuálnější informace. K tomu směřuje probíhající výzkumný projekt TAČR – Stanovení genetické variability, sledování změn ekosystému a fyziologie růstu u kriticky ohroženého druhu lýkovce vonného pomocí moderních metod. V prvním roce řešení jsme se zaměřili na monitoring početního stavu u většiny lokalit v ČR. Navazující aktivitou byl odběr reprezentativních vzorků ze všech navštívených lokalit pro genetické analýzy. Další aktivitou byla aktivace *in vitro* sbírky lýkovce vonného. Rostlinný materiál byl namnožen a předán dalšímu partnerovi projektu jako přípravná fáze pro plánované experimenty v oblasti testování nových bioaktivních látek podporující regeneraci rostlin odvozených z *in vitro* kultury.

Klíčová slova: *Daphne cneorum*, kriticky ohrožený druh, molekulární markery, biotechnologie, biodiverzita

Abstract

Fragrant daphne (*Daphne cneorum* L.) is classified as a critically endangered species in the Czech Republic. A conservation program for its protection is currently under preparation and is coordinated by the Nature Conservation Agency of the Czech Republic. The success of this program depends on obtaining the most up-to-date information possible. To this end, an ongoing research project supported by the Technology Agency of the Czech Republic focuses on assessing genetic variability, monitoring ecosystem changes, and studying growth physiology in this critically endangered species using modern

methods to evaluate its status across different sites. In the first year of the project, we focused on monitoring population sizes at the majority of sites in the Czech Republic. A subsequent activity involved collecting representative samples from all visited sites for genetic analyses. Another activity was the re-establishment of an *in vitro* collection of *Daphne cneorum*. Plant material was propagated and transferred to another project partner as a preparatory phase for planned experiments aimed at testing new bioactive compounds that promote plant regeneration derived from *in vitro* cultures.

Keywords: *Daphne cneorum*, critically endangered species, molecular markers, biotechnology, biodiversity

ÚVOD

Aktuální klasifikace lýkovce vonného jako kriticky ohroženého druhu (Grulich, 2017) je dána strmým gradientem ústupu jeho populací a nápadným snižováním jejich početnosti zejména v posledních 50 letech (Pravcová, 2001; Pladias, 2024). Celkově zjištěný výskyt druhu v ČR od poloviny 19. století je doložen z téměř 120 lokalit. Podle údajů AOPK do roku 2022 (Kleinová, 2010; MŽP ČR, 2023) se na území ČR nachází jen 23 lokalit, resp. populací l. vonného rozmístěných v pěti volně vymezených oblastech: střední Čechy, Moravskokrumlovsko, Podyjí, střední Morava a Hodonínsko. Údaje o aktuálnosti stavu populací jsou však podle posledních revizních návštěv velmi různorodé a spadají do rozsahu let 1996–2022, z toho jen 15 lokalit bylo potvrzeno po roce 2010. Je proto nezbytné provést aktuální šetření na lokalitách. Synergie v této aktivitě bude dosažena úzkou spoluprací s terénními pracovníky z regionálních pracovišť AOPK, zástupců dotčených krajů a zástupců z NP Podyjí, kteří se dlouhodobě zabývají ochranou lýkovce vonného. Práce v terénu budou navazovat na data z průzkumů lokalit provedených AOPK v letech 2005–2023 s využitím starších informací o stavu populací l. vonného a jejich zdrojových biotopů (Jakubková, 1997; Žlebčík, Šedivá, 2001; databáze portálů PLADIAS a ISOP).

Pro návrh vhodné strategie ochrany lýkovce vonného je klíčové znát genetickou rozmanitost a strukturu populací. V současné době nejsou žádné informace o genetické diverzitě populací kriticky ohroženého taxonu l. vonného na území České republiky. Získání nových poznatků na molekulární úrovni může být dosaženo moderními genetickými technikami, jako je inovativní metoda DArTseq, obohacená o studii stupně ploidie s využitím průtokové cytometrie. Nedávno byla publikována rozsáhlá cytogeografická studie u tří druhů rodu *Daphne* L. (*D. arbuscula*, *D. cneorum* subsp. *arbusculoides* a *Daphne cneorum* subsp. *cneorum*) z populací pocházejících ze Slovenska, Rakouska, Maďarska, Rumunska a Slovinska. Studie prokázala, že všechny tři taxony jsou diploidní. Nicméně z více než tisíce analyzovaných jedinců *D. cneorum* subsp. *cneorum* bylo pět jedinců ve čtyřech různých populacích triploidních. Cytotypy s lichou úrovní ploidie u pohlavně se rozmnožujících druhů jsou považovány za evoluční slepou uličku kvůli chybějící nebo snížené plodnosti. Pokud je sterilita pouze částečná, jejich příspěvek do genofondu populace může být posílen dlouhověkostí a klonálním růstem (Gajdošová *et al.*, 2023).

Moderní biotechnologické metody množení přinesou produkci kvalitních rostlin lýkovce vonného, kterou zajistí účastník projektu z praxe a kterou budou moci dále využít i orgány ochrany přírody v záchraně druhu *in situ*. Metoda mikropropagace je obzvláště užitečná pro genotypy, které se konvenčně obtížně nebo pomalu množí (Hartmann a kol., 2011).

METODOLOGIE

Terénní průzkum a odběr vzorků

Cílem bylo početné vyhodnocení nalezených porostů, skupin nebo jedinců včetně provedení odběru vzorků pro další laboratorní analýzy

Zaznamenání výskytu rostlin lýkovce vonného bylo provedeno od března do července roku 2025 pomocí GPS souřadnic na lokalitách v ČR. Pro odběr rostlinného materiálu byly rostliny

nejprve označeny a pak proběhl šetrný odběr rostlin lýkovce vonného pomocí nůžek do předem označených plastových sáčků. Odběr rostlinného materiálu byl proveden na základě udělených výjimek pro dané území v úzké spolupráci s AOPK a jejími regionálními pracovišti (Obr. 2).

Hodnocení genetické diverzity

Cílem bylo optimalizovat postup izolace DNA pro lýkovec vonný a zjistit stupeň ploidie u vzorků odebraných v roce 2025 v rámci ČR

Optimalizace DNA izolace ze vzorků proběhla z rostlinného materiálu odebraného z keřů lýkovce vonného z Dendrologické zahrady v Průhonicích. Zkušební odběry proběhly v lednu/únoru (listy z předešlého roku) a během kvetení v dubnu (listy z nových letorostů). Vzorky byly ihned po odběru uloženy do chladicí tašky. Po převozu do laboratoře byly umístěny do čajových sáčků, vloženy do silikagelu a vysušeny (Obr. 3). Z každého vysušeného vzorku bylo naváženo 20–30 mg materiálu, který byl homogenizován v drtícím mlýnku MM 440 (RETC) za použití skleněných kuliček. Pro izolaci DNA byl použit kit innu Prep (IST, Innuscreen GmbH), kde byly testovány tři různé lyzační roztoky. Po optimalizaci izolačního protokolu DNA za použití kitu innu Prep (IST, Innuscreen GmbH) byly vzorky izolovány již z přírodních lokalit v období březen–srpen. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena na základě měření absorbance pomocí NanoDrop spektrofotometru. Kvalita izolované DNA byla ověřena elektroforézou na agarózovém gelu (0,8% agaróza, barvení GelRed). Integrita DNA byla posouzena vizuálně podle přítomnosti jasného pásu bez pozadí.

Pro stanovení stupně ploidie pomocí průtokové cytometrie byla k přípravě vzorku využita metodika Doležel *et al.* (2007). K analýzám byly použity listy nebo části výhonů (cca 5 mm) lýkovce vonného. Celkem bylo průtokovou cytometrií analyzováno 360 jedinců. Pro zajištění vyšší přesnosti byl každý vzorek analyzován samostatně spolu se standardem *Bellis perennis* (2C = 3.38 pg; Schönswetter *et al.*, 2007) v Petriho misce s vychlazeným pufrem Otto I (0,1M monohydrát kyseliny citronové a 0,5% Tween 20). Následně byla suspenze přefiltrována přes 30 µm nesterilní filtry CellTrics® (Sysmex Partec GmbH) a obarvená roztokem OTTO II obsahující fytochrom DAPI. Měření vzorků bylo prováděno na průtokovém cytometru (Partec CyFlow® Space, Münster, Německo). Během každé analýzy bylo zaznamenáno 3 000 jader na vzorek. Získané histogramy obsahu DNA byly vyhodnoceny pomocí softwaru FloMax.

Optimalizace postupu množení

Cílem byla reaktivace stávající *in vitro* sbírky lýkovce vonného

Stávající *in vitro* genobanka lýkovce vonného, která se nachází v Laboratoři *in vitro* kultur na Odboru rostlinných biotechnologií ve VÚK Průhonice byla základem pro plánované experimenty v tomto projektu. Genobanka obsahuje 18 klonů lýkovce vonného ze 12 lokalit (Boskovice, Kosíř, Rakšice, Kobylí, Mělnická Vrutice, Dukovany, Mělník, Osina, Havraníky, Adamce, Dolní Dubňany a Hodonín).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Terénní průzkum a odběr vzorků

Bylo navštíveno 21 lokalit lýkovce vonného, u 16 z nich byl potvrzen jeho výskyt a byly odebrány vzorky pro laboratorní analýzy (Tab. I, Obr. 1). U pěti lokalit byl nález negativní, jedná se o tyto lokality: Bělá pod Bezdězem – PP Paterovské stráně, Sudovo Hlavno – lesní komplex severně od obce, Moravský Krumlov – Rakšice, Zlobice u Kuřimi – PP Zlobice a Boskovice – Vinohrádek u Boskovic.



1: Detail kvetoucího lýkovce vonného na lokalitě Voňavá (Hrotovice)



2: Ukázka spolupráce při monitoringu lýkovce vonného na lokalitě Loděnice, PP Branžovy. Zleva doprava: Lenka Kašparová (VÚK), Hana Šťastná (CHKO Český kras), Eliška Blažejová (AOPK Praha)

I: Stručný přehled lokalit lýkovce vonného s odebranými vzorky v roce 2025

Oblast výskytu	Lokalita	Počet jedinců	FCM	DNA	<i>In vitro</i> VÚK
Čechy	Beroun-Lištice (v. Herinky)	1	1	1	
	Loděnice (PP Branžovy)	91	47	47	
	Mělnická Vrutice	8	7	7	ano
	Lhotka (NPP Holý vrch)	26	24	24	ano
	Nový Knín (Pouště)	6	6	6	
Podyjí	Havraníky (Znojmo)	33	37	37	ano
	Podmolí	27	33	33	
Moravskokrumlovsko	Hrotovice Studená	15	30	30	
	Hrotovice Voňavá	9	15	15	
	Hrotovice Na kopečku	11	14	14	
	Hrotovice Kulatá	24	28	28	
	Biskupice	7	10	10	
	Dukovany, PR Duk. mlýn	305	55	55	ano
Střední Morava	Myslejovice	6	5	5	
	Slatinice, vrch Kosíř	26	31	31	ano
	Mostkovice	16	17	17	

Vysvětlivky: FCM – odběr vzorků pro flowcytometrii, DNA – odběr vzorků pro DNA analýzy

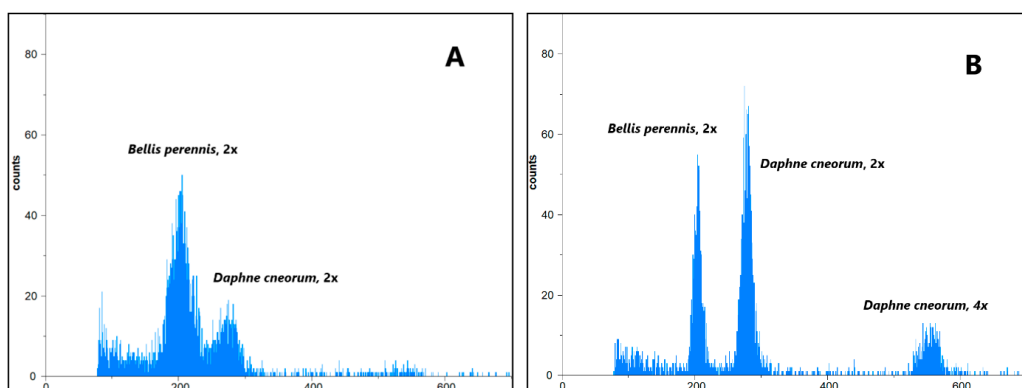
Hodnocení genetické diverzity

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu vzhledem k rozsahu vzorkování (360 vzorků). U zvoleného kitu innu Prep (IST, Innuscreen GmbH) byly testovány tři různé lyzační roztoky. Komplikací izolace byla vysoká viskozita izolátu během samotné izolace (Obr. 3). Na základě konzultací s výrobcem byly provedeny úpravy izolačního protokolu, které zahrnovaly přidání srážecího pufru a navýšení množství roztoků (lyzačního a vazebného) a prodloužení inkubace s elučním pufrům. Po těchto úpravách bylo dosaženo izolace DNA v požadované kvalitě i kvantitě. Ukázka úspěšné izolace DNA je zobrazena na Obr. 3. Na gelu jsou vedle velikostního standardu (DNA ladder) naneseny vzorky z Hodonínské Dúbravy s výtěžností DNA v rozmezí 135–430 ng/μl. Ve vzorcích jsou pozorovatelné zřetelné pruhy odpovídající vysokomolekulární DNA bez výrazného rozmazání. Po optimalizaci izolačního protokolu byla provedena izolace u 360 vzorků (jedinců) lýkovce vonného odebraných z přírodních lokalit v ČR. Bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžnost byla dosažena u listů z mladých letorostů, a to u vzorků z dubna–května.

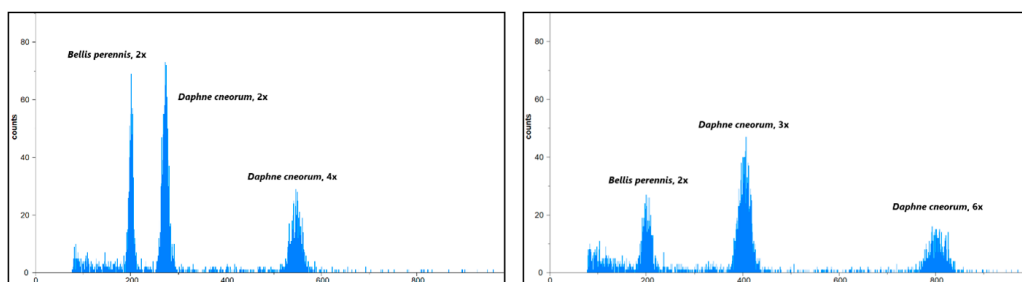
Pro determinaci ploidie u lýkovce vonného bylo zjištěno, že analýzy u stonků měly výrazně nižší variační koeficient (přesnější analýza), v porovnání s listy (Obr. 4). Z analyzovaného souboru 360 jedinců pocházejících z různých lokalit napříč Českou republikou byl detekován jeden triploidní jedinec, ostatní vzorky byly diploidní (Obr. 5). Triploidní jedinec pocházel z lokality Havraníky (DcHa6-05). Potvrdil se velmi vzácný výskyt triploidů, naše zjištění se shodují se studií Gajdošová *et al.* (2023). V analýzách nebyl zaznamenán žádný tetraploidní jedinec, což naznačuje, že by ke vzniku triploidů mohlo docházet prostřednictvím autopolyploidizace.



3: Izolace DNA u lýkovce vonného: příprava vzorků pro sušení, vlastní izolace DNA – ukázka vysoké viskozity eluátu, elektroforetická separace izolované DNA v agarózovém gelu (zleva doprava)



4: Porovnání kvality histogramů získaných průtokovou cytometrií z listů (A) a výhonů (B) lýkovce vonného (vzorek DcLo-14). Histogramy ukazují lepší rozlišení u vzorků pocházejících z výhonů



5: Histogram diploidního (vzorek DcHa6-06) a triploidního jedince (vzorek DcHa6-05) lýkovce vonného (zleva doprava)

Optimalizace postupu množení

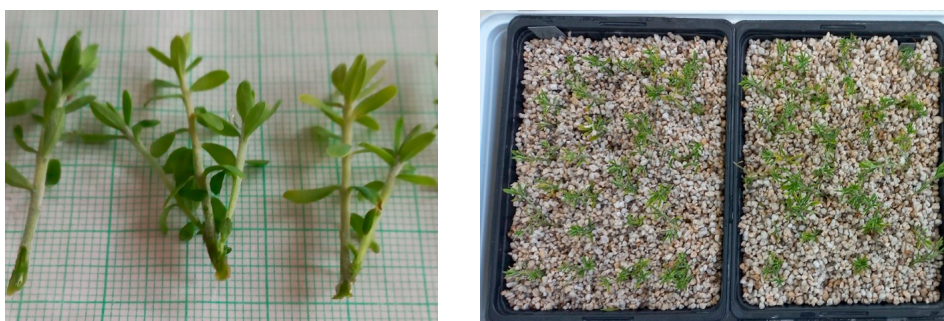
Na začátku roku byly všechny klonů multiplikovány na WPM médiu se zeatinem (Obr. 6; Šedivá, 2007). Šest vybraných klonů (Havraníky 2, Rakšice, Mělník 2, Osina, Hodonín 2 a Dukovany 2) byly předány ve dvou termínech (únor, červen) firmě Jan Holub, s.r.o. *In vitro* kultury byly dále multiplikovány na obou pracovištích. Byly vybrány dva klonů s odlišnými růstovými vlastnostmi (Rakšice a Mělník 2) a dobrou multiplikační schopností. Tyto dva klonů budou použity

v roce 2026 pro experimenty na testování bioaktivních látek. Klon Rakšice je zajímavý tím, že pochází z lokality, kde se nepodařilo výskyt lýkovce vonného několik let ověřit.

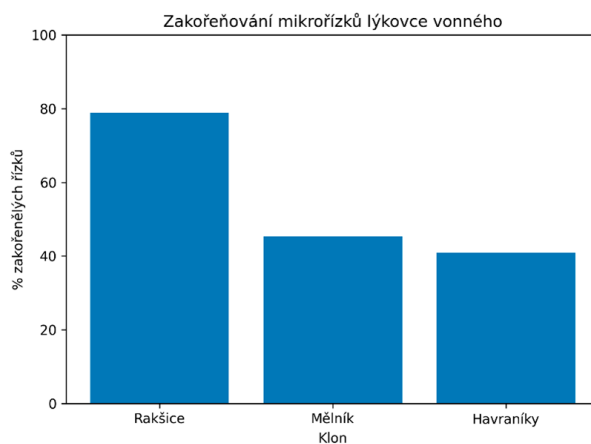
U tří klonů byla předběžně otestována zakořeňovací schopnost mikrořízků v perlitu. Mikrořízky byly odvozeny z *in vitro* kultury a byly ošetřeny pudrovým stimulem Rhizoponem AA 0,5 % (0,5% kyselina 3-indolylmásečná; Obr. 7). Klon Rakšice vykazoval vyšší zakořeňovací schopnost (78,9 %) v porovnání s klonem původem z Mělníku (45,3 %) a Havraníků (40,9 %; Obr. 8).



6: *In vitro* genobanka lýkovce vonného ve VÚK Průhonice



7: Zakořeňování lýkovce vonného v perlitu



8: Srovnání indukce kořenů u mikrořízků lýkovce vonného u tří klonů (Rakšice, Mělník a Havraníky)

ZÁVĚR

Monitoring lýkovce vonného proběhl na většině lokalit v ČR. Tam, kde byl potvrzen jeho výskyt, byly šetrně odebrány vzorky pro laboratorní analýzy. Vzorky byly zpracovány podle optimalizovaného protokolu pro izolaci DNA u lýkovce vonného. U všech odebraných vzorků byl stanoven stupeň ploidie. Byl identifikován jeden triploidní jedinec. *In vitro* sbírka lýkovce vonného byla namnožena a sloužila jako zdroj rostlinného materiálu pro další experimenty.

Poděkování

Tato dílčí studie byla podpořena Technologickou agenturou České republiky (projekt SQ01020054).

POUŽITÁ LITERATURA

- DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., SUDA, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*. 2, 2233–2244.
- GAJDOŠOVÁ, Z., SVITOK, M., CETLOVÁ, V., MÁRTONFIOVÁ, L., KUČERA, J., KOLARČIK, V., HURDU, B., ŠIRBU, L.-M., TURISOVÁ, I., TURIS, P., SLOVÁK, M. 2023. Incidence and evolutionary relevance of autotriploid cytotypes in a relict member of the genus *Daphne* (Thymelaeaceae). *AoB PLANTS*. 15(5), plad056. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plad056>
- GRULICH, V. 2017. Červený seznam cévnatých rostlin České republiky. *Příroda*. 35, 75–132.
- HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES, F. T., GENEVE, R. L. 2011. *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*. 8th Edition. Hoboken: Prentice Hall, 915 s.
- JAKUBKOVÁ, M. 1997. *Biologie, ekologie a rozšíření Daphne cneorum L. na Moravě*. Diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita, 105 s.
- KLEINOVÁ, H. 2010. *Mapování výskytu kriticky ohroženého druhu lýkovce vonného (Daphne cneorum)*. Závěrečná zpráva k projektu Ochrana biodiverzity č. 111011.
- MŽP ČR. 2023. *Koncepce aktivních nástrojů druhové ochrany v České republice 2023–2032*. Ministerstvo životního prostředí ČR. 87 s.
- PLADIAS. 2024. *PLADIAS – Databáze české flóry a vegetace*. PLADIAS Centrum of Excellence. [cit. 29. 5. 2024] <https://pladias.org>
- PRAVCOVÁ, M. 2001. Biologie, ekologie a aktuální stav výskytu *Daphne cneorum* v České republice. *Zprávy České botanické společnosti*. 36, 117–125.
- SCHÖNSWETTER, P., SUDA, J., POPP, M., WEISS-SCHNEEWEISS, H., BROCHMANN, C. 2007. Circumpolar phylogeography of *Juncus biglumis* (Juncaceae) inferred from AFLP fingerprints, cpDNA sequences, nuclear DNA content and chromosome numbers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42, 92–103.
- ŠEDIVÁ, J., 2007. Micropropagation of endangered species for biodiversity protection: *Daphne cneorum* L. In: *Strom a květina – součást života – The Tree and Flower – a Part of Life*. 4.–5. 9. 2007, Průhonice. Průhonice: VÚKOZ, v. v. i., s. 275–277.
- ŽLEBČÍK, J., ŠEDIVÁ, J. 2001. *Daphne cneorum*. *Ochrana přírody*. 56(7), 208–210.

Contact Information / Kontaktní údaje

Jana Hanzal Šedivá: jana.sediva@vuk.gov.cz,  <https://orcid.org/0000-0002-5340-8558>
Roman Businský:  <https://orcid.org/0000-0002-1700-3975>
Hana Drahošová:  <https://orcid.org/0009-0001-8102-5116>
Jan Humplík:  <https://orcid.org/0000-0002-8915-4369>
Michaela Pekařová:  <https://orcid.org/0009-0009-7917-1833>
Kateřina Podrábská:  <https://orcid.org/0009-0002-2929-2273>
Zuzana Rottová:  <https://orcid.org/0009-0005-1209-4539>
Zdeněk Špíšek:  <https://orcid.org/0009-0006-0138-2188>