

Co řeknou genetická data o osudu vzácných druhů? Modelová studie na hořečku mnohotvarém českém

Genetická diverzita představuje nezbytný základ umožňující druhům vypořádat se s variabilitou prostředí a přizpůsobit se novým podmínkám. Zachování této dostatečné rozmanitosti je proto klíčové pro zachování populací vzácných druhů. Navzdory tomu jsou naše znalosti o genetické proměnlivosti populací většiny vzácných druhů stále velmi omezené. O životním cyklu, strategii a lokalitách středoevropského endemického poddruhu hořečku mnohotvarého českého (*Gentianella praecox* subsp. *bohemica*, obr. 1) víme již mnohé (viz Živa 2013, 2: 58–61; 4: 154–156 a 5: 206–209 nebo také 2014, 1: 14–18). Doposud jsme však měli značné mezery ve znalostech genetické rozmanitosti jeho populací, přestože právě ta je pro dlouhodobé zachování tohoto hořečku zcela klíčová. V rámci našeho projektu se podařilo v daném směru popsat téměř všechny jeho populace, v nichž se v letech 2014 nebo 2015 vyskytovaly kvetoucí rostliny.

Hořeček mnohotvarý český zaznamenal v posledním století dramatický pokles jak počtu populací, tak jejich velikosti (Živa 2013, 4). V uvedeném projektu bylo studováno téměř 1 300 jedinců z 57 populací napříč celým areálem poddruhu, který zahrnuje Českou republiku, bavorskou část Šumavy, Horní Rakousy od Dunaje po Šumavu a Novohradské hory a polskou Hejšovinu při našich státních hranicích. Pro analýzu stavu populací jsme mohli využít data o počtech kvetoucích jedinců za posledních 15 let.

Ke studiu genetické diverzity jsme využili analýzu mikrosatelitů, opakujících se krátkých nekódujících nukleotidových sekvencí (např. GACA) v řadě za sebou. Mikrosatelitní lokus (místo na chromozomu, kde se vyskytuje úsek nesoucí tyto sekvence) může obsahovat až několik desítek opakování základního motivu, obvykle však 5–40. Mikrosatelity tvoří významnou součást genomu, a to velmi dynamickou, s vysokou mutační rychlostí. Výsledkem mutací je několik variant (alel) lišících se u konkrétních jedinců v počtu opakování pro daný mikrosatelit. Díky tomu se mikrosatelity široce využívají ke genetické charakterizaci jedinců v populacích, ke stanovování genetické proměnlivosti a toku genů.

Celkově jsme v populacích hořečku mnohotvarého českého identifikovali 100 různých alel. V geneticky nejbohatší, v přírodní památce (PP) Hroby u Tábora, jsme zjistili 61 z nich. Dnes jde o izolovanou populaci, ale v minulosti se nacházela v podstatě ve středu celého areálu na kontaktu lokalit „východních“ (Českomoravská vrchovina, východní Čechy, Polsko, Draňanská vrchovina) a „západních“ (Šumava a Předšumaví, Novohradské hory, Němec-

ko a Rakousko). Z tohoto pohledu proto její genetické bohatství vůbec nepřekvapuje. Zajímavé je, že tato populace neobsahuje unikátní alely, tedy alely, které by se nevyskytovaly v žádné jiné populaci než v této. Unikátní alely jsme přitom zaznamenali ve 12 populacích, kde jich bylo přítomno celkem 16 různých (obr. 4).

Pohled na data ukazuje, v souladu se studiemi na mnoha jiných druzích, že genetická podobnost populací klesá s jejich geografickou vzdáleností. To je odrazem šíření semen i pylu pouze na omezenou vzdálenost. Pozornost si ale zaslouží, že většina populací studovaného hořečku se svým genetickým složením průkazně odlišuje od všech ostatních populací. To na-



1 Středoevropský endemit hořeček mnohotvarý český (*Gentianella praecox* subsp. *bohemica*) patří mezi kriticky ohrožené rostliny.

2 Vybrané populace, jejichž ochranou lze zachovat veškerou zmapovanou genetickou diverzitu tohoto poddruhu. České populace: Horní Albeřice, Albeřické lomy (ALB), Slučí Tah (HOHEL), Horosedly, svah Čisté hory (HOROS), Hroby, úvozová cesta v přírodní památce Hroby (HROBY), Kozlov u Střelských Hoštic, Kozlovská stráž (KOZL), Olešnice v Orlických horách, přírodní rezervace Hořečky (OLES), Polná na Šumavě (POLNA), PR Opolenec, Vanického louka (VANIC).

Polské populace: Zielone – Homole (HOMOLE). Rakouské populace: Aigen (AIGL), Albrechtsberg (ALBL), Aschelberg (ASBL), Bruderndorfer Wald (BDWL), Leopoldschlag (LESL), Münichreith I (MUEL), Stixendorf (SXDL)

3 Mapa ukazující počty alel v jednotlivých populacích hořečku mnohotvarého českého. Geneticky nejbohatší se nachází v PP Hroby u Tábora (označena šipkou).

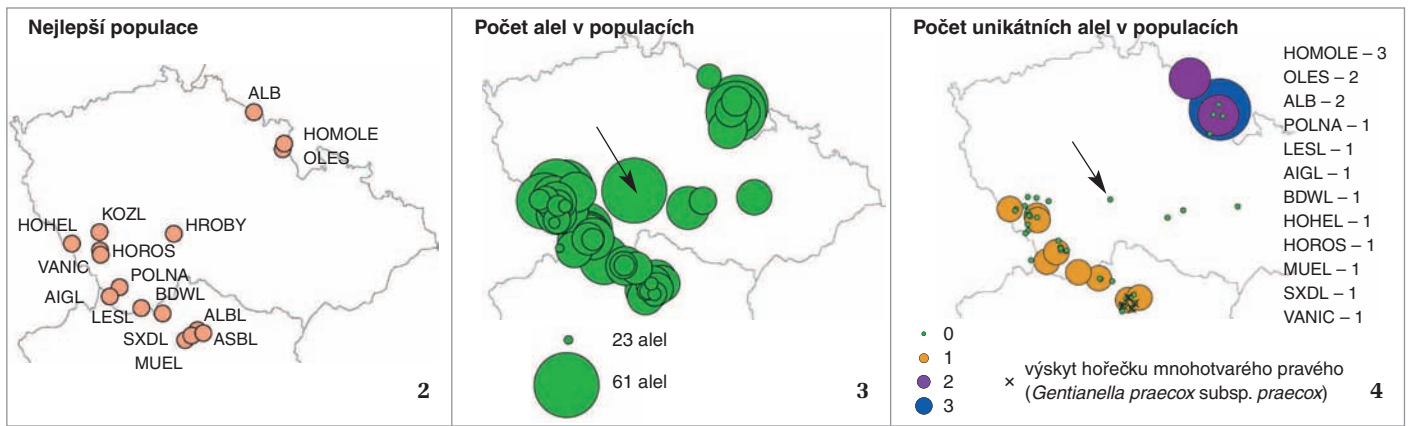
Z obr. 4 je patrné, že tato populace neobsahuje žádné unikátní alely, přesto však představuje největší zásobárnu genetické diverzity (61 %) hořečku mnohotvarého českého, reprezentující většinu jeho areálu. To je zřejmě dáno její pozicí mezi populacemi na jihu Čech a v Rakousku na jedné straně, a populacemi na severu Čech a v Polsku na straně druhé.

4 Počty unikátních alel ve studovaných populacích (vysvětlení zkratk v popisu k obr. 2). Unikátní alela se vyskytuje vždy pouze v jediné populaci v celém areálu daného taxonu. Pro zachování veškeré jeho genetické diverzity tak musíme mimo jiné chránit všechny populace s unikátními alelami.

5 až 11 Pokus s půdní semennou bankou. Odběr probíhal na transektech se vzdálenostmi mezi odběry 50 cm (obr. 5, lokalita Horosedly u Vimperka). Vzorokly byly získány pomocí Kopeckého válečku z hloubky 0–5 cm (obr. 6, foto J. Brabec) a „vrtáky“ z hloubky 5–15 cm. Odebranou půdu jsme rozložili do 1cm vrstvy na připravený zahradní substrát v květináčích; poté jsme pravidelně sledovali klíčení semenáčků a odstraňovali ostatní vyklíčené druhy (7). Mladá rostlina hořečku v létě prvním rokem po vyklíčení (8) a další jedinci na podzim prvního roku (9); rostlina vzcházející po zimě druhého roku (10) a v červnu druhého roku – příprava na kvetení (11). Snímky I. Husákové, není-li uvedeno jinak

značuje, že každá populace je svým způsobem unikátní a zasluhuje ochranu.

Zajímavým typem analýzy, který poskytlne přímé praktické doporučení pro ochranu druhu, je také identifikace minimálního souboru populací, jenž umožní zachovat veškerou genetickou diverzitu druhu. V rámci analýzy se nejprve zvolí geneticky nejbohatší populace a poté se vyhledávají další, které přidají maximum genetické diverzity dosud nezahrnuté v souboru. Tímto postupem jsme pro hořeček mnohotvarý



český vybrali 16 populací z celkových 57, jejichž ochranou lze udržet všechnu zmapovanou genetickou rozmanitost tohoto taxonu (obr. 2). Zvolené populace jsou tedy minimálním souborem, který si zaslouží prioritní ochranu v případě výrazného omezení prostředků na druhovou ochranu.

Vliv historické velikosti populací

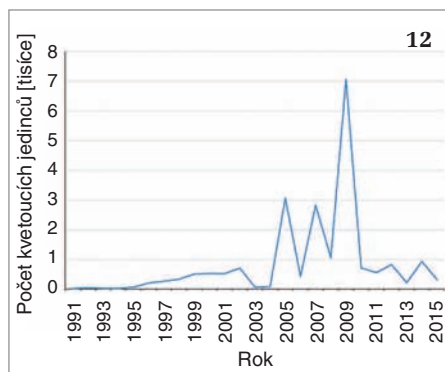
Genetická diverzita populace je úzce svázána s její velikostí – nejen současnou, ale i minulou. Teorie efektu hrdla láhve (bottleneck effect) předpokládá, že genetická diverzita je určena minimální velikostí populace, jíž druh kdy dříve prošel. Pokud by tomu tak bylo i u hořečků, dalo by se očekávat, že genetická rozmanitost bude odrážet minimální velikost populace lépe než velikost průměrnou či maximální. Pro otestování tohoto předpokladu jsme využili



výše zmíněná data o počtu kvetoucích jedinců v populacích za posledních 15 let. Spočítali jsme minimální, maximální a průměrnou velikost populace, určili její variabilitu a testovali schopnost těchto parametrů vysvětlit genetickou diverzitu. Oproti očekávání jsme ukázali, že nejlepším prediktorem není její minimum, ale maximum. Ačkoliv se to může zdát divné, tento výsledek lze logicky vysvětlit životní strategií hořečku. Jde totiž o striktně dvouletou rostlinu s dlouhodobě vytrvalou semennou bankou (blíže viz zmiňovaný článek v Živě 2013, 2). V době populačního maxima se proto může genetická diverzita uložit v semenné bance a z této zásoby genotypů populace čerpá i v případě svého propadu. K prokázání existence efektu hrdla láhve bychom tedy potřebovali stanovit velikost populace ne jako počet kvetoucích rostlin, ale jako celkový počet jedinců, tedy včetně jednoletých růžic a semenné banky. Odhad velikosti semenné banky je však velice obtížný úkol, o čemž jsme se ostatně přesvědčili při realizaci pokusu o stanovení genetické diverzity v semenné bance. Z 1 800 půdních vzorků odebraných v rámci projektu v prvním roce pokusu vzešly pouze tři semenáčky a v druhém roce se podařilo získat dalších 9 semenáčků (obr. 5–11). To není důsledkem toho, že by semenná banka neexistovala, ale semena jsou rozptýlena ve velkému objemu půdy a k jejich detekci proto dochází jen náhodně.

Maximální velikost populace se projevila také jako velmi dobrý ukazatel produkce semen. Populace, jež byly někdy v minulosti početné, si díky své vysoké genetické rozmanitosti udržují i vysokou schopnost generativní reprodukce. Vraťme se ještě k populaci v přírodní památce Hroby u Tábora, která z našich analýz vyšla jako geneticky nejbohatší. U ní známe počty kvetoucích exemplářů již od r. 1991 (obr. 12). Populace hořečku zde byla objevena v r. 1988 v době provádění náhradních zemědělských rekultivací. Tehdy na lokalitě kvetlo více než 2 000 rostlin, následně však došlo k prudkému poklesu (15–40 kvetoucích v letech 1991–94). Po zavedení pravidelného a kvalitního obhospodařování v r. 1995 se počet kvetoucích jedinců postupně rychle zvedl. Žádné snížení životaschopnosti kvůli efektu hrdla láhve nenastalo. S maximem 7 050 kvetoucích exemplářů z r. 2009 je populace hořečků v PP Hroby za léta 2000–15 třetí nejpočetnější (s největším maximem) v celém areálu poddruhu. Genetická diverzita populace zůstala v letech propadu počtu kvetoucích hořečků zachována v semenné bance. Při optimálním obhospodařování populací tedy neznámou velikost semenné banky nejlépe odráží právě maximální velikost populace.

Silný vztah mezi tímto parametrem za posledních 15 let, genetickou diverzitou populace a produkcí semen je dobrou zprávou z pohledu ochrany. Znamená totiž, že značný několikaletý pokles velikosti populace nemá přímý vliv na její osud. K silným propadům ve velikosti přitom běžně dochází např. v důsledku absence hospodaření na lokalitě v průběhu několika po sobě jdoucích let. Podobně se na velikosti populace negativně projevují extrémní sucha, významně snižující počty jedinců jak ve



12 Počty kvetoucích exemplářů hořečku mnohotvarého českého v přírodní památce Hroby u Tábora v letech 1991–2015. Orig. J. Brabec

vlastním suchém, tak v následujícím roce. Takový propad byl pozorován v letech 2003 a 2004 kvůli extrémně suché vegetační sezoně 2003 (viz i populace v PP Hroby na obr. 12). Podobný velký úbytek kvetoucích hořečků nastal v extrémně suchém r. 2015 a v jeho důsledku byl patrný i v sezoně 2016. Naopak druhým rokem po extrémním suchu se v životaschopných populacích vesměs objevuje značný počet kvetoucích exemplářů. Tak tomu bylo v r. 2005 (po extrémním suchu r. 2003 – viz již citovaný článek v Živě 2014, 1) a podobný „boom“ očekáváme i letos. Příčinu výskytu výrazně nadprůměrného množství kvetoucích rostlin vidíme v rozvolnění zápoje travinových porostů (vznikají obnažená místa ke klíčení – mezery v porostu neboli gapy) a roli může hrát aktuálně zjištěná dostatečná diverzita uchovávaná právě v semenné bance.

Křížení s hořečkem nahořklým

Hořeček nahořklý (*G. amarella*) je blízkým příbuzným h. mnohotvarého českého a tyto taxony se na několika lokalitách vyskytují společně. Získaná genetická data jsme proto dále využili pro potvrzení křížení (hybridizace) mezi hořečkem mnohotvarým českým a h. nahořklým. Tato data potvrdila, že předpokládaní kříženci jsou v některých populacích opravdu geneticky intermediaální mezi oběma rodiči (populace na Vanického louce na Opolenci u Vimperka). V populaci Jaroškov u Stach naopak domnělé hybridy (předpokládáno na základě morfologie) nelze geneticky odlišit od hořečku mnohotvarého českého. Navíc i jedinci hořečku nahořklého jsou geneticky velmi blízcí h. mnohotvarému českému. Tato situace naznačuje intenzivní introgresi mezi taxony vedoucí ke vzniku řady přechodných typů, tedy hybridního roje. To je v souladu se situací pozorovanou v posledních letech na obou lokalitách. Na Vanického louce jsme schopni na první pohled odlišit hořečky nahořklé, které kvetou nejdříve a mají menší květy. V květu je následují s většími květy hybridy a s největšími květy hořečky mnohotvaré české. Rozeznat je od sebe není již tak snadné, ale ve většině případů se nám určení při odběru vzorků podařilo a genetické analýzy naší determinaci potvrdily. Naproti tomu na lokalitě v PP Jaroškov u Stach hořečky rozkvétají v posledních letech víceméně kontinuálně a najít hranici mezi malými, středními

a velkými květy je téměř nemožné. Vzhledem k tomu, že kříženci mezi hořečkem mnohotvarým českým a h. nahořklým jsou fertilní (produkují klíčivá semena), došlo na Jaroškově k vytvoření hybridního roje, kdy se rozlišení původních taxonů a kříženců stává velmi obtížným. Není proto divu, že jsme se při sběru vzorků v určení mnohokrát spletli. Je dokonce pravděpodobné, že na lokalitě již zcela převažují kříženci (různě blízcí rodičovským druhům díky několikanásobnému křížení) a původní rodičovské druhy téměř (nebo zcela) vymizely. Navíc počet kvetoucích hořečků je na Jaroškově řádově nižší než na Vanického louce na Opolenci a v letech 2007–10 na Jaroškově v důsledku nedostatečného obhospodařování žádné hořečky nekvetly.

Srovnání s ostatními druhy a závěr

Většina předchozích studií na rodu hořeček se věnovala h. německému (*G. germanica*). V souladu s našimi výsledky ukázaly velkou genetickou diferenciaci jednotlivých populací. Současně ale na rozdíl od nás zdůraznily velký vliv aktuální velikosti populace na její genetickou diverzitu a fitness (Fischer a Matthies 1998). J. Greimler a C. Dobes (2000) u druhu *G. austriaca* našli nejvyšší genetickou diverzitu v nejmenší populaci. To se může shodovat s naším závěrem, že pro genetickou diverzitu populace není důležitá její současná velikost, ale velikost semenné banky. Poslední zajímavá studie se věnovala našemu modelovému poddruhu a za dobrý prediktor genetické diverzity označila harmonický průměr velikosti populace za posledních 10–20 let (Koniger a kol. 2012). To opět souhlasí s naším zjištěním, že znalost historické velikosti populace výrazně přispívá k pochopení genetické diverzity populací. Tato studie však byla založena pouze na 9 populacích.

Můžeme shrnout, že navzdory dramatickému poklesu počtu populací a obrovskému kolísání jejich velikosti se hořečku mnohotvarému českému daří relativně dobře. Jeho populace jsou geneticky poměrně bohaté a díky semenné bance dokáží překonávat i dočasné propady početnosti v populacích. Budoucnost tak závisí primárně na pravidelné údržbě lokalit, na níž je z velké části zaměřen realizovaný Záchraný program hořečku mnohotvarého českého v České republice. I po rozsáhlých genetických analýzách lze tedy konstatovat, že záleží především na schopnosti zajistit vhodné obhospodařování lokalit a jeden z vlajkových druhů naší ochrany přírody u nás zůstane zachován.

Článek byl vytvořen za finanční podpory EHP fondů 2009–14 a Ministerstva životního prostředí. Využity byly též údaje z dalších projektů a z monitorování hořečku mnohotvarého českého financovaného Agenturou ochrany přírody a krajiny České republiky.

Kolektiv spoluautorů: Jiří Brabec, Iveta Husáková a Mária Šurinová

Seznam doporučené literatury uvádíme na webové stránce Živý.